

Université de Montréal

**L'étude des antimicrobiens comme modulateurs du
Système de Sécrétion de Type VI de *Vibrio cholerae***

par Candice Cros

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

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

Juillet, 2019

© Candice Cros, 2019

Résumé

Vibrio cholerae est une Gamma protéobactérie, colonisant les environnements aquatiques marins mais aussi les rivières et les estuaires. *V. cholerae* est l'agent étiologique du choléra, maladie toujours considérée comme problème majeur de santé publique et causant d'importantes diarrhées aqueuses. Cette bactérie possède de multiples facteurs de virulence, dont la toxine cholérique et le pilus corégulé avec la toxine, responsables des symptômes typiques de la maladie. Cependant, *V. cholerae* possède d'autres facteurs de virulence, dont le Système de Sécrétion de Type VI (SST6) qui est un système permettant à la bactérie d'injecter des effecteurs bactériens dans les cellules voisines eucaryotes ou procaryotes. De ce fait, le SST6 est impliqué aussi bien dans la virulence chez l'Homme que dans la compétition inter-bactérienne. Lors de son cycle de vie, la bactérie est en contact étroit avec de nombreuses molécules antimicrobiennes provenant du système immunitaire de l'hôte, du microbiote intestinal mais aussi de l'environnement aquatique où des antibiotiques sont retrouvés en concentrations sous-létales. Ces molécules antimicrobiennes sont connues pour moduler les gènes de virulence des bactéries pathogènes.

Ainsi, nos recherches se basent sur l'hypothèse que de faibles doses en antimicrobiens auraient la capacité de moduler le SST6 de *Vibrio cholerae*. Ainsi, afin de déterminer l'impact des antimicrobiens sur le SST6, des analyses de protéomique par spectrométrie de masse puis par Western blot dirigés contre des protéines du SST6 ont été réalisées sur des bactéries traitées avec différents antimicrobiens en concentrations sous-létales. Puis, les activités bactéricides du SST6 de *Vibrio cholerae* ont été analysées par des tests de compétitions inter bactériennes avec *Escherichia coli* et pour finir, nous avons évalué la capacité du SST6 à apporter à *Vibrio cholerae* une résistance aux antimicrobiens. Nos résultats démontrent que la présence d'antimicrobiens lors de la croissance bactérienne peut moduler l'abondance des protéines du SST6 dans les cellules et sécrétées, mais cette modulation ne se reflète pas sur les activités bactéricides de *V. cholerae*. Enfin, nous n'avons pas trouvé d'implication du SST6 dans la résistance aux antimicrobiens.

Mots-clés : *Vibrio cholerae*, Système de Sécrétion de Type VI, antibiotiques, peptides antimicrobiens, modulation, virulence

Abstract

Vibrio cholerae is a Gamma proteobacterium, colonizing marine aquatic environments, rivers and estuaries. *V. cholerae* is the etiological agent of cholera, a disease still considered as a major public health problem, which causes severe watery diarrhea. This bacterium has multiple virulence factors, including cholera toxin and toxin coregulated pilus, which are responsible for the typical symptoms of the disease. However, *V. cholerae* has accessory virulence factors, including the Type VI Secretion System (T6SS). The T6SS is a versatile weapon allowing bacteria to inject effectors into neighboring eukaryotic or prokaryotic cells. T6SS is involved in virulence in humans as well as in interbacterial competition. During its lifestyle, *V. cholerae* is in close contact with many antimicrobial molecules produced by the host immune system or the gut microbiota but also from aquatic environment where antibiotics are often found in sub-lethal concentrations. These antimicrobial molecules are known to modulate virulence genes of pathogenic bacteria. Thus, our research is based on the hypothesis that low doses of antimicrobials would have the ability to modulate *Vibrio cholerae* T6SS.

In order to determine the impact of antimicrobials on the T6SS, proteomic analyzes by mass spectrometry and by Western blot directed against T6SS proteins have been carried out on bacteria grown with different antimicrobials at sub-lethal concentrations. Then, the bactericidal activities of *Vibrio cholerae* T6SS has been studied by inter bacterial competition using *Escherichia coli* as a prey. Finally, we evaluated the ability of T6SS to provide *Vibrio cholerae* antimicrobial resistance. Our results demonstrated that the presence of antimicrobials during bacterial growth can modulate the abundance of T6SS proteins in the bacterial cells and secreted. However, we were unable to clearly demonstrate that this modulation affected interbacterial competition involving *Vibrio cholerae*. Finally, we found no evidence that the T6SS is involved in antimicrobial resistance.

Keywords: *Vibrio cholerae*, Type VI Secretion System, antibiotics, antimicrobial peptides, modulation, virulence

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des sigles	XI
REMERCIEMENTS	XVI
INTRODUCTION	1
1. GÉNÉRALITÉS SUR <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	1
1.1 <i>Le choléra, problème majeur de santé publique</i>	1
1.1.1. Épidémiologie.....	3
1.2 <i>L'histoire du choléra</i>	6
1.3 <i>Taxonomie et Nomenclature</i>	9
2. LE CYCLE DE VIE DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	12
2.1 <i>Vibrio cholerae dans l'environnement</i>	13
2.1.1 Les stress environnementaux et les réponses de <i>Vibrio cholerae</i>	13
2.1.1.1 Les nutriments.....	13
2.1.1.2 Les prédateurs.....	15
2.1.1.3 Le transfert horizontal de gènes.....	16
2.1.1.4 Les bactéries viables mais non cultivables	16
2.1.1.5 Les biofilms	17
2.1.2 <i>Vibrio cholerae</i> et les autres organismes de l'environnement aquatique.....	18
2.2 <i>Les infections à Vibrio cholerae, le cycle de vie dans l'Homme et l'induction du choléra</i>	19
2.2.1 Le passage dans l'estomac.....	21
2.2.1.1 L'acidité de l'estomac	21
2.2.1.2 Les espèces réactives à l'azote	21
2.2.2 La colonisation intestinale	22
2.2.2.1 Les peptides antimicrobiens	22
2.2.2.2 La bile.....	23
2.2.2.3 Direction la muqueuse intestinale	24
2.2.2.4 <i>Vibrio cholerae</i> au contact des entérocytes.....	25
2.2.3 La sortie de l'hôte.....	27

2.2.3.1	Les étapes tardives de l'infection et le passage à l'état hyperinfectieux	28
3.	LES RÉPONSES DE L'HÔTE FACE À L'INFECTION DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	28
3.1	<i>Les réponses immunitaires</i>	29
3.2	<i>Les réponses du microbiote intestinal</i>	30
3.3	<i>Les réponses de Vibrio cholerae face à l'immunité de son hôte</i>	31
4.	LES FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	33
4.1	<i>Le Quorum Sensing</i>	33
4.2	<i>La toxine cholérique et le pilus corégulé avec la toxine</i>	35
4.2.1	La toxine cholérique	35
4.2.2	Le pilus corégulé avec la toxine	36
4.2.3	La régulation transcriptionnelle des gènes de la toxine cholérique et du TCP	37
4.3	<i>La mobilité et les biofilms</i>	39
4.3.1	La mobilité	39
4.3.2	Les biofilms et les microcolonies	40
4.3.3	La régulation transcriptionnelle des gènes de mobilité et de biofilm	42
4.4	<i>Les Systèmes de Sécrétions</i>	44
4.5	<i>Les autres facteurs de virulence</i>	45
4.5.1	Le LPS	45
4.5.2	Les porines	45
4.5.3	Les adhésines et les mucinases	45
4.5.4	Les systèmes à deux composants	46
4.5.5	Les sidérophores	47
4.5.6	Le transfert horizontal de gènes	47
5.	LES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION	48
5.1	<i>La sécrétion en deux étapes</i>	49
5.1.1	Le Système de Sécrétion de Type II	50
5.1.2	Le Système de Sécrétion de Type V	51
5.2	<i>La sécrétion en une seule étape</i>	51
5.2.1	Le Système de Sécrétion de Type I	51
5.2.2	Le système de Sécrétion de Type III	52
5.2.3	Le système de Sécrétion de Type VI	53
6.	LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI	53
6.1	<i>Composition et assemblage du Système de Sécrétion de Type VI</i>	53
6.2	<i>Les effecteurs bactériens, leurs activités et leurs protéines immunitaires</i>	57
6.3	<i>Organisation génétique du Système de Sécrétion de Type VI</i>	59
6.4	<i>Régulation du Système de Sécrétion de Type VI</i>	61

6.4.1	Le <i>Quorum Sensing</i>	62
6.4.2	La chitine comme inducteur du SST6	62
6.4.3	Les autres échelles de régulation du SST6	63
7.	LES ANTIMICROBIENS	66
7.1	<i>Les antibiotiques</i>	66
7.1.1	Les grandes classes d'antibiotiques	67
7.2	<i>Les peptides antimicrobiens</i>	68
7.2.1	Les peptides antimicrobiens cationiques	69
7.2.2	Les peptides antimicrobiens de l'épithélium intestinal humain rencontrés par <i>Vibrio cholerae</i>	70
7.3	<i>Les mécanismes de résistance de Vibrio cholerae aux antimicrobiens</i>	72
	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	75
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	77
1.	SOUCHES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	77
2.	CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES ET CONCENTRATIONS DE TRAVAIL.....	78
3.	ANALYSE DU SÉCRÉTOME ET DES PROTÉOMES CYTOSOLIQUE/PÉRIPLASMIQUE ET MEMBRANAIRE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE LA SOUCHE A1552 TRAITÉE AVEC DIFFÉRENTS PEPTIDES ANTIMICROBIENS	81
4.	ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES EFFETS DES ANTIMICROBIENS SUR LE SST6 DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	82
5.	TESTS DE COMPÉTITIONS INTER BACTÉRIENNES	83
5.1	<i>Vérification de la résistance des souches MC4100 d'Escherichia coli et A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de Vibrio cholerae aux antimicrobiens utilisés en conditions d'interaction</i>	84
5.2	<i>Mise en contact des deux espèces bactériennes</i>	85
5.2.1	Identification des deux espèces après compétitions	86
5.2.1.1	Quantification des deux espèces par différence de fluorescence mesurée en cytométrie en flux	86
5.2.1.2	Identification des deux espèces par production de la <i>bêta</i> -galactosidase.....	88
5.2.1.3	Sélection par antibiotiques des trois souches, A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et MC4100	88
5.3	<i>Calculs des unités formatrices de colonies par millilitre et du taux de mortalité</i>	89
5.4	<i>Étude de la sécrétion par le SST6 lors des tests de compétition</i>	89
6.	CONTACT ENTRE LES ANTIMICROBIENS À FORTES DOSES ET LES SOUCHES A1552 WT ET $\Delta HCP1\Delta HCP2$	89
	RÉSULTATS.....	91
1.	ANALYSE DU SÉCRÉTOME ET DES PROTÉOMES CYTOSOLIQUE/PÉRIPLASMIQUE ET MEMBRANAIRE DE LA SOUCHE A1552 SAUVAGE EN PRÉSENCE DE DOSES SOUS-LÉTALES EN PEPTIDES ANTIMICROBIENS BACTÉRIENS	91
1.1	<i>Détermination des concentrations de travail des peptides antimicrobiens</i>	91
1.2	<i>Analyse quantitative des protéines du Système de Sécrétion de Type VI par spectrométrie de masse</i>	92

2	ÉVALUATION PAR WESTERN BLOT DES EFFETS DES ANTIMICROBIENS SUR LE SST6 DE <i>VIBRIO CHOLERA</i> E	94
2.1	<i>Détermination des concentrations de travail des antibiotiques et suivi de croissance et dénombrement des bactéries traitées aux différents antimicrobiens</i>	95
2.1.1	Concentrations minimales inhibitrices et concentrations de travail pour les différents antibiotiques	95
2.1.2	Suivi de croissance et dénombrements des bactéries traitées à différents antimicrobiens	96
2.2	<i>Suivi de l'expression et de la sécrétion de la protéine Hcp de la souche A1552 traitée aux antimicrobiens</i>	97
2.3	<i>Western blots dirigés contre plusieurs protéines du SST6 sur les bactéries traitées aux ATB</i>	100
3	COMPÉTITIONS INTER BACTÉRIENNES	103
3.1	<i>Mises au point expérimentales</i>	103
3.1.1	Résistance des souches MC4100 d' <i>Escherichia coli</i> et A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de <i>Vibrio cholerae</i> aux antimicrobiens utilisés	103
3.1.2	Identification des deux espèces après interactions.....	105
3.1.2.1	Quantification des deux espèces par différence de fluorescence mesurée en cytométrie en flux	105
3.1.2.2	Identification des deux espèces par production de <i>bêta</i> -galactosidase	110
3.1.2.3	Sélection par antibiotiques des trois souches, A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et MC4100.....	111
3.1.3	Paramètres de compétitions inter bactériennes	112
3.1.3.1	Essais de différents temps d'interaction	113
3.1.3.2	Essais de différents ratios entre les deux espèces	115
3.1.3.3	Étude de la sécrétion par le SST6 lors des tests de compétition	116
3.2	<i>Compétitions entre Vibrio cholerae traitée aux antimicrobiens et Escherichia coli</i>	117
4	ÉVALUATION DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI COMME FACTEUR DE RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS	121
4.1	<i>Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la souche A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et rappel pour la souche sauvage</i>	121
4.2	<i>Essais de contact entre les antimicrobiens à fortes doses et les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$</i>	122
	DISCUSSION	125
1.	ANALYSE DU SÉCRÉTOME ET DES PROTÉOMES CYTOSOLIQUE/PÉRIPLASMIQUE ET MEMBRANAIRE DE LA SOUCHE A1552 SAUVAGE EN PRÉSENCE DE DOSES SOUS-LÉTALES EN PEPTIDES ANTIMICROBIENS BACTÉRIENS	127
1.1	<i>Détermination des concentrations de travail des peptides antimicrobiens</i>	127
1.2	<i>Analyse quantitative des protéines du Système de Sécrétion de Type VI par spectrométrie de masse</i>	128
2.	ÉVALUATION PAR WESTERN BLOT DES EFFETS DES ANTIMICROBIENS SUR LE SST6 DE <i>VIBRIO CHOLERA</i> E	128
3.	COMPÉTITIONS INTER BACTÉRIENNES	132
3.1	<i>Identification des espèces après interactions</i>	132

3.2	<i>Compétitions entre Vibrio cholerae traitée aux antimicrobiens et Escherichia coli</i>	133
4.	ÉVALUATION DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI COMME FACTEUR DE RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS	136
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	138
	RÉFÉRENCES	140
	ANNEXE	I

Liste des tableaux

Tableau I. Les classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.	68
Tableau II. Origines et cibles des antimicrobiens de l'étude.	79
Tableau III. Concentrations molaires et massiques des PAM utilisées lors de l'analyse protéomique.....	81
Tableau IV. Concentration massiques des antimicrobiens utilisés lors de l'analyse par Western blot.....	82
Tableau V. Concentrations de travail des différents PAM et DO _{600nm} en fin de culture de la souche A1552 WT, ne montrant pas de retard de croissance lors des traitements aux PAM... ..	92
Tableau VI. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations de travail des ATB pour la souche A1552 sauvage.....	95
Tableau VII. Apparence des colonies des souches MC4100 d' <i>E. coli</i> et A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de <i>V. cholerae</i> sur boîte avec X-Gal après 3h d'interaction.....	110
Tableau VIII. Concentrations minimales inhibitrices des ATB pour les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$	122

Liste des figures

Figure 1.	Classification de <i>Vibrio cholerae</i>	12
Figure 2.	Régulation des principaux facteurs de virulence de <i>Vibrio cholerae</i> par le <i>Quorum Sensing</i>	35
Figure 3.	Voie de régulation de la toxine cholérique et du pilus coréulé avec la toxine chez <i>Vibrio cholerae</i>	39
Figure 4.	Voies de régulation de la formation de biofilm chez <i>Vibrio cholerae</i>	44
Figure 5.	Structure des cinq Systèmes de Sécrétion retrouvés chez <i>Vibrio cholerae</i>	49
Figure 6.	Analogie de structures entre le Système de Sécrétion de Type VI et la queue du bactériophage T4.....	54
Figure 7.	Formation protéique et dynamique du SST6.	56
Figure 8.	Contraction de la gaine VipA/VipB permettant la sortie de la seringue Hcp et de l'aiguille VgrG et ainsi l'injection des effecteurs bactériens.	57
Figure 9.	Organisation génétique du Système de Sécrétion de Type VI de <i>Vibrio cholerae</i>	60
Figure 10.	Voie de régulation du Système de Sécrétion de Type VI chez <i>Vibrio cholerae</i>	65
Figure 11.	Schéma indicatif des identifications des cultures lors du maintien ou non de la sélection plasmidique.....	87
Figure 12.	Schéma indicatif du traitement des différentes cultures où la sélection plasmidique a été maintenue ou pas.....	87
Figure 13.	Analyse quantitative de spectrométrie de masse des protéines du SST6 de la souche A1552, modulées par les traitements aux PAM.	93
Figure 14.	Courbe de croissance et dénombrement après 150 minutes de culture de la souche A1552 traitée aux ATB ne montrant pas de défaut suite aux traitements antimicrobiens.....	96
Figure 15.	Cinétique d'expression et de sécrétion de la protéine Hcp chez la souche A1552 de <i>Vibrio cholerae</i> traitée aux différents ATB ou à la PmB.	98
Figure 16.	Western blots dirigés contre plusieurs protéines du SST6 chez la souche A1552 de <i>Vibrio cholerae</i> traitée aux ATB.....	101

Figure 17.	Dénombrement des souches MC4100 et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ incubées 3 heures sur un milieu LBA 2% NaCl contenant les différents antimicrobiens et démontrant leur résistance.....	104
Figure 18.	Quantification des bactéries GFP positives et négatives parmi les bactéries A1552pKen2, A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 ou MC4100 laissées seules et dont la sélection antibiotique pour le plasmide pKen2 a été maintenue O/N, O/D ou n'a jamais été maintenue, montrant un faible pourcentage de bactéries GFP positives.	107
Figure 19.	Quantification des bactéries GFP positives et négatives parmi le total de bactéries A1552pKen2 et A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 mises en interaction avec MC4100 dont leur sélection antibiotique pour le plasmide pKen2 a été maintenue en culture O/N, O/D ou n'a jamais été maintenue, montrant un faible pourcentage de bactéries GFP positives.	109
Figure 20.	Sélection des souches MC4100 d' <i>E. coli</i> et A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de <i>Vibrio cholerae</i> sur LBA streptomycine ou rifampicine, où <i>E. coli</i> est résistante à la streptomycine et <i>V. cholerae</i> est résistante à la rifampicine.....	112
Figure 21.	Dénombrement des deux espèces et pourcentage de différence entre <i>E. coli</i> en interaction et seule en fonction des temps de compétition.	114
Figure 22.	Taux de fatalité de la souche MC4100 face à la souche A1552 WT après l'utilisation de trois ratios entre les deux espèces lors des tests de compétition.....	116
Figure 23.	Dénombrement des souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et MC4100 à la suite de 3h de compétition inter bactérienne.	118
Figure 24.	Taux de fatalité de la souche d' <i>Escherichia coli</i> MC4100 face à <i>Vibrio cholerae</i> A1552 traitée avec différents antimicrobiens.	119
Figure 25.	Dénombrement des deux souches SST6+ et SST6- après 1 heure de contact avec d'importantes concentrations en antimicrobiens, où la souche SST6- semble mieux résister aux antimicrobiens.	123
Figure 26.	Western blot dirigé contre la protéine CRP, protéine exclusivement cytoplasmique, sur les échantillons de culots bactériens et de surnageants de culture de la souche A1552 de <i>Vibrio cholerae</i> , rendant compte qu'aucune protéine cytoplasmique ne contamine les surnageants.....	i

Liste des sigles

°C : degrés Celsius

µg/mL : micro gramme par milli litre

µM : micro molaire

ABC : *ATP-Binding Cassette*

acf : facteurs de colonisation accessoires

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AI-2 : *autoinducer 2*

AMP : adénosine monophosphate

AMPC : AMP cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATB : antibiotiques

ATP : adénosine triphosphate

ATR : acid tolerance response ou réponse de tolérance à l'acidité

Bap1 : *Biofilm-associated extracellular matrix protein*

BPI : *bactericidal-permeability increasing proteins*

CAI-1 : *cholera-autoinducer 1*

ChiRP : *Chitin regulated pili*

CMI : concentration minimale inhibitrice

CqsS~P : CqsS phosphorylé

CRP : *cAMP receptor protein*

CspV : *cold shock protein*

D. discoideum : *Dictyostelium discoideum*

diGMPc : di-guanosine monophosphate cyclique

DO_{600nm} : densité optique prise à 600 nano mètres

Domaine ACD : *actin cross-linking domain*

E. coli : *Escherichia coli*

EPS : exopolysaccharides

Facteur σ^E : facteur sigma E
GbpA : *GlcNAc binding protein A*
GDP : guanosine diphosphate
GFP : *Green fluorescent protein*
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GTP : guanosine triphosphate
Hap : hémagglutinine protéase
HCD : High cell density ou haute densité cellulaire
Hcp : *Haemolysin Coregulated Protein*
HK : histidine kinase
H-NS : *Histone-like Nucleoid Structuring*
HRP : *horse radish peroxidase* ou peroxydase de raifort
H β D-1 : *bêta* défensine humaine 1
IgA : immunoglobuline A
IgG : immunoglobuline G
IL-1 β : interleukine 1 *bêta*
KA : Kanamycine
Lact 705 : lactocine 705
LB : Luria-Bertani ou *Lysogeny Broth*
LBA : Luria-Bertani Agar ou *Lysogeny Broth Agar*
LCD : *Low cell density* ou densité cellulaire basse
LPS : lipopolysaccharide
LuxO~P : LuxO phosphorylé
LuxPQ~P : LuxPQ phosphorylé
Mam7 : molécule d'adhésion multivalente
MARTX : *multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin*
MATE : *multidrug and toxic compound extrusion*
Mb : mégabase
MC7 : microcine C7
MFS : *major facilitator superfamily*
MJ25 : microcine J25

Motif PAAR : motif répété proline-alanine-alanine-arginine
MSHA : *mannose-sensitive haemagglutin type IV pilin*
NAC : N-acétyl-L-cystéine
NaCl : chlorure de sodium
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NAG : N-acétylglucosamine
O/D : *over day*
O/N : *over night*
OmpU : *Outer membrane protein U* ou protéine U de la membrane externe
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OMV : *outer membrane vesicles* ou vésicules de la membrane externe
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
p/v : poids/volume
PAM : peptides antimicrobiens
PAMc : peptides antimicrobiens cationiques
PB : *Poor Broth*
PBS : *phosphate buffered saline* ou tampon phosphate salin
PCR : *polymerase chain reaction*
PG : peptidoglycane
Pi : phosphate inorganique
PmB : polymyxine B
PVDF : polyfluorure de vinylidène
qPCR : PCR quantitative
QS : *Quorum Sensing*
RNS : *reactive nitrogen species* ou espèces réactives à l'azote
RPM : rotation par minute
RS : *repeat sequence* ou région répétée
S2C : Système à deux composants
SDS : *sodium dodecyl sulfate* ou laurylsulfate de sodium
Sec : *general secretion*
SMR : *small multidrug resistance*

SN : surnageants de culture
SST1 : Système de Sécrétion de Type I
SST2 : Système de Sécrétion de Type II
SST3 : Système de Sécrétion de Type III
SST4 : Système de Sécrétion de Type IV
SST5 : Système de Sécrétion de Type V
SST6 : Système de Sécrétion de Type VI
SST6- : Système de Sécrétion de Type VI non fonctionnel
SST6+ : Système de Sécrétion de Type VI fonctionnel
SST8 : Système de Sécrétion de Type VIII
SST9 : Système de Sécrétion de Type IX
Tat : *twin arginin translocation*
TC : Toxine cholérique
TCA : *trichloroacetic acid* ou acide trichloracétique
TCEP : Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
TCP : *Toxin coregulated pilus* ou pilus corégulé avec la toxine
TFN α : *tumor necrosis factor alpha*
ThuS : thuricine S
UFC/mL : unité formatrice de colonie par milli litre
V : volts
V. cholerae : *Vibrio cholerae*
VBNC : cellule viable mais non cultivable (viable but non culturable)
VgrG-1 : *Valine glycine repeat protein G 1*
VPI : *Vibrio pathogenicity island*
VPS : *Vibrio polysaccharides*
WB : *Western blot*
WT : *Wild Type* ou sauvage
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

*À mes deux amours, l'un dans mon ventre bien au chaud et
l'autre dans ma vie, à toujours dans mon cœur.*

Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de recherche, la Dre Marylise Duperthuy, de m'avoir permis de réaliser mon stage de Master puis ma Maîtrise dans son laboratoire. Ce fut pour moi un réel privilège d'avoir participé aux débuts de ton laboratoire et d'avoir pu ajouter ma petite pierre à l'édifice! Merci pour ta confiance, ta compréhension et un grand merci pour nous avoir permis de commencer une nouvelle vie, ici, au Québec!

Je tiens tout particulièrement à remercier tous mes petits stagiaires qui ont aussi contribué à ce projet. Merci à toi, Lisa pour ta volonté d'apprendre et ton écoute, merci à Michaël, Éloïdy et Xavier pour votre implication. Merci à toi aussi, Annabelle, pour ton aide finale et très appréciée.

Et puis, merci à toi, Raphaëlle, pour ton travail sans limite, nos bons moments passés au laboratoire et surtout ton sourire matinal. Je suis fier de t'avoir appris les petits trucs de la microbiologie et je te souhaite de t'épanouir dans tes études.

Je souhaite aussi remercier les membres du laboratoire de la Dre France Daigle pour leur aide et leur disponibilité lors du lancement du laboratoire.

Je remercie les deux membres de mon jury d'évaluation de mon mémoire, les Drs Daigle France et Shapiro Jesse.

Je tiens aussi à remercier Sean pour tout ce que nous avons pu partager au laboratoire mais aussi à l'extérieur du laboratoire. Merci pour tout ce que tu es et oublie d'être!

Je tiens, tout particulièrement, à te remercier, toi, Marion pour ton aide inconditionnelle, pour ton vrai esprit critique et scientifique et bien au-delà de ça, pour être toi tout simplement. La vie au Québec nous a permis de nous rencontrer, loin de notre belle Occitanie mais malgré tout si présente dans nos discussions.

Je tiens tout simplement et de tout mon cœur, à remercier ma famille sans qui ces quelques pages n'auraient jamais pu être écrites... Merci de votre soutien, si important, vos encourageants de tous les jours et enfin merci de croire en moi.

Et puis merci à toi Hugo, mon mari, pour ton aide, ton soutien, ta confiance et tout simplement, merci de partager ma vie. Bientôt une nouvelle page à écrire à trois, sans doute accompagnée de tout le bonheur du monde.

Introduction

1. Généralités sur *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae est une Gamma protéobactérie à Gram négatif avec un flagelle polaire, anaérobie facultative, non sporulante. Elle colonise tout aussi bien les environnements aquatiques marins que les environnements d'eau douce et d'eau saumâtre, ce qu'il fait d'elle une bactérie largement aquatique. Présente dans l'environnement sous forme de cellules libres, *Vibrio cholerae* est aussi capable de coloniser les êtres vivants de façon commensale, comme le mollusque marin, ou bien pathogène, comme l'intestin grêle de l'Homme (Colwell, 1996). *Vibrio cholerae* est l'agent étiologique du choléra, maladie touchant uniquement les Hommes, dont les symptômes sont d'importantes diarrhées aqueuses responsables de déshydratations et des pertes en électrolytes pouvant amener au décès du patient. L'Homme a connu depuis 1817, 7 pandémies de choléra qui ont dévasté des civilisations et qui ont joué un rôle important dans l'histoire de l'humanité (Lutz, Erken, Noorian, Sun, & McDougald, 2013). C'est lors de la cinquième pandémie, en 1884, que la communauté scientifique prit connaissance du travail de Robert Koch, qui a isolé l'agent causant le choléra, un bacille en forme de virgule. Cependant, c'est seulement en 1965 que la bactérie est renommée *Vibrio cholerae*, en hommage à Filippo Pacini qui avait isolé 30 ans avant Robert Koch la bactérie qu'il avait décrit de vibron recourbé (Koch, 1884) (Bentivoglio & Pacini, 1995).

1.1 Le choléra, problème majeur de santé publique

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recense 1,3 à 4 millions cas de choléra dans le monde dont 21 000 à 143 000 décès, plaçant cette maladie comme un problème de santé publique majeur (Ali, Nelson, Lopez, & Sack, 2015). Le choléra est une maladie à déclaration obligatoire, mais l'OMS estime que le nombre de cas de choléra rapporté officiellement ne représente que 5 à 10% du nombre réel de cas de choléra dans le monde. Effectivement, la maladie touche principalement des pays en développement où les capacités de veille épidémiologique sont limitées (absence de laboratoire d'analyses, par exemple). De plus, ces pays connaissent des conditions sociales, politiques et économiques non-incidentes à la surveillance du choléra ou à d'autres maladies transmissibles. De plus, la surveillance et le contrôle de la maladie se font dans les régions endémiques du choléra ce qui sous-estime

l'ubiquité de *Vibrio cholerae*. Cette bactérie est un pathogène environnemental, présent dans les eaux marines, d'estuaires et de rivières. Elle a été retrouvée sur les côtes de pays nordiques non touchés par le choléra, montrant bien la présence de *Vibrio cholerae* dans chaque partie du globe (Haley et al., 2012). La détection de *Vibrio cholerae* est très importante pour le contrôle du choléra et la santé publique. La bactérie est devenue endémique et crée des épidémies saisonnières de choléra dans certains pays d'Asie qui étaient, auparavant, dépourvus de la maladie (Harris, LaRocque, Qadri, Ryan, & Calderwood, 2012). Ainsi, Ali et al., en 2015 ont montré que le choléra est un problème de santé publique dans plus d'un tiers des pays du monde dont 60% des cas se trouvent en Afrique Sub-Saharienne et 29% en Asie du Sud-Est.

La plupart des cas de choléra ont pour origine des pays dont l'accès à l'eau propre est restreint et où les conditions sanitaires sont réduites. Les populations les plus exposées et à risque sont les populations réfugiées, rassemblées dans des camps avec de mauvaises conditions d'hygiène et d'assainissement et avec de l'eau insalubre. C'est pourquoi, s'il y avait présence de *Vibrio cholerae* séro groupe O1 ou O139 dans une région non endémique, avec des conditions sanitaires peu présentes, il en résulterait une dissémination rapide et une probable épidémie. Ceci montre l'importance de la surveillance de la présence de la bactérie dans l'environnement et l'importance des veilles sanitaires dans l'épidémiologie de cette maladie (Lutz et al., 2013). L'humanité est encore affectée par la septième pandémie de choléra ayant commencé en 1961 et à ce jour le meilleur traitement de la maladie reste la réhydratation intense et l'administration de sels permettant la compensation des pertes d'électrolytes et d'eau. Certains antibiotiques peuvent être administrés permettant un raccourcissement de la durée des symptômes et une diminution des pertes d'eau mais la réhydratation reste indispensable (Bhattacharya, 2003). La prévention des épidémies de choléra passe par la vaccination des populations touchées et des personnes en voyage dans les pays endémiques. Cette vaccination doit être la plus optimisée possible puisque le choléra touche des pays dont le suivi des populations est difficile. Ainsi les deux formules vaccinales qui sont à ce jour distribuées sont des vaccins oraux de *Vibrio cholerae* O1 et O139 inactivées par la chaleur ou bien une combinaison avec la sous-unité B recombinée de la toxine cholérique (Kabir, 2014). Ces deux formules nécessitent deux doses mais certaines études

montrent tout de même une bonne efficacité chez les enfants de plus de 5 ans et les adultes, d'une simple dose sans rappel (Qadri et al., 2016).

1.1.1. Épidémiologie

Malgré l'incidence importante du choléra dans le monde et le nombre de pandémies que la bactérie *Vibrio cholerae* cause depuis des siècles, tous les individus contaminés par la bactérie ne présentent pas les symptômes typiques de la maladie ou sont des porteurs sains (Harris et al., 2005). Bien que toutes les catégories d'âges soient touchées par la maladie, les enfants de moins de 5 ans sont particulièrement vulnérables et les taux de mortalité chez cette catégorie d'individus sont plus importants (Ali et al., 2015). Aussi, il a été montré que les individus du sérotype O sont plus susceptibles à la maladie et indépendamment du sérotype de l'hôte, les taux de transmission entre les individus sont plus importants entre les parents de premier degré qu'entre des individus plus éloignés génétiquement mais vivant sous le même toit (Harris et al., 2008); ceci montrant l'importance des facteurs génétiques de l'hôte dans la susceptibilité à *Vibrio cholerae*. La réussite d'une infection microbienne est le résultat d'un déséquilibre entre trois éléments intrinsèquement liés, le microorganisme causant l'infection, l'hôte infecté et l'environnement de ce microorganisme. Chacun de ces éléments contribue à la survie, la propagation et les infections de *Vibrio cholerae* ayant à ce jour amené de multiples épidémies de choléra et sept pandémies (Conner, Teschler, Jones, & Yildiz, 2016). Ainsi, de par ces pandémies causées au fil des siècles, cette bactérie a joué un rôle certain dans l'établissement de l'épidémiologie moderne (Lutz et al., 2013).

Dans les régions du monde où le choléra est endémique, les épidémies suivent une régularité d'émergence, en fonction des changements climatiques saisonniers, démontrant le rôle de l'environnement dans l'épidémiologie du choléra (Alam et al., 2006). Les changements saisonniers sont corrélés avec des changements de température, de salinité de l'eau, de concentrations en nutriments et de zoo et phytoplancton (Lutz et al., 2013). Ainsi en période de pluies abondantes le phytoplancton est plus présent dans les eaux, augmentant la présence de zooplancton et augmentant de ce fait, l'occurrence de *Vibrio cholerae* et plus largement de *Vibrio* spp. Ces changements saisonniers sont des facteurs importants à prendre en compte dans la compréhension et le contrôle des épidémies de choléra. *Vibrio cholerae* est autochtone

des écosystèmes aquatiques agissant comme sources et réservoirs et participant ainsi à la biodisponibilité de la bactérie (Islam, Drasar, & Sack, 1994). Les infections à *Vibrio cholerae* se font par ingestion d'eau contaminée ou de nourriture provenant de la mer et colonisée par la bactérie. En effet, de nombreuses espèces du genre *Vibrio* et donc *Vibrio cholerae* interagissent avec des moules, des huîtres mais aussi des poissons et autres micro- et macroorganismes comme des chironomidés, des protistes autotrophes ou même des oiseaux marins; tout autant d'organismes agissant comme réservoirs de la bactérie et participant à sa propagation (Lutz et al., 2013). Il a été montré que les moules ont la capacité d'éliminer les souches environnementales non pathogènes de *Vibrio cholerae*, mais n'ont pas cette capacité avec les sérogroupes O1 et O139 (Collin et al., 2012). De ce fait, les souches cliniques ont une meilleure *fitness* que les souches environnementales, ayant donc des conséquences sur le contrôle de la nourriture et de la maladie. Ceci montre l'importance des interactions entre *Vibrio cholerae* et les organismes de son environnement et donc l'importance des pressions évolutives pour la sélection des souches virulentes. Par ailleurs, une étude a montré que la filtration de l'eau avec un sari, un tissu traditionnel d'Asie du Sud, permet d'éliminer 99% des *Vibrio cholerae* qui étaient présentes dans cette eau en interaction avec le zooplancton retenu par le tissu (Huq et al., 1996). Cette méthode s'est montrée efficace pour réduire l'incidence des cas de choléra et est utilisée dans les villages pour traiter l'eau. Ainsi la prédiction des épidémies de choléra et leurs surveillances peuvent aussi se faire par le contrôle de l'abondance, dans l'eau, du zooplancton ou d'autres microorganismes connus pour être en étroite relation avec la bactérie (Lutz et al., 2013).

La disponibilité de *Vibrio cholerae* dans l'eau passe aussi par sa capacité à se retrouver dans l'environnement sous plusieurs états. La bactérie peut être dans l'eau sous forme de cellules libres (planctonique) ou bien sous forme de biofilm, en relation donc, avec d'autres bactéries et liées à une surface abiotique ou biotique. Le phénotype hyperinfectieux est une autre forme de biofilm dans lesquels les bactéries expriment des gènes de virulence leur permettant de résister aux défenses de l'hôte et qui a aussi été retrouvée dans l'eau. Ce phénotype fait partie intégrante du cycle de vie de la bactérie puisque c'est l'état dans lequel elle se trouve dans les selles du patient infecté (Conner et al., 2016), (Tamayo, Patimalla, & Camilli, 2010). Cette forme est un moyen rapide de dissémination du choléra puisque lorsqu'il y a ingestion de

biofilm hyperinfectieux, une grande quantité de bactéries hautement résistantes aux défenses de l'hôte est délivrée; la dose infectieuse est ainsi diminuée par rapport à des bactéries qui seraient ingérées sous forme planctonique. La transmission de la bactérie sous l'état de biofilm est donc améliorée et les biofilms hyperinfectieux représentent un mode naturel d'infection au choléra. Ainsi les biofilms et les biofilms hyperinfectieux jouent un rôle dans la transmission de l'environnement à l'hôte mais aussi de l'hôte à un nouvel hôte et encore de l'hôte à l'environnement où ils seront des réservoirs du choléra (Faruque et al., 2006). *Vibrio cholerae* a aussi la capacité de se retrouver sous un état de latence dit de cellule viable mais non cultivable (VBNC). Cet état lui permet de résister aux stress environnementaux comme de très basses températures ou bien des carences en nutriments intenses (Mishra, Taneja, & Sharma, 2012). Tous ces états étant des réservoirs importants de *Vibrio cholerae* et donc importants dans l'épidémiologie du choléra.

Comme dans tout cycle, *Vibrio cholerae* est soumise à la prédation de bactériophages mais aussi de bactéries telles que les espèces du genre *Bdellovibrio* ainsi que du broutage des nématodes; ceci participant à la régulation des communautés de *Vibrio cholerae* dans l'environnement. La prédation par les phages, par exemple, dont la famille prédominante est *Myoviridae*, influence les épidémies de choléra. Lors d'une augmentation du nombre de phages dans l'eau, le nombre de phages lytiques retrouvés dans les selles des patients est augmenté et le nombre de cas de choléra diminue (Faruque et al., 2005), (Seed et al., 2011). Les phages retrouvés dans l'environnement lors d'épidémies sont spécifiques au sérotype dominant, ils ciblent et tuent les bactéries de ce sérotype dans leurs réservoirs aquatiques ou bien dans l'hôte. La cible principale des vibriophages est l'antigène O du LPS, c'est pour cette raison qu'ils sont spécifiques à un sérotype donné (Seed et al., 2012). De ce fait, l'évasion de *Vibrio cholerae* aux attaques de phages passe par des modifications de l'antigène O et ainsi en conditions de fortes concentrations en phages, une forte pression de sélection agit sur les modifications et les arrangements génétiques. Les phages jouent donc un double rôle de contrôle des épidémies et d'évolution des populations de *Vibrio cholerae* (Conner et al., 2016).

Un modèle épidémiologique atypique est le cas de l'Islande. L'Islande est une île, du nord de l'Europe et active géothermiquement. Des échantillons d'eau de mer, de moule et de

microalgues ont été collectés à des sites où l'activité géothermique est significative et fait augmenter la température de l'eau à marées basses (Haley et al., 2012). Ces sites sont isolés de toute influence anthropique permettant de conclure du caractère autochtone des microorganismes retrouvés dans les échantillons récoltés. L'étude a permis de retrouver *Vibrio cholerae* dans les eaux et organismes échantillonnés. Les sérogroupes retrouvés sont des non O1/non O139 mais tous les isolats expriment les facteurs de virulence associés à *Vibrio cholerae*, hormis la toxine cholérique. Cependant, aucun cas de choléra ou autres infections liées à la bactérie n'a jamais été recensé en Islande alors que la maladie est à déclaration obligatoire et que le pays possède un bon système de santé. De plus, les islandais ne sont que très peu soumis aux voies communes de transmission du choléra puisqu'ils ne mangent pas produits de la mer non cuits, vecteurs fréquents du choléra, et que l'eau de la ville provient des eaux de pluie et de la fonte des neiges. La population a déjà été soumise à quelques cas sporadiques ou épidémies d'autres infections montrant que le pays, bien qu'il soit une île, n'est pas isolé des pathogènes. Cette étude montre que *Vibrio cholerae* est autochtone d'une région où elle n'interagit pas à l'Homme et donc que sa persistance ne requière pas la transmission à l'humain. Les auteurs supposent aussi que les facteurs de virulence, étant fonctionnels et très bien conservés dans les eaux de cette région, sont essentiels et ont des fonctions écologiques et n'ont pas seulement un rôle des infections de l'hôte.

L'étude de Haley et al., en 2012 démontre que *Vibrio cholerae* est avant tout une bactérie environnementale et que sa persistance ne requière aucunement à la transmission chez l'humain. Mais l'étude démontre aussi que ses facteurs, que l'on appelle communément facteurs de virulence pour l'hôte infecté, sont aussi des facteurs essentiels à son développement dans d'autres environnements comme dans les eaux marines, d'estuaires et douces. Tous ces éléments n'enlèvent en rien la gravité qu'ont eu les milliers d'épidémies de choléra et les sept pandémies que le monde et l'humanité ont connu et connaissent encore à ce jour.

1.2 L'histoire du choléra

Les premiers cas de choléra n'ont pas une origine certaine, mais certains écrits du XVIème siècle décrivent des symptômes identiques à ceux du choléra dans des régions du sud

de l'Asie, là où les premières pandémies ont pris leur origine (Pollitzer, 1954). Le choléra tient son origine étymologique du grec, où deux hypothèses sont soumises, *kholê* qui veut dire bile et *rhéo*, je coule, ceci ayant la même étymologie que le mot colère. L'autre hypothèse, toujours du grec serait *kholéra* voulant dire jaillissement du tuyau. Le fait est que les deux hypothèses reprennent parfaitement les symptômes typiques de la maladie.

La première pandémie a commencé en 1817 sur les rives du delta du Gange en Inde puis les épidémies se sont étendues au sud du continent asiatique pour rejoindre l'Asie de l'Est en 1821 et le Japon en 1822. Les épidémies se sont aussi propagées en Asie de l'Ouest et ont atteint le Golfe persique et même la Russie du Sud en 1823. Les îles de l'océan indien comme l'île Maurice et le Zanzibar ont été touchées par la pandémie de choléra ayant donc sévi des années 1817 à 1824. Le nombre total de décès n'est pas connu mais dans certaines régions touchées, les pertes humaines sont très sévères. Ainsi, pour la première fois, le choléra est devenu une pandémie alors qu'avant il ne causait seulement que des épidémies dans les régions d'Asie du Sud. En effet, les grands changements du XIX^{ème} siècle, le pouvoir colonial et l'amélioration de la vitesse et de la fréquence des voyages à travers le monde ont permis la propagation du choléra à travers ces territoires et cette propagation suit les routes des Hommes.

La deuxième pandémie a commencé en 1826, toujours sur les rives du Gange mais cette fois-ci elle rejoint l'Europe de l'Ouest en 1832 et même l'Amérique, faisant de cette deuxième pandémie, une vraie pandémie mondiale. Le choléra traverse donc l'Atlantique et arrive à Montréal en 1833 puis la pandémie rejoindra même l'Amérique latine cette même année (Hays, 2005). Encore une fois le nombre de décès n'est pas connu mais on estime que Paris perdait jusqu'à 700 personnes par semaine. Il est difficile d'établir une date de fin d'une pandémie et de début d'une nouvelle pandémie, ainsi certains écrits considèrent le début de la troisième pandémie en 1839 alors que d'autres s'accordent sur 1852 (Hays, 2005), (Pollitzer, 1954). Cependant; il est bien établi que la troisième pandémie est la plus dévastatrice et celle s'étant la plus répandue sur le globe puisque le choléra a contaminé l'Amérique du Sud par les échanges entre le Portugal et le Brésil mais aussi est arrivé jusqu'à la côte Ouest des États-Unis en plus de toutes les autres régions auparavant citées. Dans les années 1849, John Snow, un médecin physicien londonien a comparé deux populations londoniennes économiquement

et socialement identiques mais qui différaient pourtant quant à leur incidence du choléra; l'une des populations était plus touchée que l'autre (Snow, 1856) (Hays, 2005). John Snow a remarqué que les deux populations n'étaient pas alimentées avec la même eau et c'est alors qu'il y a mis en évidence que la contamination se faisait par l'eau. Ces observations n'ont pourtant pas empêché l'apparition des pandémies suivantes mais ont, cependant permis un début de compréhension du choléra et permis de commencer à mettre en place des actions visant à limiter le nombre de nouveaux cas. C'est lors de cette même pandémie, qu'en 1854, Filippo Pacini mit en évidence le vibrion recourbé mais ses découvertes passèrent cependant inaperçues (Bentivoglio & Pacini, 1995).

La quatrième pandémie a débuté en 1863, toujours en Asie du Sud et a duré jusqu'en 1873. La pandémie s'est propagée en Asie du Sud Est mais aussi en Asie de l'Ouest où l'Afrique Centrale et du Nord ont été touchées. Elle s'est ensuite rendue en Europe Centrale et de l'Ouest, puis en Amérique de l'Est et Latine. C'est lors de la cinquième pandémie que l'agent causal du choléra a été isolé et reconnu comme la bactérie responsable des pandémies. La cinquième pandémie a débuté en 1881, toujours en Inde, et c'est en 1884 que Robert Koch, en étudiant les épidémies d'Égypte et de Calcutta, isole et identifie un bacille en forme de virgule qui infecte spécifiquement le tractus gastro-intestinal (Koch, 1884), (Pollitzer, 1954). La cinquième pandémie a, ensuite, pris fin en 1896 et la sixième a débuté 3 ans plus tard pour se terminer en 1923. Les six premières pandémies de choléra ont débuté en Inde sur les rives du Gange et l'agent causal était *Vibrio cholerae* séro groupe O1 biotype Classique (Faruque, Albert, & Mekalanos, 1998).

La septième pandémie, ayant commencé en 1961 et encore à ce jour en progression, est considérée comme la plus importante pandémie de choléra tant au niveau de sa vitesse de propagation et des régions du monde touchées. Elle est causée par un nouveau biotype, El Tor, de l'espèce *Vibrio cholerae* séro groupe O1 (Faruque et al., 1998). Un fort taux de mortalité est observé du fait de l'absence d'immunité acquise. 36 pays sont infectés dont 28 nouvellement touchés et 16 en Afrique, il y a donc un gros manque en infrastructures et équipements de soins expliquant aussi ce fort taux de mortalité (Kaper, Morris, & Levine, 1995). Lors de l'apparition du biotype El Tor, les deux biotypes du séro groupe O1 ont coexisté, ce qui leur a permis d'échanger des gènes par transfert horizontal. C'est ainsi qu'il a été observé chez *V.*

cholerae O1 El Tor l'acquisition du bactériophage filamenteux CTXΦ, auparavant retrouvé associé au biotype Classique (Waldor & Mekalanos, 1996). Cette coévolution a induit l'apparition d'un nouveau biotype « El Tor atypique », plus virulent, ayant causé une épidémie au Bangladesh en 1982 et ayant cohabité avec le biotype El Tor jusqu'en 1992 (Faruque et al., 1998).

En 1993, pour la première fois, un nouveau sérotype non O1 avait la capacité de causer chez l'humain le choléra (Albert et al., 1993), (Ramamurthy et al., 1993). Ce sérotype, à l'époque appelé non O1 et aujourd'hui reconnu comme le sérotype O139, a causé des épidémies en Inde et au Bangladesh puis se sont étendues dans les pays voisins d'Asie du Sud, menant le monde d'une huitième pandémie. En effet, tout comme à l'apparition du biotype El Tor lors de la septième pandémie, les hôtes infectés n'avaient pas un système immunitaire capable de contrecarrer l'infection. De nombreux décès ont donc été à déplorer dans ces régions-là et le sérotype, identifié comme O139, avait complètement remplacé le sérotype O1 biotype El Tor dans certaine région. Puis le biotype El Tor a réémergé et il y a coexistence des deux sérotypes.

Le choléra, à l'heure d'aujourd'hui, c'est 69 pays touchés, plus de 1,3 millions de cas par an dans le monde, dont 6% de décès (Ali et al., 2015). La majorité des épidémies sont dues au sérotype O1, quelques cas sporadiques sont, cependant, dus au sérotype O139, sérotype qui n'est jamais sorti de l'Asie (Azman, Rudolph, Cummings, & Lessler, 2013).

Les crises climatiques, humanitaires et les déplacements de populations dans des camps sans assainissement et surpeuplés connus ces dernières années, augmentent le risque de transmission de la bactérie, si elle est présente ou introduite. De ce fait, la surveillance de la présence de la bactérie et des épidémies fait partie intégrante de la prévention contre le choléra et un plan d'action a été mis en place par l'OMS et ses partenaires de lutte contre le choléra. Ce plan est une feuille de route jusqu'en 2030 pour mettre fin au choléra et faire baisser de 90% le nombre de décès dus au choléra (« WHO | Ending Cholera », s. d.).

1.3 Taxonomie et Nomenclature

Vibrio cholerae est une espèce bactérienne de l'ordre des *Vibrionales*, de la famille des *Vibrionaceae* et du genre *Vibrio*. Ce genre se décompose en plus de 60 espèces

majoritairement présentes dans les environnements aquatiques. Certaines de ces espèces peuvent être des contaminants alimentaires, pathogènes pour l'Homme, comme *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus*, ou encore *Vibrio cholerae* (Colwell, 1970), (Hae-Yeong et al., 2015). Ces espèces sont connues pour causer des infections intestinales mais elles peuvent aussi être à l'origine d'otites, de septicémies ou encore d'infections urinaires, comme l'a montré une étude de cas faite par Chowdury et coll., où *Vibrio cholerae* était l'agent infectieux (Chowdhury et al., 2016).

Au sein de l'espèce *Vibrio cholerae*, 200 sérogroupes distincts ont été répertoriés et se différencient par la structure et la composition de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) présent à la surface de la bactérie (Yamai, Okitsu, Shimada, & Katsube, 1997). À l'intérieur même d'un séroroupe les souches sont subdivisées en biotypes que l'on différencie selon des caractères phénotypiques et génotypiques. Parmi les 200 sérogroupes retrouvés, seulement deux sont capables de produire une épidémie voire une pandémie de choléra, soient les sérogroupes O1 et nouvellement O139 (Klose, 2001). L'origine du séroroupe O139 a beaucoup été discutée depuis son apparition. Ainsi, le séroroupe O139, à la différence de O1, est encapsulé suggérant que l'émergence du séroroupe O139 comme pouvant provoquer le choléra n'est pas simplement due à une simple mutation du LPS du séroroupe O1 (Johnson et al., 1994). Cependant, des études génomiques récentes semblent indiquer que les séquences chromosomiques du séroroupe O139 sont très proches de celles du séroroupe O1 ce qui suggère que le séroroupe O139 serait effectivement dérivé du séroroupe O1 et qu'il aurait acquis un nouvel antigène par transfert de gènes (Hu et al., 2016). Le point commun entre ces deux sérogroupes est leur production de la toxine cholérique (TC) et du pilus corégulé avec la toxine (TCP, toxin coregulated pilus). Ce sont les deux facteurs de virulence majeurs, donnant aux souches les exprimant le caractère virulent à *Vibrio cholerae*.

On retrouve dans le séroroupe O1 deux biotypes : Classique et El Tor. Le biotype Classique est responsable des six premières pandémies de choléra. Le biotype El Tor est, quant à lui, la cause de l'actuelle septième pandémie ayant commencé en 1961. Cependant, ce biotype avait été caractérisé pour la première fois en 1905 (Sack, Sack, Nair, & Siddique, 2004). Les deux biotypes se distinguent par la sévérité des symptômes qu'ils génèrent du fait de la différence de leurs facteurs de virulence et de leur niveau d'expression et de régulation

(Kaper et al., 1995). L'analyse de la séquence nucléotidique de la toxine cholérique permet de différencier le biotype Classique du biotype El Tor (Waldor & Mekalanos, 1996). En effet, la séquence *ctxA* de la sous-unité CtxA de la toxine cholérique est conservée entre les deux biotypes mais c'est avec la séquence de *ctxB* que l'on peut différencier les deux biotypes (Nair et al., 2002); seulement deux nucléotides diffèrent et induisent une substitution de deux acides aminés entre CtxB El tor et CtxB Classique. Les deux biotypes se distinguent aussi par des caractères phénotypiques différents, dont leur susceptibilité aux bactériophages, leur sensibilité à la polymyxine B (PmB) et leur capacité d'hémolyse (Faruque et al., 1998), (Son, Megli, Kovacikova, Qadri, & Taylor, 2011). Ainsi le biotype El Tor montre une résistance à 50 IU/mL de PmB et une activité hémolytique sur gélose au sang. À l'inverse, le biotype Classique est sensible à cette dose d'antimicrobien et ne présente pas de caractère hémolytique. Le sérotype O1 est donc subdivisé en deux biotypes, Classique et El Tor, et chacune des souches de ces deux biotypes est classée selon la présence des antigènes somatiques définissant deux sérotypes majeurs, Ogawa, Inaba et un troisième sérotype, plus rarement retrouvé dans l'environnement, Hikojima (Figure 1) (Faruque et al., 1998) (Chowdhury, Nur, Hassan, von Seidlein, & Dunachie, 2017).

Les sérogroupes non O1/non O139, sont pour la majorité des souches environnementales non pathogènes mais certaines peuvent tout de même causer des cas sporadiques ou des épidémies de gastro-entérites et d'infections extra-intestinales par leur capacité à exprimer d'autres facteurs de virulence (Faruque et al., 1998). Ces sérogroupes-ci, ont aussi dans leur génome, les gènes des principaux facteurs de virulence, *ctxA*, *tcpA* et le gène du régulateur *toxR* (Ghosh et al., 1997). Cependant, ces facteurs de virulence ne sont pas exprimés par les souches de ces sérogroupes non O1/non O139 mais pourraient potentiellement l'être dans certaines conditions environnementales. De plus, ces gènes sont aussi disponibles pour le transfert horizontal de gènes, très fréquent dans les environnements où *Vibrio cholerae* est retrouvée.

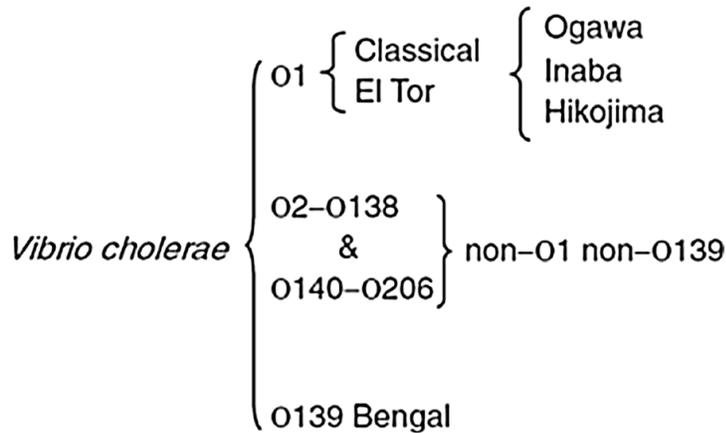


Figure 1. Classification de *Vibrio cholerae*.

L'espèce Vibrio cholerae est divisée en 206 sérogroupes. Parmi les sérogroupes, O1 et O139 ont causé des épidémies et des pandémies de choléra. Les 204 autres sérogroupes sont environnementaux ou causent des cas sporadiques ou des épidémies de gastro-entérites. Le sérogroupes O1 est subdivisé en deux biotypes, Classique et El Tor qui eux-mêmes sont divisés en trois sérotypes Ogawa, Inaba et Hikojima (Chowdhury et al., 2017). Droits intégraux de reproduction Creative Commons.

2. Le cycle de vie de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae est une bactérie environnementale, aquatique capable de s'adapter à la vie dans les eaux tout aussi bien marines que douces et saumâtres. De cette bonne adaptation, elle est aussi capable de coloniser le tractus intestinal de l'Homme où elle doit faire face aux différents stress qu'elle rencontre. Comme vu précédemment dans l'étude de cas de l'Islande, l'association de *Vibrio cholerae* avec l'Homme représente un petit aspect, mais néanmoins non négligeable, du cycle de vie de la bactérie (Haley et al., 2012). La bactérie a évolué pour lui permettre de coloniser ces deux niches écologiques bien distinctes et l'adaptation à ces deux environnements peut passer par des voies de régulations communes (Silva & Benitez, 2016). Ses stratégies sont l'expression du flagelle et l'induction de la mobilité, l'entrée en biofilm et l'attachement à des surfaces biotiques ou abiotiques. De plus, l'adaptation aux stress peut aussi être dépendante du milieu dans lequel la bactérie se retrouve et où elle développera plusieurs mécanismes de survie.

2.1 *Vibrio cholerae* dans l'environnement

Vibrio cholerae est une espèce aquatique cosmopolite puisqu'elle est retrouvée dans une très large région des tropiques où l'eau est chaude, dans les zones tempérées du monde entier mais aussi dans une région subarctique nord avec des sources d'eaux marines et terrestres chaudes (Lutz et al., 2013), (Haley et al., 2012). La présence de cette espèce bactérienne et même de ce genre est ubiquitaire dans les environnements aquatiques, sans nécessairement une activité anthropique comme vecteur de sa présence. Les souches de *Vibrio cholerae* sont de variabilité génétique importante et la large proportion des souches retrouvées sont non virulentes et ont un rôle écologique important. Cependant, dans cet environnement sans infection à l'Homme, les facteurs de virulence de *Vibrio cholerae* sont bien conservés et fonctionnels même à des températures froides représentatives des côtes marines (Sakib, Reddi, & Almagro-Moreno, 2018) (Haley et al., 2012). Ces gènes ont donc très probablement un rôle principalement écologique et essentiel à la bactérie avant d'être des facteurs de virulence chez l'hôte infecté. Ces gènes codent pour des composés permettant à la bactérie de résister aux différents stress rencontrés dans l'environnement.

2.1.1 *Les stress environnementaux et les réponses de Vibrio cholerae*

L'environnement aquatique, comme tout autre environnement, est soumis à de multiples changements saisonniers et écologiques auxquels les organismes vivants dans cet environnement doivent résister pour persister et survivre. Ainsi, *Vibrio cholerae* est soumise aux changements de salinité de l'eau, de température, de pH mais aussi aux manques en nutriments et à tous ses prédateurs. Elle a donc développé de multiples stratégies de défenses et de résistances lui permettant de survivre dans ses différentes niches écologiques, si différentes qu'elles soient.

2.1.1.1 *Les nutriments*

Les sources de nutriments dans l'environnement ne sont pas uniformément distribuées et sont concentrées du fait d'évènements localisés comme la lyse cellulaire et l'excrétion de déchets (Blackburn, Fenchel, & Mitchell, 1998). Ainsi, les bactéries utilisent le chimiotactisme et leur mobilité pour détecter ces sources ce qui leur permet d'assurer leur

persistance et survie, tirant donc un avantage de cette répartition par rapport à d'autres microorganismes non mobiles (Lutz et al., 2013). *Vibrio cholerae* est attirée par tous les acides aminés, faisant donc des protéines, peptides et acides aminés des sources nutritionnelles importantes (Freter & O'Brien, 1981). Les autres sources de nutriments dans l'eau sont les oligosaccharides chitineux, les sucres comme le mannitol mais aussi le fer, le phosphore ainsi que l'ADN extracellulaire, un des composants de la matrice extracellulaire des biofilms (Meibom et al., 2004), (Ymele-Leki, Houot, & Watnick, 2013), (Seper et al., 2011), (Lutz et al., 2013).

Le fer est un élément limitant dans l'eau du fait de sa faible solubilité et est retrouvé en concentrations variables avec la profondeur de l'eau. Il est, cependant, essentiel à la bactérie car il intervient dans plusieurs processus métaboliques (Conner et al., 2016). De ce fait, *Vibrio cholerae* possède plusieurs systèmes de récepteurs et transports du fer lui permettant donc de persister dans des milieux pauvres en fer (Martin & Michael Gordon, 1988), (Wyckoff, Mey, & Payne, 2007).

La chitine est un polymère de N-acétylglucosamine (NAG), insoluble, très abondamment retrouvée dans l'environnement et composant l'exosquelette du zooplancton (Meibom et al., 2004). C'est une source importante de carbone et d'azote pour les microorganismes pouvant les métaboliser et leur apportant donc un avantage sélectif. *Vibrio cholerae* comme les autres membres de la famille des *Vibrionaceae* utilisent cette ressource comme nutriment mais aussi comme molécule signal très importante. En effet, lorsque la bactérie détecte la chitine dans le milieu, elle va tout d'abord induire les gènes du chimiotactisme, lui permettant une meilleure détection et son attachement au composé. Tout ceci induit la formation de biofilm et va aussi lui permettre de devenir naturellement compétente afin d'acquérir de nouveaux gènes (Meibom et al., 2004), (Meibom, 2005). Un autre élément induisant la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* est le mannitol. Ce sucre est un produit de la photosynthèse des algues brunes marines qui induit chez *Vibrio cholerae* l'attachement à la surface et la formation de biofilm. Le mannitol est utilisé par la bactérie comme source de carbone et est aussi un protecteur contre la pression osmotique lui permettant donc sa survie dans certains environnements (Ymele-Leki et al., 2013).

2.1.1.2 Les prédateurs

Lorsque les conditions environnementales sont telles qu'il y a abondance de nutriments, il y a un développement important de tous les micro- et macro-organismes et donc aussi un développement des prédateurs. Ces prédateurs, phages, protistes phagotrophiques et bactérioplancton sont la principale cause de mortalité de *Vibrio cholerae* dans les eaux riches en nutriments (Matz & Kjelleberg, 2005). En effet, par exemple dans le Golfe du Mexique, il a été montré que les ciliés et les nanoflagellés hétérotrophiques broutent des taux de plus de 1000 bactéries/cellule/heure (Pérez, Macek, & Galván, 2004), (Macek, Carlos, Memije, & Ramírez, 1997). Ainsi, pendant les *blooms*, les taux de croissance de *Vibrio cholerae* sont multipliés par quatre ce qui lui permet de contre carrer la pression du broutage et maintenir sa dose infectieuse (Worden et al., 2005). La persistance à long terme et l'accumulation de *V. cholerae* au travers des saisons et des *blooms* tient de son adaptation à l'environnement et de son adaptation aux cycles de vie des organismes l'occupant. De plus, le broutage induit la formation de biofilm, ceci activant l'expression des gènes ayant une activité anti-protozoaire et permettant à la bactérie de résister aux prédateurs (Sun, Kjelleberg, & McDougald, 2013). Un autre mécanisme de résistance aux prédateurs est la résistance à la digestion et aux vacuoles phagocytaires faisant de ces prédateurs, comme les amibes par exemple, des réservoirs de *Vibrio cholerae* (Abd, Weintraub, & Sandström, 2005).

La résistance aux phages passe des modifications de l'antigène O faisant donc évoluer les souches de *Vibrio cholerae* par pression de sélection, transfert horizontal de gènes. Ainsi en plus de jouer un rôle écologique important dans le contrôle des épidémies, les phages permettent l'évolution des souches de *Vibrio cholerae* (Seed et al., 2012), (Conner et al., 2016). De plus, la résistance de certaines souches de *Vibrio cholerae* aux bactériophages est aussi dépendante du système d'immunité adaptative *clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated proteins (Cas)* (Box, McGuffie, O'Hara, & Seed, 2016). En effet, le système CRISPR-Cas amène chez les bactéries une immunité adaptative spécifique à une séquence en acides nucléiques grâce à sa structuration particulière (Barrangou et al., 2007). CRISPR est composé d'une succession de petites séquences d'ADN répétées sous forme palindromiques alternées avec de séquences variables, *spacers*, acquises par la bactérie lors d'infection avec des bactériophages ou de l'ADN étranger. Ces *spacers* sont

intégrés à l'ADN bactérien, ainsi, lors d'une nouvelle infection par cet ADN étranger, il y aura hybridation des brins et clivage de l'ADN étranger grâce à la machinerie enzymatique Cas. Le système CRISPR-Cas chez les bactéries, tout comme le système immunitaire adaptatif des animaux, permet donc, lors d'une deuxième infection, la reconnaissance spécifique de l'envahisseur et son élimination. Chez *Vibrio cholerae*, un îlot génomique, dont l'analyse *in silico* identifie comme un probable système CRISPR-Cas, est seulement présent chez la souche O395 du biotype Classique et permettrait donc la défense de la souche contre les bactériophages environnementaux (Chun et al., 2009), (Box et al., 2016). Toutes les souches de *Vibrio cholerae* ne possèdent pas ce système de défense contre la prédation phagique, qui reste tout de même une source de pression sélective permettant l'acquisition de nouveaux gènes grâce à l'infection par des phages lytiques. En effet, les infections aux bactériophages de *Vibrio cholerae* lui ont permis d'acquérir des gènes de virulence, comme les gènes de la toxine cholérique (TC) et des gènes de résistance aux antibiotiques (Waldor & Mekalanos, 1996), (Palmer & Gilmore, 2010).

2.1.1.3 Le transfert horizontal de gènes

Les souches de *Vibrio cholerae* retrouvées dans l'environnement sont génétiquement bien différentes montrant l'évolution du génome de la bactérie en réponse à son adaptation aux conditions environnementales. Cette palette génétique lui permet par transfert horizontal de gènes entre les différentes souches de pouvoir résister aux stress rencontrés. L'induction du transfert horizontal de gènes se fait par des signaux environnementaux comme l'ensoleillement, la température et les conditions osmotiques mais aussi lors de son entrée en biofilm et permet la génération de nouveaux clones plus résistants (Lipp, Huq, & Colwell, 2002).

2.1.1.4 Les bactéries viables mais non cultivables

Lorsque les températures sont basses ou lors de carence en nutriments *Vibrio cholerae* a la possibilité de se convertir sous un état viable mais non cultivable (VBNC) (Mishra et al., 2012). Les VBNC sont de plus petite taille, rondes, avec un métabolisme réduit leur permettant d'économiser l'énergie. Ces cellules expriment cependant des facteurs de virulence montrant qu'elles sont tout de même actives (Vora et al., 2005). Les bactéries doivent être

capables de renverser cet état pour y trouver un avantage; pour cela entre autres, le passage chez l'hôte humain à 37°C active le *Quorum Sensing*, permettant à la bactérie de revenir à un état métabolique normal et même coloniser l'hôte. Ces cellules dormantes sont détectées à la surface de l'eau ou bien des crustacées ou algues dans le plancton et dans le bactérioplancton où elles vont être capables de capter les nutriments et autres sels excrétés par ses hôtes (Binsztein et al., 2004).

2.1.1.5 Les biofilms

La formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* dans l'environnement aquatique est induite lors de stress nutritionnels mais aussi par des facteurs abiotiques comme le pH, la température et la salinité (Pardío Sedas, 2007). En effet, lorsque la température augmente, elle fait aussi augmenter la salinité de l'eau induisant donc la formation de biofilm pour la protection des cellules. Les biofilms permettent donc la résistance aux stress rencontrés par protection physique mais aussi par induction de gènes de « protection » (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber, & Lappin-Scott, s. d.), (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). Les biofilms permettent aussi un accès aux nutriments augmenté et sont aussi un moyen de dispersion efficace pour *Vibrio cholerae*. En effet, lorsqu'elle est attachée à des surfaces mobiles abiotiques comme les coques des navires ou biotiques comme les zoo- et phytoplancton elle augmente ces chances de dispersion dans l'eau (Shikuma & Hadfield, 2010), (Epstein, 1993). Les biofilms de *Vibrio cholerae* peuvent aussi se présenter comme des agrégats flottants libres (Munirul et al., 2006).

Ainsi, la formation de biofilm permet à la bactérie d'exprimer des gènes de « protection » contre les stress abiotiques : les pH bas, le stress osmotique et oxydatif et contre les stress biotiques comme la prédation par les phages et les protistes hétérotrophes (Zhu & Mekalanos, 2003), (Wai, Mizunoe, Takade, Kawabata, & Yoshida, 1998), (Nesper et al., 2001), (Sun et al., 2013). Ces gènes de « protection » codent pour des composés contre carrant ces stress et des composés anti-prédateurs et se retrouvent comme étant les mêmes gènes que les gènes de virulence (Lutz et al., 2013). Ainsi les facteurs de virulence sont impliqués dans la compétition prédateurs/proies où *Vibrio cholerae* peut être la proie, en conditions environnementales, mais aussi la prédatrice lorsqu'elle infecte l'Homme. Le Système de Sécrétion de Type VI (SST6)

est un mécanisme de défense contre les autres bactéries et eucaryotes de l'environnement de *Vibrio cholerae* par sécrétion de toxines et effecteurs dans les cellules cibles (MacIntyre, Miyata, Kitaoka, & Pukatzki, 2010). Ces toxines et effecteurs ont la capacité d'arrêter la phagocytose et ont des activités cytotoxiques et bactéricides. Le SST6 est contact dépendant avec ses cellules cibles, de ce fait, il n'est actif que dans un microenvironnement où les cellules sont physiquement proches les unes des autres, comme dans les biofilms. Lorsque *Vibrio cholerae* est en biofilm, elle sur-exprime les gènes du SST6 et les gènes de compétences lui permettant d'acquérir l'ADN des cellules voisines lysées par le SST6 (Borgeaud, Metzger, Scignari, & Blokesch, 2015). Ainsi, le transfert horizontal de gènes se déroulant dans les biofilms permet une meilleure évolution des souches de *Vibrio cholerae*. Chez les sérotypes O1 et O139, le SST6 est activé lorsque la pression osmolarité est haute et que la température est basse, ce qui mime les conditions dans l'eau montrant l'importance du SST6 dans la défense contre la prédation et dans les compétitions inter-espèces (Ishikawa, Rompikuntal, Lindmark, Milton, & Wai, 2009). Ainsi, en plus d'amener une résistance physique, les biofilms par haute densité cellulaire permettent l'accumulation de facteurs anti-protazoaires ou bactériens ne pouvant généralement pas s'accumuler dans la phase planctonique (Lutz et al., 2013). Puis, à la suite du biofilm, la bactérie réactive ces gènes de mobilité et induit la formation du flagelle ce qui va lui permettre d'aller coloniser d'autres environnements (Lutz et al., 2013).

2.1.2 *Vibrio cholerae* et les autres organismes de l'environnement aquatique

Vibrio cholerae fait partie intégrante de l'eau et de ce fait elle interagit de manière directe ou indirecte avec les micro- et macroorganismes de son environnement (Lutz et al., 2013). Elle a été retrouvée en interaction avec des chironomidés durant les quatre étapes du développement : du stade œuf au stade adulte (Broza & Halpern, 2001), (Halpern, Broza, Mittler, Arakawa, & Broza, 2004), (Broza, Gancz, Halpern, & Kashi, 2005). La bactérie peut se nourrir des œufs mais peut aussi rester accrochée sur les membranes des adultes qui en se déplaçant vont permettre sa dispersion. La majorité des cellules de *Vibrio cholerae* retrouvées sur les œufs sont des VBNC et 99.5% des bactéries retrouvées sur les œufs ne sont pas de l'espèce *Vibrio cholerae* mais utilisent les nutriments libérés par *V. cholerae* (Halpern, 2011), (Halpern, Landsberg, Raats, & Rosenberg, 2007). De ce fait, ces autres espèces

compétitionnent avec *Vibrio cholerae* pour l'espace et les nutriments, et sécrètent des bactériocines actives contre la bactérie. *Vibrio cholerae* a aussi été détectée dans l'intestin de poissons et d'oiseaux se nourrissant d'espèces porteuses de *V. cholerae* (Senderovich, Izhaki, & Halpern, 2010), (Malka Halpern, Senderovich, & Izhaki, 2008). Cette espèce fait aussi partie intégrante du benthos où elle colonise bons nombres d'organismes filtreurs et elle est aussi présente dans les sédiments (Collin et al., 2012), (Vezzulli et al., 2009). Ceci montre une fois de plus l'ubiquité de l'espèce *Vibrio cholerae*. Les interactions entre *Vibrio cholerae* et les autres organismes aquatiques sont importantes pour le cycle de vie de *Vibrio cholerae* mais aussi pour l'écosystème aquatique de manière générale (Lutz et al., 2013). Ces interactions passent par l'attachement de *Vibrio cholerae* se trouvant sous un état de VBNC ou de biofilm sur les organismes aquatiques et sont un avantage sélectif lui permettant de persister dans un milieu, à première vue, non propice à sa croissance (Dawson, Humphrey, & Marshall, 1981).

2.2 Les infections à *Vibrio cholerae*, le cycle de vie dans l'Homme et l'induction du choléra

L'entrée dans l'hôte est perçue par *Vibrio cholerae* par les changements de température passant à 37°C, de pression osmotique, de pH et tous autres caractères physico-chimiques. Tous ces changements sont autant de signaux permettant à la bactérie d'engager son processus infectieux dans l'hôte (Conner et al., 2016). Il a, par exemple, été montré, *in vitro*, que le passage de l'environnement à 37°C initie l'entrée en biofilm par l'augmentation intracellulaire du di-guanosine monophosphate cyclique (diGMPc), un messager secondaire chez *Vibrio cholerae* (Townsend & Yildiz, 2015).

Vibrio cholerae est acquise de l'environnement par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Elle peut aussi être transmise de l'Homme à l'Homme par contamination fécale de l'eau ou d'aliments (Kaper et al., 1995). Lors de l'ingestion, la bactérie peut se trouver sous forme de cellules planctoniques libres, de biofilms, de microcolonies ou de VBNC faisant varier la dose infectieuse (Almagro-Moreno, Pruss, & Taylor, 2015), (Colwell et al., 1985), (Vora et al., 2005). En effet, ces différentes formes ont des capacités de résistance à l'acidité de l'estomac variables. Les cellules libres sont sensibles au pH très bas de l'estomac et la dose infectieuse connue est de 10^{11} bactéries (Cash et al., 1974). Cependant lorsque le pH est tamponné, la

dose infectieuse est réduite à 10^4 à 10^6 bactéries. Cette observation explique la plus grande susceptibilité des individus ayant une basse production d'acides gastriques aux cellules libres de *Vibrio cholerae* (Van Loon et al., 1990). Les autres formes de *Vibrio cholerae* sont physiquement et métaboliquement plus acido-résistantes, par l'expression de gènes de réponse à l'acidité (Silva & Benitez, 2016), (Almagro-Moreno et al., 2015), (Wong & Wang, 2004), (Colwell et al., 1996).

Les biofilms, attachés aux crustacés par leur enveloppe de chitine ou bien en agrégats, sont la forme la plus apte à se protéger contre les défenses de l'hôte (Almagro-Moreno et al., 2015), (Silva & Benitez, 2016). Physiquement, les bactéries sont protégées par une matrice extracellulaire qui limite les échanges avec l'extérieur et donc qui permet une plus grande résistance aux stress (Zhu & Mekalanos, 2003). De plus, le profil transcriptomique des bactéries dans leur état biofilm montre l'expression de gènes de réponse au stress dont la réponse de la tolérance à l'acidité de l'estomac (Merrell, Butler, et al., 2002). Les biofilms sont aussi plus infectieux par leur importante densité cellulaire, ainsi une petite quantité de biofilm ingérée libre dans l'hôte une grande quantité de bactéries et donc une plus grande possibilité d'infection.

Les microcolonies sont des regroupements de cellules assemblées par le TCP (pilus corégulé avec la toxine) qui est exprimé à leur surface et qui s'apparentent aux agrégats du début de la formation de biofilm (Herrington et al., 1988), (Silva & Benitez, 2016). Le TCP est un facteur de virulence important de *Vibrio cholerae* promouvant l'agrégation cellulaire lors des phases initiales de la formation de biofilm et permettant aussi l'adhérence aux cellules épithéliales. Les microcolonies sont retrouvées dans l'environnement après avoir été rejetées des selles de patients du choléra, où les bactéries se trouvent sous un état déjà infectieux, voire hyperinfectieux (Merrell, Butler, et al., 2002). De ce fait, l'ingestion par un nouvel hôte de microcolonies permet à *Vibrio cholerae* une meilleure tolérance aux stress rencontrés et ainsi, une meilleure colonisation.

Les cellules viables mais non cultivables de *Vibrio cholerae*, VBNC, sont acido-résistantes et ont la capacité de coloniser l'intestin grêle de l'Homme pour induire le choléra (Wong & Wang, 2004), (Colwell et al., 1996). Elles retrouvent alors un état métabolique actif où elles peuvent à nouveau être cultivées. C'est grâce à la régulation du *Quorum Sensing* et la

perception des autoinducteurs qu'elles rétablissent leur métabolisme (Bari et al., 2013). Les VBNC continuent tout de même à exprimer les facteurs de virulence ce qui leur permet de garder leur infectiosité (Vora et al., 2005).

2.2.1 Le passage dans l'estomac

L'estomac est la première barrière de protection de l'hôte rencontrée par les pathogènes intestinaux. Ainsi, le passage dans l'estomac est un stress physiologique important car en plus de devoir s'adapter et survivre au pH bas, les pathogènes doivent résister aux dommages à l'ADN créés par les molécules retrouvées dans ce milieu (Conner et al., 2016).

2.2.1.1 L'acidité de l'estomac

Alors que *Vibrio cholerae* pousse mieux à pH neutre, elle doit pouvoir résister et survivre à un pH de 1 à 3 pendant 20 à 60 minutes, qui se trouve être la durée moyenne du passage dans l'estomac (Miller, Drasar, & Feachem, 1984), (Angelichio, Spector, Waldor, & Camilli, 1999). De ce fait, *Vibrio cholerae* induit sa réponse de tolérance à l'acidité (ATR) comprenant la synthèse de la porine OmpU, d'enzymes de réparation et recombinaison à l'ADN ainsi que de chaperonnes et de protéines du choc thermique protégeant les protéines de l'hydrolyse acide (Klose, 2001) (Swenson, Stochastic, Bolander, & Long, 2012), (Merrell, Hava, & Camilli, 2002). De plus, la lysine décarboxylase CadA va consommer les ions H⁺ par production de cadavérine et dioxyde de carbone faisant donc réaugmenter le pH intracellulaire (Merrell & Camilli, 1999). La transcription de ces gènes sont sous la régulation de ToxR, un régulateur majeur de la virulence de *Vibrio cholerae* (Merrell & Camilli, 2000).

Il a été montré que l'exposition au pH bas de l'estomac améliore l'infectiosité de *Vibrio cholerae* par l'induction préalable de facteurs de colonisation de l'intestin grêle de l'Homme et de facteurs de virulence (Merrell, Butler, et al., 2002). Ainsi, la réponse ATR prépare les bactéries à la suite de son parcours à travers le tractus intestinal et leur permet une meilleure adaptabilité.

2.2.1.2 Les espèces réactives à l'azote

L'acidité n'est pas la seule défense antimicrobienne de l'estomac, celui-ci contient aussi des espèces réactives à l'azote (RNS) qui causent des dommages à l'ADN des

microorganismes contaminants (Lundberg, Weitzberg, Lundberg, & Alving, 1994), (Fang, 1997). Ces RNS résultent de l'acidification des nitrites retrouvés dans l'alimentation et la salive et se retrouvent dans l'estomac mais aussi dans l'intestin grêle où les cellules épithéliales en réponse à la présence de *Vibrio cholerae* sécrètent de l'azote (Qadri et al., 2002). Ceci force la bactérie à maintenir ses mécanismes de défense tout au long de son passage dans le tractus intestinal. En effet, *Vibrio cholerae* possède l'enzyme HmpA dégradant l'azote et la protégeant ainsi des dommages à l'ADN. Cette réponse suggère que la bactérie est aussi confrontée aux RNS dans l'environnement aquatique et qu'elle a adapté ce mécanisme de résistance à ces deux milieux de vie (Davies et al., 2011).

2.2.2 La colonisation intestinale

Après avoir survécu au passage dans l'estomac sous forme de biofilm, la bactérie doit encore résister aux mécanismes de défense dans le reste du tractus intestinal de l'hôte. En effet, dans l'intestin, *Vibrio cholerae* est en contact avec la bile, les peptides antimicrobiens (PAM) de l'hôte mais aussi son microbiote intestinal et doit résister aux nouvelles modifications environnementales (Silva & Benitez, 2016), (Almagro-Moreno et al., 2015), (Conner et al., 2016).

2.2.2.1 Les peptides antimicrobiens

Les PAM font partie du système immunitaire inné de l'hôte et peuvent être sécrétés par les cellules de l'hôte, ce sont alors des PAM d'origine humaine, ou bien par les bactéries du microbiote intestinal et ce sont les PAM d'origine bactérienne. En effet, on inclut dans la réponse immunitaire innée les réponses de l'hôte humain mais aussi les réponses de son microbiote, qui se complètent les unes des autres. Les PAM sont des molécules amphipathiques qui comme les détergents, ont la capacité physico-chimique de perturber les membranes cellulaires (Conner et al., 2016). Les PAM peuvent aussi avoir des propriétés immunomodulatrices, permettant à l'hôte de se défendre contre les infections bactériennes (Steinstraesser, Kraneburg, Jacobsen, & Al-Benna, 2011), (Kanduc et al., 2002). La réponse immunitaire impliquant la production PAM et les mécanismes de résistance de *Vibrio cholerae* seront détaillés lors des parties 3.3, 7.2 et 7.3.

2.2.2.2 La bile

La bile est un mélange d'acides biliaires, de cholestérol, d'acides gras insaturés dont la principale fonction est l'émulsion et la solubilisation des lipides des aliments mais a aussi des propriétés antimicrobiennes en endommageant les parois cellulaires (Begley, Gahan, & Hill, 2005), (Conner et al., 2016), (Silva & Benitez, 2016). La bile se retrouve en forte concentration dans la lumière intestinale mais peu de bile est détectée dans la muqueuse intestinale. En effet, lorsque le lumen et la muqueuse intestinale sont observés, un gradient inverse s'établit entre les concentrations en bile et en bicarbonate (Plecha & Withey, 2015), (Abuaita & Withey, 2009). Ces éléments représentent des signaux de localisation permettant à *Vibrio cholerae* d'induire ses gènes de virulence au bon endroit. De ce fait, les acides biliaires présents dans la lumière intestinale induisent l'entrée en biofilm par augmentation intracellulaire du diGMPc de la bactérie puisque le lieu privilégié d'infection est au contact direct des cellules épithéliales (Beyhan, Tischler, Camilli, & Yildiz, 2006). Ces biofilms permettront la résistance physique à la bile et de plus, par la régulation de ToxR, permettront la synthèse de la porine OmpU qui protégera les cellules des acides biliaires et des PAM (Louis & O'Byrne, 2010), (Merrell, Tischler, Lee, & Camilli, 2000). La formation de biofilm au niveau de l'intestin est donc en lien très étroit avec la concentration en acides biliaires grâce à la perception par les niveaux de diGMPc intracellulaire. Les fonctions d'émulsion des acides biliaires ont une activité bactéricide par les dommages causés aux parois bactériennes (Begley et al., 2005). Ainsi les mécanismes de résistance de la bactérie sont la modification de son LPS par des protéines de synthèse et l'efflux (Bina, Provenzano, Wang, Bina, & Mekalanos, 2006). Les acides gras insaturés, quant à eux, inhibent l'expression des gènes de la toxine cholérique (CT) et du TCP en empêchant le régulateur transcriptionnel ToxT de se fixer sur leurs promoteurs respectifs (Schuhmacher & Klose, 1999), . En effet, la virulence ne devant pas s'effectuer dans le lumen, *Vibrio cholerae* inhibe sa cascade de virulence par la perception de la bile. Cette observation montre une nouvelle fois l'évolution des interactions entre le pathogène et l'hôte et la réussite de l'infection ainsi que l'importance de la régulation spatiotemporelle de la virulence (Provenzano & Klose, 2000). Les effets bactéricides de la bile guident donc *Vibrio cholerae* vers le mucus où elle va pouvoir exprimer tout son potentiel infectieux.

2.2.2.3 Direction la muqueuse intestinale

La muqueuse de l'intestin grêle où *Vibrio cholerae* exprime sa virulence est composée d'entérocytes qui sont polarisés, absorbants, organisés en microvillosités et sécrétant la mucine (McGuckin, Lindén, Sutton, & Florin, 2011). *Vibrio cholerae* colonise préférentiellement l'intestin grêle distal, cette sélection est permise par le chimiotactisme (Butler & Camilli, 2004), (Butler & Camilli, 2005). En effet, des mutants encore mobiles mais n'ayant plus leur capacité chimiotactique colonisent toute la longueur de l'intestin grêle. Alors que *Vibrio cholerae* était sous forme de biofilm dans la lumière intestinale, elle active la synthèse de son flagelle et devient donc mobile (Liu et al., 2008). En effet, les effets bénéfiques du biofilm sont transitoires mais la bactérie doit être mobile et donc dispersée pour pouvoir traverser la barrière de mucus et ainsi coloniser les entérocytes. Les mucines retrouvées dans le mucus stimulent la mobilité de *Vibrio cholerae* et inhibent la production des composants du biofilm, ce qui lui permet d'être un maximum mobile mais seulement au moment de la traversée du mucus (Conner et al., 2016). Les entérocytes sont protégées par le mucus ayant une couche interne bien fixée aux entérocytes et une couche externe, vers le lumen, plus lâche (Atuma, Strugala, Allen, & Holm, 2001). L'épaisseur de la couche de mucus varie tout au long du tractus intestinal et est une balance entre la sécrétion par les cellules et la dégradation par les enzymes intestinales. Le mucus est composé de mucines qui jouent le rôle de barrière physique visqueuse pour les cellules épithéliales contre les pathogènes.

Une fois au contact du mucus, *Vibrio cholerae* adhère aux mucines qui sont les glycoprotéines composant le mucus et responsables de sa viscosité (Yamamoto & Yokota, 1988). L'adhésion aux mucines est permise par la protéine de liaison à la chitine, GbpA (GlcNAc binding protein A), puisque les mucines, tout comme la chitine, sont composées de N-acétylglucosamine (NAG) (Robbe, Capon, Coddeville, & Michalski, 2004). L'attachement au mucus permet à *Vibrio cholerae* de se diviser et d'augmenter sa densité cellulaire. Ensuite, les bactéries vont pouvoir se déplacer à travers le mucus grâce à la production de mucinases qui vont dégrader les mucines et les liaisons entre la bactérie et les glycoprotéines. L'expression des mucinases est régulée par le régulateur du *Quorum Sensing*, HapR, montrant l'importance de l'augmentation de la densité cellulaire lors de l'adhésion au mucus (Silva, Pham, & Benitez, 2003). *Vibrio cholerae* possède donc des agents mucolytiques comme la N-acétyl-L-cystéine

(NAC) facilitant la colonisation intestinale de la bactérie et des mucinases dégradant les polysaccharides et les protéines des mucines (Millet et al., 2014), (Silva et al., 2003). L'une de ses mucinases est l'hémagglutinine protéase, Hap, codée par le gène *hapA* et exprimée seulement lors de la traversée du mucus puisque *hapA* est induit en présence de mucines (Jude, Martinez, Skorupski, & Taylor, 2009). Alors que Hap clive une grande variété de substrats dont les liaisons GbpA-NAG, *Vibrio cholerae* possède une autre mucinase, TagA, plus spécifique à la dégradation des glycoprotéines des mucines proches des entérocytes (Booth, Boesman-Finkelstein, & Finkelstein, 1983), (Szabady, Yanta, Halladin, Schofield, & Welch, 2011). TagA permet ainsi le rapprochement de la bactérie aux cellules et ainsi l'expression de ses facteurs de virulence induisant les symptômes cholériques. En effet, cette mucinase fait partie de l'îlot de pathogénicité de *Vibrio* (VPI) et est coréglée avec les facteurs de virulence dont le TCP et la toxine cholérique (TC).

2.2.2.4 *Vibrio cholerae* au contact des entérocytes

Une fois au contact des entérocytes, *Vibrio cholerae* s'attache de manière réversible aux cellules épithéliales par des adhésines non spécifiques, permettant à la bactérie de scanner son microenvironnement et de détecter l'endroit propice au site d'infection. Les adhésines non spécifiques sont la protéine de liaison à la chitine, GbpA, la molécule d'adhésion multivalente 7 (Mam7) ainsi que le flagelle et les pili (Kim, Jude, & Taylor, 2005), (Krachler, Ham, & Orth, 2011), (Attridge & Rowley, 1983). GbpA, tout comme elle facilite l'attachement aux surfaces chitineuses et au mucus, va lier le NAG des cellules épithéliales intestinales (Kim et al., 2005). Mam7 est un facteur d'adhésion de la membrane externe qui ne se lie pas à un récepteur en particulier mais établit des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides de cellules eucaryotes à *Vibrio cholerae* (Krachler et al., 2011). Le flagelle, grâce aux rotations du moteur, permet au pilus de type IV, MSHA (mannose-sensitive haemagglutinin), de se lier aux cellules et scanner la surface pour détecter le meilleur site d'infection. Puis lorsqu'il y aura un maximum d'interactions, l'attachement se fera de façon irréversible, la mobilité de *Vibrio cholerae* sera alors inhibée ce qui permettra l'induction des facteurs de virulence dont le premier est le TCP (Attridge & Rowley, 1983), (Utada et al., 2014), (Rhine & Taylor, 1994), (Jude & Taylor, 2011). Le TCP comme son nom l'indique est un pilus, de type IV, qui permet les interactions bactéries-bactéries et est essentiel pour la colonisation intestinale (Kim,

Lafferty, Sandoe, & Taylor, 2000), (Taylor, Miller, Furlong, & Mekalanos, 1987). Les bactéries se regroupent donc, en microcolonies clonales dans les cryptes et les axes des microvillosités et prolifèrent (Watnick, Fullner, & Kolter, 1999) (Millet et al., 2014), (Jude & Taylor, 2011). Ces microcolonies ne formeront pas de biofilm mature puisque les bactéries sont dans un milieu riche en bicarbonate et pauvre en bile, milieu connu pour inhiber la maturation des biofilms (Syed et al., 2009). Ainsi, les fortes concentrations en bicarbonate, l'expression du TCP, l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales et leur prolifération sous forme de microcolonies sont les conditions idéales pour l'expression des gènes de la toxine cholérique (TC) (Lee, Hava, Waldor, & Camilli, 1999). La toxine cholérique contient deux sous-unités : CtxA et CtxB, en pentamère, où CtxB va se lier au récepteur GM1, présent au pôle apical des cellules épithéliales et CtxA va être internalisée par endocytose (Holmgren, 1981). La toxine cholérique est codée par le bactériophage filamenteux CTX Φ dont le récepteur est le pilus corégulé avec la toxine, TCP (Waldor & Mekalanos, 1996). Ainsi, le récepteur gangliosidique GM1 est découvert grâce à l'action de la neuraminidase NanH qui clive deux groupes d'acide sialique de la surface des cellules épithéliales en acide N-acétylneuraminique (Holmgren, Lönnroth, Månsson, & Svennerholm, 1975), (Galen et al., 1992), (Almagro-Moreno & Boyd, 2009). Cette enzyme permet donc la libération d'un composé pouvant servir de source de carbone à *Vibrio cholerae* et de plus, permet la découverte du récepteur GM1 permettant ainsi la fixation de la CT. Après la fixation de la sous-unité CtxB, la portion A1 contenant l'activité enzymatique ADP-ribosylante de la sous-unité CtxA est internalisée dans le cytoplasme de la cellule hôte (Gill & Meren, 1978), (Holmgren, 1981), (Fishman, 1982). La sous-unité A1 catalyse le transfert de l'ADP-ribose du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sur le résidu arginine de la protéine acceptrice qui est la sous-unité de la protéine G alpha, relarguant alors des ions H⁺ et la nicotinamide (Gill, 1975), (Gill, Evans, & Evans, 1976), (Moss & Vaughan, 1977). La protéine G alpha régule l'activité de l'adénylate cyclase membranaire et son ADP-ribosylation lui fait perdre son activité d'hydrolyse du GTP en GDP+ Pi, la maintenant alors sous sa conformation active. Cette conformation induit l'activité constitutive de l'adénylate cyclase permettant ainsi l'augmentation du niveau intracellulaire de l'AMP cyclique (AMPc). L'adénylate cyclase se trouve au pôle basolatéral de la cellule épithéliale intestinale et catalyse donc la cyclisation de l'ATP en AMPc, un second messager cellulaire (Field, 1971), (Field, Fromm, al-Awqati, &

Greenough, 1972). Ce pool d'AMPC intracellulaire permet l'activation de la protéine kinase A cytosolique dont le rôle est la phosphorylation des canaux transmembranaires de chlore permettant ainsi la fuite d'ions chlore hors des cellules épithéliales intestinales. Cette fuite induit alors un déséquilibre osmotique qui va alors entraîner la fuite des ions sodium, potassium et bicarbonate ainsi que des molécules d'eau de la cellule dans la lumière intestinale. La résultante est alors les diarrhées profuses en eau de riz typiques des symptômes du choléra.

Alors que *Vibrio cholerae* exprime ses facteurs de virulence et induit les diarrhées aqueuses, les bactéries continuent leur croissance, faisant ainsi augmenter la densité cellulaire et diminuer les nutriments. Contrairement aux autres pathogènes, chez *Vibrio cholerae*, le *Quorum Sensing* inhibe la synthèse des facteurs de virulence et des biofilms mais induit plutôt la mobilité ce qui permet à la bactérie de sortir de l'hôte une fois une densité cellulaire importante atteinte (Zhu et al., 2002), (Silva & Benitez, 2016).

2.2.3 La sortie de l'hôte

Au cours de l'infection *Vibrio cholerae* prolifère faisant augmenter les molécules de signalisation du *Quorum Sensing* lui permettant alors d'apprécier la densité cellulaire. À haute densité cellulaire (HCD), l'expression des facteurs de virulence comme la TC mais aussi des composants du biofilm sont inhibés et la mobilité quant à elle est activée (Zhu et al., 2002). Ainsi, une partie de la population va se décrocher de la muqueuse intestinale, rejoindre le lumen grâce au chimiotactisme et à la synthèse du flagelle (Nielsen et al., 2006), (Nielsen et al., 2010). L'autre partie de la population va continuer à exprimer la toxine cholérique permettant alors par les diarrhées la sortie des autres bactéries. Le détachement est permis grâce à l'activation de la mucinase Hap, qui comme auparavant lors de la colonisation va dégrader les liaisons entre la protéine GbpA et le NAG (Wang, Ayala, Benitez, & Silva, 2012), (Jude et al., 2009). Les bactéries rentrent donc dans une phase bien précise du cycle d'infection qui les prépare à la sortie de l'hôte et l'entrée dans un nouvel environnement, la réponse échappatoire à la muqueuse (mucosal escape response). Cette phase est régulée par le facteur sigma alternatif de la phase stationnaire, RpoS, qui est un activateur du régulateur majeur du *Quorum Sensing* et des gènes de virulence : HapR (Nielsen et al., 2006). La réponse

échappatoire à la muqueuse n'est en aucun cas importante pour l'infection de l'hôte présent mais prépare les bactéries à passer dans un environnement qui n'est pas assurément riche en nutriments.

2.2.3.1 Les étapes tardives de l'infection et le passage à l'état hyperinfectieux

Lors des étapes tardives de l'infection, *Vibrio cholerae* se prépare à la dissémination dans l'environnement et donc l'entrée dans un nouvel environnement qui peut ne pas être propice à sa croissance. Les bactéries entrent dans un état physiologique et métabolique bien particulier qui permettra, une fois dans l'eau, le recyclage des acides aminés et l'utilisation de sources de carbone alternatives comme le succinate, la glycine et la chitine (Kamp, Patimalla-Dipali, Lazinski, Wallace-Gadsden, & Camilli, 2013), (Schild et al., 2007). En effet, par exemple, les chitinases sont induites alors que les bactéries sont encore dans l'hôte et que celui-ci ne possède pas de chitine, montrant donc la préparation de la bactérie au nouvel environnement aquatique, riche en chitine. Les bactéries vont aussi faire des réserves de glycogène sous forme de granules, retrouvées dans les selles des patients pauvres en nutriments et des réserves en phosphate inorganique nécessaire aux régulateurs majeurs des réponses au stress (Preiss & Romeo, 1994), (Bourassa & Camilli, 2009), (Jahid, Silva, & Benitez, 2006).

Les bactéries bien que mobiles, vont former des microcolonies hyperinfectieuses qui vont se retrouver dans les selles des patients et qui vont garder ce phénotype jusqu'à 5 heures après leur expulsion, même après dilution dans un milieu pauvre en nutriments (Conner et al., 2016). Cet état permet la dissémination efficace de *Vibrio cholerae* et une meilleure capacité infectieuse. De plus, les bactéries sous cet état continuent d'exprimer un composant essentiel au TCP, la sous-unité TcpA, qui leur permettra en cas de nouvelle infection une meilleure colonisation intestinale (Nielsen et al., 2010).

3. Les réponses de l'hôte face à l'infection de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae en infectant l'Homme doit faire face aux réponses immunitaires innée et adaptative de celui-ci mais aussi à la réponse du microbiote intestinal en place pour contre-carrer les infections du tractus digestif. Toutes ces réponses complètent les barrières

physiques, chimiques et biologiques du tractus digestif auxquelles la bactérie doit résister pour réussir son infection. Comme vu auparavant, l'acidité et le mucus sont des protections, en plus des mouvements péristaltiques du tractus digestif qui empêchent la colonisation et l'implantation des pathogènes entériques.

3.1 Les réponses immunitaires

L'Homme répond aux infections grâce aux cellules et molécules immunitaires capables de détourner les facteurs de virulence de leurs cibles, mais aussi capables de tuer les microorganismes envahisseurs. Le système immunitaire est aussi capable de mémoriser ces microorganismes envahisseurs pour lui permettre de répondre plus rapidement en cas d'une seconde infection. Ainsi l'Homme possède une réponse immunitaire ciblée contre *Vibrio cholerae* ce qui lui permet de répondre à sa colonisation et dans certains cas d'éviter l'infection.

La toxine cholérique est une entérotoxine qui induit des diarrhées non inflammatoires et qui est très immunogène (Navaneethan & Giannella, 2008). En effet, elle induit l'expression et la sécrétion d'immunoglobuline A (IgA) et d'immunoglobuline G (IgG) anti CtxB (Glass et al., 1985), (Harris et al., 2008). Les infections à *Vibrio cholerae* induisent aussi l'expression d'anticorps dirigés contre la sous-unité A du TCP, contre des protéines de la membrane externe et contre le LPS, connu pour être très immunogène chez les pathogènes (Neoh & Rowley, 1970), (Asaduzzaman et al., 2004). Les anticorps dirigés contre le LPS sont spécifiques à un sérotype de *Vibrio cholerae* et protègent donc l'hôte contre ce sérotype en particulier. Cette spécificité explique les grandes épidémies qui ont eu lieu lors de l'émergence du sérotype O139 pour lequel la population adulte n'avait pas encore été en contact et n'était donc pas immunologiquement protégée (Ramamurthy et al., 1993). En effet, une primo-infection permet l'immunisation de l'hôte et donc la protection pour les infections suivantes durant plus d'une année (Weil et al., 2009), (Harris et al., 2009). Il n'y a pas de dose seuil connue d'anticorps dans le sang qui permet la protection, certains individus peuvent n'avoir que très peu d'anticorps et pourtant être encore protégés. Les enfants sont, quant à eux, connus pour être plus susceptibles aux infections à *Vibrio cholerae* que les adultes du fait de la

moins longue exposition aux antigènes vibriocides (Harris et al., 2008), (Deen et al., 2008), (Leung, Chowdhury, Calderwood, Qadri, & Ryan, 2012).

Ainsi, en réponse à la colonisation intestinale de *Vibrio cholerae*, l'hôte augmente la sécrétion de molécules antibactériennes comme le lysozyme, la lactoferrine, l'oxyde nitrique, des peptides antimicrobiens de la famille des cathélicidines (LL-37) ou défensines, alpha ou bêta défensines humaines (lectines, HD-5 et 6 et H β D-1) (Qadri et al., 2002), (Rabbani et al., 2001), (Selsted & Ouellette, 2005) (Zhang & Gallo, 2016). Ces peptides antimicrobiens sont des molécules à large spectre d'action et sont stockés dans les cellules de Paneth qui en réponse aux signaux du microorganisme contaminant seront relargués dans la lumière intestinale. Ils seront donc présents au site d'infection et permettront, en plus de la sécrétion d'anticorps, d'ajouter une barrière protectrice supplémentaire à la couche de mucus (Meyer-Hoffert et al., 2008), (Bevins & Salzman, 2011). La phase initiale de l'infection à *Vibrio cholerae* est aussi signe du recrutement des neutrophiles et macrophages et de la production du facteur alpha de nécrose tumorale (TFN α ou tumor necrosis factor alpha) et d'interleukine 1 bêta (IL-1 β) (Qadri et al., 2004), (Shirin et al., 2011)

3.2 Les réponses du microbiote intestinal

Vibrio cholerae en colonisant et infectant le tractus digestif de l'Homme est au plus près du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal compte une importante collection de microorganismes, procaryotes et eucaryotes, très diversifiés qui forment une barrière clé contre les pathogènes entériques par compétition de la niche écologique, des nutriments mais aussi par sécrétion de molécules antimicrobiennes. La composition microbienne de cette communauté est un facteur clé dans l'établissement des infections intestinales (Midani et al., 2018). En effet, il est connu que la présence ou l'absence de certaines espèces ou certains genres bactériens sont une prédisposition aux infections à *Vibrio cholerae* ou à d'autres pathogènes entériques. De plus, à la suite d'épisodes diarrhéiques, le rétablissement du microbiote intestinal chez l'Homme adulte se déroule à l'instar de l'installation du microbiote chez l'enfant (Hsiao et al., 2014), (David et al., 2015). Ainsi, la structure microbienne altérée par le lessivage de l'infection persiste quelques semaines puis les communautés procaryotes et

eucaryotes recolonisant la niche sont dynamiques permettant alors une meilleure adaptation au nouvel environnement.

Le microbiote intestinal est implanté plus ou moins profondément dans le mucus et interagit de façon complexe avec les entérocytes, permettant en premier lieu l'éducation du système immunitaire puis permettant, ensuite le bon fonctionnement du système digestif et du système immunitaire intestinal (Guarner & Malagelada, 2003). Par exemple, le microbiote intestinal sécrète des acides gras à chaînes courtes toxiques pour la plupart des pathogènes et des peptides antimicrobiens (PAM) dont les activités sont connues pour inhiber la croissance ou la colonisation des pathogènes (Hentges, 1967). Les PAM d'origine bactérienne sont des bactériocines et microcines et ont des activités connues de régulation des communautés microbiennes dans le tractus digestif par régulation des gènes de virulence, de résistance et d'entrée en biofilm des bactéries (Romero, Traxler, López, & Kolter, 2011), (Zhang & Gallo, 2016). De manière générale, ils ciblent la paroi cellulaire et les processus de synthèse protéique mais *Vibrio cholerae* a développé de multiples mécanismes de résistance. Une description plus approfondie des PAM est présentée au point 7.2.

3.3 Les réponses de *Vibrio cholerae* face à l'immunité de son hôte

La résistance de *Vibrio cholerae* aux PAM d'origine bactérienne ou humaine passe par de multiples mécanismes dont la modification de la charge membranaire (Matson, Yoo, Hakansson, & DiRita, 2010), (Pestonjamasp, Huttner, & Gallo, 2001) (Destoumieux-Garzón, Duperthuy, Vanhove, Schmitt, & Wai, 2014). En effet, les PAM sont de petites molécules cationiques qui se lient à la membrane bactérienne anionique. Ainsi, en remodelant le lipide A du LPS par l'ajout de groupements tels que l'ajout d'une glycine, la membrane bactérienne est rendue moins anionique ce qui diminue les interactions entre la membrane et le PAM (Hankins, Madsen, Giles, Brodbelt, & Trent, 2012). *Vibrio cholerae* résiste donc à la LL-37, PAM d'origine humaine, et à la polymyxine B (PmB), PAM d'origine bactérienne, par acylation du lipide A. De plus, la résistance à la PmB passe aussi par une deuxième modification qui est l'ajout d'un groupement hydroxyl-acyl sur le lipide A (Hankins et al., 2011). Toutefois, lorsque les PAM arrivent à se lier à la membrane et à la déstabiliser, ils changent la conformation de la protéine U de la membrane externe (OmpU) (Mathur, Davis, &

Waldor, 2007). Ce changement induit la libération du facteur sigma E (σ^E), permettant sa liaison aux promoteurs et l'activation de l'expression des gènes de réponse au stress. Ces gènes coderont pour des protéines extra cytoplasmiques capables de maintenir l'architecture stable de la membrane. Un second mécanisme de résistance identifié fait appel aux vésicules de membrane externe des bactéries (OMV) qui se lient aux PAM grâce aux protéines Bap1 (*Biofilm-associated extracellular matrix protein*) et OmpT (Duperthuy et al., 2013). Les OMV peuvent être caractérisées comme des leurres pour les PAM, permettant donc leur dilution et laissant ainsi la membrane bactérienne libre des PAM (Destoumieux-Garzón et al., 2014). De plus, *Vibrio cholerae* induit la synthèse de protéases qui dégraderont les peptides ainsi que la synthèse de systèmes d'efflux permettant à la bactérie de faire sortir les PAM (Rompikuntal et al., 2015), (Bina et al., 2006).

La toxine cholérique est très immunogène et ses antigènes permettent la reconnaissance par des anticorps spécifiques de l'infection à *Vibrio cholerae*. Cependant, cette entérotoxine est très immunomodulatrice et neutralise l'immunité de l'hôte. Tout d'abord, en induisant la sécrétion des fluides, la toxine cholérique permet le nettoyage et la dilution de toutes les défenses : les diarrhées induisent la perte de la couche de mucus amenant avec elle les microorganismes du microbiote intestinal et perturbent donc la muqueuse intestinale, elles induisent aussi la dilution des anticorps et des PAM (Glenn, Francis, & Danielsen, 2009). De plus, la toxine cholérique est aussi capable de diminuer l'expression et la production de la LL-37 et H β D-1 et donc d'affaiblir les défenses innées de la muqueuse intestinale (Chakraborty et al., 2008).

Un autre facteur de virulence important dans la réponse de *Vibrio cholerae* aux effecteurs immunitaires de l'hôte est le Système de Sécrétion de Type VI (SST6). En effet, les protéines VgrG-1 et 2 (Valine glycine repeat protein G), qui sont des protéines structurales sécrétées du SST6, possèdent des activités cytotoxiques et permettent ainsi la résistance de la bactérie face aux macrophages recrutés au lieu d'infection (Pukatzki, Ma, Revel, Sturtevant, & Mekalanos, 2007). Les effecteurs antibactériens du SST6 ciblent le PG et les lipides membranaires et induisent la lyse bactérienne (Dong, Ho, Yoder-Himes, & Mekalanos, 2013). Le SST6 n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif, de ce fait *Vibrio cholerae* en exprimant les effecteurs du SST6, co-exprime les protéines immunitaires à ces effecteurs lui

permettant ainsi de ne pas être affectée par ses propres effecteurs (MacIntyre et al., 2010). Une description plus détaillée du SST6 sera présentée au point 6.

Tous ces mécanismes de résistance permettent la réussite de la colonisation intestinale de *Vibrio cholerae* et la continuité de son cycle de vie dans l'hôte. Ils sont ainsi caractérisés comme des facteurs de virulence de la bactérie participant donc à son établissement dans l'hôte humain.

4. Les facteurs de virulence de *Vibrio cholerae*

Les facteurs de virulence de *Vibrio cholerae* permettent la survie, la colonisation, la virulence et la dissémination dans l'hôte humain permettant alors la réussite infectieuse. Ces facteurs, en particulier ceux induisant les symptômes cholériques, ont la capacité d'induire les épidémies et les pandémies de choléra mais *Vibrio cholerae* possède aussi d'autres facteurs de virulence induisant des épidémies de gastro entériques. La régulation transcriptionnelle de ces facteurs répond aux modifications environnementales de la bactérie et permet ainsi, l'expression de la virulence et des autres effecteurs aux moments propices du cycle de vie de *Vibrio cholerae*.

4.1 Le *Quorum Sensing*

Le *Quorum Sensing* (QS) est le réseau de communication des bactéries passant par la production de molécules de signalisation appelées autoinducteurs. Ainsi, lorsque les autoinducteurs produits par les bactéries sont en haute concentration et s'accumulent, c'est le signal qu'elles se retrouvent en grand nombre dans le milieu (Miller & Bassler, 2001). Chez *Vibrio cholerae*, deux autoinducteurs, cholera-autoinducer 1 (CAI-1) et Autoinducer 2 (AI-2) et leurs récepteurs respectifs, CqsS et LuxPQ, transmettent le signal de densité cellulaire et permettent ainsi l'induction de la transcription du régulateur majeur du QS, *hapR* (Figure 2) (Miller, Skorupski, Lenz, Taylor, & Bassler, 2002), (Zhu et al., 2002), (Rutherford, van Kessel, Shao, & Bassler, 2011). Une fois synthétisé, HapR va affecter l'expression de plus de 70 gènes dont les principaux gènes de virulence de *Vibrio cholerae*; le *Quorum Sensing* peut ainsi être considéré comme un facteur de virulence à part entière.

Les autoinducteurs CAI-1 et AI-2 sont synthétisés par les enzymes CqsA et LuxS, respectivement, puis exportés à l'extérieur de la cellule (Miller et al., 2002), (Schauder, Shokat, Surette, & Bassler, 2001). Lorsque la densité cellulaire est basse (LCD), peu d'autoinducteurs se retrouvent dans le milieu extracellulaire, activant alors la cascade de phosphorylation des quatre histidines kinases (HK), CqsS, LuxPQ et CqsR et VpsS dont les senseurs n'ont pas encore été identifiés (Jung, Chapman, & Ng, 2015), (Miller et al., 2002), (Shikuma et al., 2009). Les HK vont phosphoryler LuxU qui va ensuite phosphoryler LuxO et activer à son tour l'expression des quatre petits ARNs Qrr1 à 4. Qrr1-4 déstabilisent la traduction de l'ARN messager (ARNm) de HapR mais induisent la traduction de la protéine AphA grâce à la chaperonne Hfq (Lenz et al., 2004). À l'inverse, lorsque la densité cellulaire est haute, les autoinducteurs se retrouvant en forte concentration dans le milieu extracellulaire viennent se fixer sur leurs senseurs, inhibant alors la phosphorylation de LuxO. De ce fait, Qrr1 à 4 ne sont pas produits, permettant alors la traduction de l'ARNm de HapR et mais inhibant celle de AphA. (Tsou, Cai, Liu, Zhu, & Kulkarni, 2009).

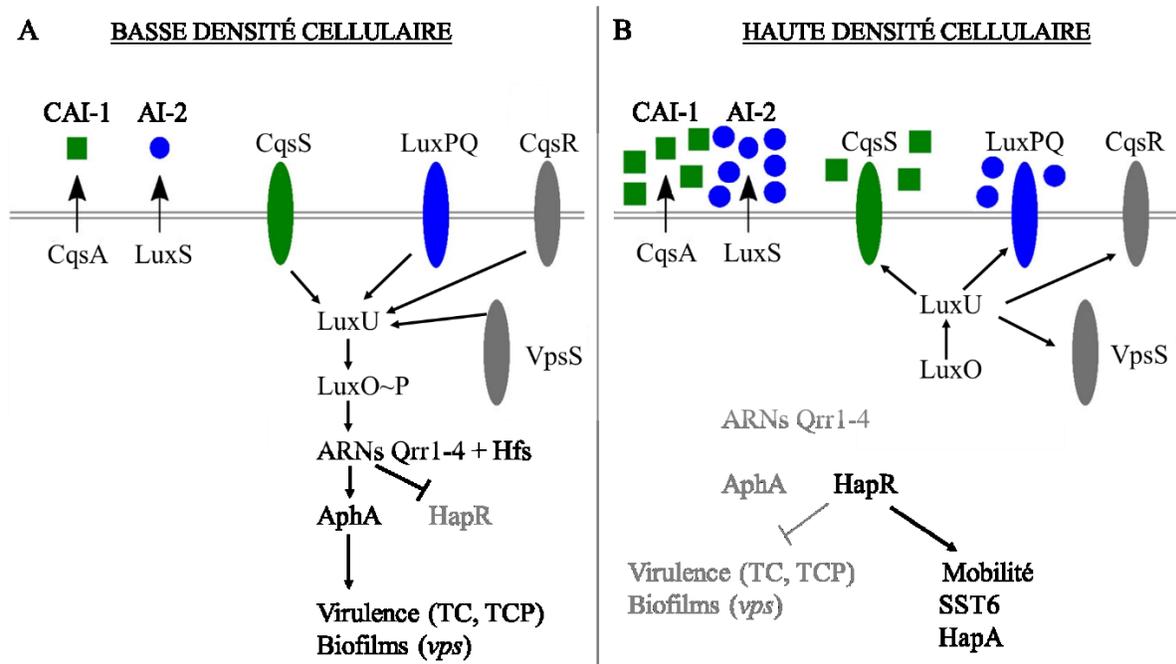


Figure 2. Régulation des principaux facteurs de virulence de *Vibrio cholerae* par le *Quorum Sensing*.

A) À basse densité cellulaire, le faible nombre d'autoinducteurs CAI-1 et AI-2 induit la phosphorylation de CqsS (CqsS~P) et LuxPQ (LuxPQ~P), respectivement. Par la suite, CqsS~P et LuxPQ~P vont phosphoryler LuxU, phosphorylant à son tour LuxO (LuxO~P). LuxO~P permet la transcription des petits ARN *Qrr1* à 4 qui en synergie avec la chaperonne *Hfs* induisent l'expression du gène *aphA* et inhibent la traduction de l'ARNm de *HapR*. *AphA*, à son tour induit l'expression des principaux gènes de virulence tels que les gènes *ctxA/B*, *tcp* et *vps*. B) À haute densité cellulaire, CAI-1 et AI-2 en forte concentration dans le milieu extracellulaire se fixent à leurs senseurs respectifs CqsS et LuxPQ ne permettant donc pas la phosphorylation de LuxO. Par l'absence des petits ARN *Qrr*, *HapR* peut être traduite alors que l'expression du gène *aphA* n'est pas activée. *HapR* inhibe l'expression des gènes *ctxA/B*, *tcp* et *vps* mais active l'expression des gènes de mobilité, de la mucinase *HapA* et du SST6. Figure inspirée de (Jemielita, Wingreen, & Bassler, 2018). Droits intégraux de reproduction Creative Commons.

4.2 La toxine cholérique et le pilus corégué avec la toxine

4.2.1 La toxine cholérique

La toxine cholérique (TC) est sans nul doute le facteur de virulence le plus étudié de *Vibrio cholerae* par son important potentiel virulent. En effet, les souches de *Vibrio cholerae* exprimant la toxine cholérique, et co-exprimant le pilus corégué avec la toxine (TCP), sont

capables de causer le choléra et ainsi une épidémie voire une pandémie. La toxine cholérique est une entérotoxine, sécrétée par le Système de Sécrétion de Type II (SST2), ADP-ribosylante et formée d'une sous-unité A liée à un pentamère de sous-unités B (Hirst, Sanchez, Kaper, Hardy, & Holmgren, 1984), (Kaper et al., 1995), (Jan Holmgren, 1981). Le pentamère de sous-unités B se lie au récepteur gangliosidique GM1 permettant ainsi la translocation de la portion N-terminale de la sous-unité A (peptide A1 N-terminal au 195^{ème} acide aminé) dans la cellule épithéliale intestinale (Gill et al., 1976). Le peptide A1 contient l'activité enzymatique ADP-ribosylante qui va alors induire l'activation constitutive de l'adénylate cyclase et ainsi provoquer les diarrhées en eau de riz typiques du choléra (Field, 1971). Les gènes codant pour les deux sous-unités de la toxine cholérique, *ctxA* et *ctxB*, tiennent leur origine du bactériophage lysogénique filamenteux CTX ϕ qui s'est intégré dans le génome de *Vibrio cholerae*, (Waldor & Mekalanos, 1996). Comme tout élément intégré, l'élément central CTX est entouré de régions répétées (RS1) exprimant un système de recombinaison site spécifique et permettant ainsi l'intégration chromosomique dans une séquence cible de 18 paires de bases appelée attRS1 (Mekalanos, 1983), (Pearson, Woods, Chiang, & Mekalanos, 1993). Le bactériophage CTX ϕ utilise le TCP comme récepteur bactérien pour infecter *Vibrio cholerae*, il a ainsi été suggéré que le bactériophage CTX ϕ s'est intégré après *tcp* qui tient aussi ces origines d'un bactériophage lysogénique (Faruque & Mekalanos, 2003). Les souches de *Vibrio cholerae*, co-exprimant ces deux facteurs de virulence ont un caractère virulent et épidémique (Faruque et al., 1998).

4.2.2 *Le pilus corégué avec la toxine*

Le pilus corégué avec la toxine (TCP) est un pilus de type IV essentiel pour la colonisation intestinale de l'hôte mais aussi pour la survie de la bactérie dans l'environnement aquatique (Taylor et al., 1987). Il permet en effet, l'adhérence des cellules et la formation de microcolonies durant le contact avec les entérocytes mais aussi lors du passage au stade hyperinfectieux lors de la sortie de l'hôte (Thelin & Taylor, 1996). Le pilus est organisé en faisceaux d'un homopolymère de la sous-unité TcpA, sous-unité majeure du TCP et dont le gène *tcpA* fait partie d'un large îlot de pathogénicité de *Vibrio cholerae* (VPI) (Shaw & Taylor, 1990), (Karaolis et al., 1998). VPI est un large regroupement des gènes du TCP (*tcpABQCRDSTEF*) organisés en opéron, où les gènes *tcpB*, *Q*, *C*, *R*, *D*, *S*, *T*, *E*, *F* codent pour

des produits participant à la biogénèse du pilus, formé avec la piline TcpA, en amont de l'opéron (Brown & Taylor, 1995). De plus, l'îlot comprend aussi les régulateurs transcriptionnels, *tcpP*, *tcpH*, le régulateur majeur de virulence *toxT*, mais aussi des gènes de facteurs de colonisations accessoires (*acf*) ainsi que d'autres gènes dont les fonctions sont inconnues. Tout comme les gènes de la toxine cholérique, VPI est issu d'un transfert horizontal de gène provenant d'un bactériophage lysogénique, VPI ϕ montrant que le récepteur d'un bactériophage (CTX ϕ) provient d'un autre bactériophage VPI ϕ et donc que la pathogénicité de *Vibrio cholerae* est dépendante de l'évolution des interactions entre les phages (Karaolis, Somara, Maneval, Johnson, & Kaper, 1999). VPI est retrouvé dans les souches virulentes mais aussi avirulentes de *Vibrio cholerae* mais aussi chez d'autres espèces du genre *Vibrio*, comme *Vibrio mimicus* (Boyd, Moyer, Shi, & Waldor, 2000). Cette conservation montre l'importance de l'îlot dans l'adaptation des souches et non pas seulement pour la virulence dans un hôte en particulier (Haley et al., 2012). En effet, certains facteurs de virulence, dont le TCP, sont exprimés dans un environnement sans infection à l'Homme montrant que leurs fonctions sont essentielles au développement des bactéries (Conner et al., 2016). Ainsi, un même facteur de virulence apporte un avantage dans un environnement en particulier mais cet avantage peut aussi être un bénéfice dans un autre environnement bien différent.

4.2.3 La régulation transcriptionnelle des gènes de la toxine cholérique et du TCP

La toxine cholérique et le pilus corégulé avec la toxine sont deux facteurs de virulence primordiaux dans l'établissement de la virulence de *Vibrio cholerae*. Ils sont donc régis par un réseau de régulateurs très complexe et influencé par les signaux environnementaux. En effet, la bactérie ne doit exprimer ses facteurs de virulence que lorsque l'environnement y est propice et qu'elle sera dans les conditions idéales pour réussir son infection. Ainsi, c'est seulement lors de la phase de contact avec les entérocytes, où les bactéries forment les microcolonies liées par le TCP, que *Vibrio cholerae* doit exprimer et synthétiser la toxine cholérique. De ce fait, la bile retrouvée dans la lumière intestinale inhibe la fixation de l'activateur transcriptionnel majeur de la virulence, ToxT, à ces domaines de régulation sur

l'ADN, alors que les concentrations importantes en bicarbonate proches des entérocytes augmentent la liaison de ToxT à l'ADN, permettant alors l'expression de la cascade de virulence (Figure 3) (DiRita, Parsot, Jander, & Mekalanos, 1991), (Matson et al., 2010a). *toxT* est présent sur l'îlot de pathogénicité VPI en aval de l'opéron des gènes TCP, dont *tcpA* (Brown & Taylor, 1995). Ainsi, l'expression du régulateur transcriptionnel *toxT* est directement régulée par les protéines transmembranaires TcpP et ToxR, ayant leurs extrémités N-terminales cytosoliques et C-terminales périplasmiques (Hase & Mekalanos, 1998), (DiRita et al., 1991). Ces protéines sont co-exprimées et associées, respectivement, aux protéines TcpH et ToxS protégeant les protéines transmembranaires et permettant ainsi la liaison au promoteur de *toxT*. Une fois exprimé et synthétisé, ToxT se lie directement aux promoteurs des gènes *tcpA* et *ctxA/B* en déplaçant donc l'inhibiteur transcriptionnel *Histone-like Nucleoid Structuring* (H-NS) qui empêchait jusque-là l'expression des gènes de virulence (Nye, D. Pfau, Skorupski, & K. Taylor, 2000). *toxT* étant aussi sur l'îlot VPI, il s'autorégule par l'activation du promoteur de l'opéron des gènes *tcp* (Brown & Taylor, 1995). La synthèse des protéines TcpP et TcpH est, quant à elle, régulée par le complexe de régulateurs transcriptionnels cytoplasmique AphA/B se liant directement au promoteur des gènes *tcpP* et *tcpH* présents sur VPI, en amont des gènes *tcp* (Skorupski & Taylor, 1999), (Kovacikova & Skorupski, 1999). À leur tour, les gènes *aphA/B* sont régulés par la densité cellulaire et donc le *Quorum Sensing* et leur expression est induite lors d'une basse densité cellulaire (Kovacikova & Skorupski, 2002) (Matson, Withey, & DiRita, 2007).

ToxT étant un régulateur majeur chez *Vibrio cholerae*, module l'expression d'autres facteurs de virulence, permettant à la bactérie la synchronisation des ces activités dans l'hôte et l'environnement aquatique (Klose, 2001).

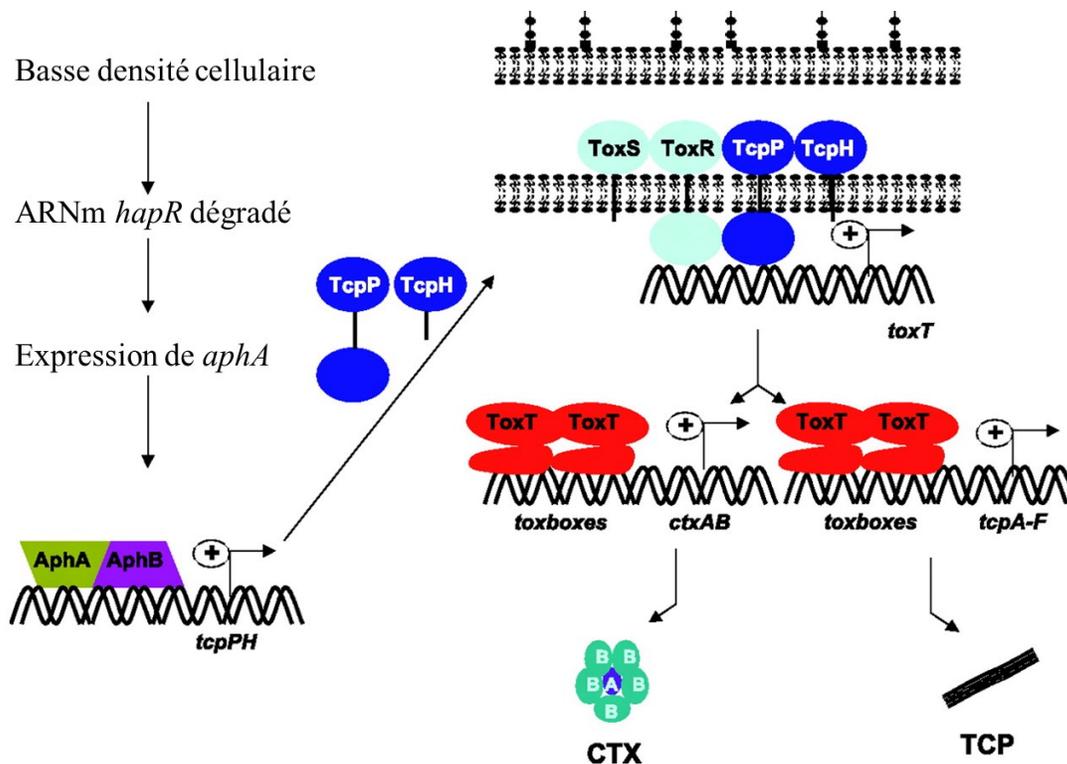


Figure 3. Voie de régulation de la toxine cholérique et du pilus corégué avec la toxine chez *Vibrio cholerae*.

L'activation est indiquée par des flèches et l'activation transcriptionnelle est indiquée par des flèches en angle droit avec le signe « + » sur les brins d'ADN représentés par les hélices noires (Matson et al., 2007). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par l'ASM.

4.3 La mobilité et les biofilms

4.3.1 La mobilité

Vibrio cholerae est une bactérie mobile, monotriche, dont le flagelle est doté d'un moteur à force motive à sodium (Kojima, Yamamoto, Kawagishi, & Homma, 1999). La mobilité permet la colonisation et la propagation de la bactérie dans la partie distale de l'intestin grêle, puis après l'établissement de la virulence, elle permet le retour de la bactérie dans la lumière intestinale et donc la sortie de l'hôte (Butler & Camilli, 2004). La mobilité est un phénotype complexe requérant la synthèse flagellaire, l'assemblage et l'activation du

moteur et le contrôle de la direction de la bactérie par le chimiotactisme (Silva & Benitez, 2016).

La mobilité est un facteur de virulence très important pour plusieurs microorganismes pathogènes dont *Vibrio cholerae* qui l'utilise pour une colonisation intestinale optimale (Guentzel & Berry, 1975), (Ottemann & Miller, 1997). La mobilité est aussi la première étape de la formation de biofilm où le flagelle et le chimiotactisme sont utilisés pour les interactions avec les surfaces permettant le premier attachement des bactéries et la formation des microcolonies (O'Toole, Kaplan, & Kolter, 2000).

4.3.2 Les biofilms et les microcolonies

Les biofilms sont des communautés microbiennes enveloppées dans une matrice extracellulaire, sous forme d'agrégats libres ou bien ancrées sur une surface abiotique, comme les coques des bateaux, ou un substrat biotique comme l'exosquelette de chitine des crustacées ou bien la muqueuse intestinale dans le cas de *Vibrio cholerae* (O'Toole et al., 2000), (Hall-Stoodley et al., 2004), (Munirul et al., 2006), (Shikuma & Hadfield, 2010). Le microenvironnement des biofilms matures est un milieu restreint en nutriments, où les cellules sont agglomérées et où l'élimination des déchets métaboliques toxiques est faible et se fait par diffusion (Moorthy & Watnick, 2005), (Silva & Benitez, 2016). Ce microenvironnement favorise l'entrée des cellules dans un stade stationnaire de croissance, où le besoin en nutriments est réduit et où la mobilité est inhibée. La formation de biofilms permet la résistance de *Vibrio cholerae* aux stress environnementaux comme les attaques des PAM de l'hôte et du microbiote intestinal, de la bile mais aussi le manque en nutriments rencontré dans l'eau (Hung, Zhu, Sturtevant, & Mekalanos, 2006), (Pardío Sedas, 2007). Il a été démontré que la résistance aux antimicrobiens est jusqu'à 1000 fois augmentée lorsque les bactéries sont organisées en biofilm en comparaison avec un état planctonique et que 75% des infections nécessitent la formation de biofilm (Musk & Hergenrother, 2006). Ainsi, les bactéries entrant dans l'hôte sous forme de biofilm seront plus résistantes aux barrières immunitaires leur permettant une meilleure infection par rapport aux bactéries planctoniques (Merrell, Butler, et al., 2002), (Butler & Camilli, 2004). De plus, la formation de biofilm permet une meilleure dissémination de *Vibrio cholerae* dans l'environnement aquatique ou une meilleure

transmission oro-fécale puisque les selles des patients contiennent des biofilms de *Vibrio cholerae*.

La formation de biofilm commence lors de l'interaction entre une surface et le flagelle qui permet la transmission de signaux environnementaux à la bactérie (O'Toole et al., 2000). À la suite de ces interactions, la bactérie va s'attacher à la surface grâce à deux types de pili, le pilus mannose-sensitive haemagglutinin type IV (MSHA), le TCP et dans certains environnements, un troisième type de pilus, le pilus régulé avec la chitine (ChiRP) (Watnick et al., 1999), (Reguera & Kolter, 2005), (Meibom, 2005). L'attachement va alors inhiber l'expression des gènes de la mobilité et donc induire l'immobilisation des cellules. C'est à ce moment-là que les bactéries forment une communauté fermée, appelées microcolonies jointes grâce au TCP. Une structuration 3D va alors se mettre en place du fait de la croissance bactérienne et la production de la matrice extracellulaire composée en premiers lieux d'exopolysaccharides (EPS) (Watnick, Lauriano, Klose, Croal, & Kolter, 2001), (Lauriano, Ghosh, Correa, & Klose, 2004). Chez *Vibrio cholerae* deux loci, *vpsI* et *vpsII* (*Vibrio* polysaccharides), codent pour des protéines permettant la formation des EPS. Les deux loci sont espacés d'un troisième cluster de six gènes *rbmA-F*, aussi impliqué dans la formation de biofilms. En amont du dernier gène de *vpsII* se trouve le gène codant pour la protéine Bap1 qui compose aussi la matrice extracellulaire (Yildiz & Schoolnik, 1999), (Fong & Yildiz, 2007). La protéine RbmA est exprimée à la surface des bactéries et permet de renforcer l'adhésion entre les cellules mais permet aussi le recrutement des bactéries encore dans un état planctonique permettant alors de faire grandir le biofilm (Berk et al., 2012), (Smith et al., 2015). Les protéines Bap1 et RbmC, qui sont sécrétées par le Système de Sécrétion de Type II (SST2), favorisent quant à elles, le développement du biofilm, l'adhérence des cellules à la surface et la formation d'une enveloppe flexible stabilisant le biofilm (Giglio, Fong, Yildiz, & Sondermann, 2013), (Absalon, Dellen, & Watnick, 2011), (Johnson et al., 2014). La matrice extracellulaire est aussi composée d'ADN extracellulaire qui contribue entre autres à la stabilité du biofilm mais qui est aussi utilisé comme source d'énergie puisque *Vibrio cholerae* exprime dans les biofilms des DNases (Seper et al., 2011).

Les microcolonies, importantes dans la pathogenèse de *Vibrio cholerae*, sont un état bien particulier, différent de celui des biofilms où la bactérie n'exprime pas les mêmes gènes.

En effet, les microcolonies ne se développeront jamais en biofilm mature puisque les gènes des clusters *vps* sont réprimés (Conner et al., 2016). Ceci permet notamment l'expression des gènes *ctxA/B* mais permet aussi la sécrétion de la toxine cholérique par le SST2 (Hirst et al., 1984).

4.3.3 La régulation transcriptionnelle des gènes de mobilité et de biofilm

Chez *Vibrio cholerae* la mobilité est inversement régulée avec les autres facteurs de virulence dont la toxine cholérique, le TCP et la formation de biofilm (Ottemann & Miller, 1997), (Syed et al., 2009). Les facteurs de virulence et la virulence de manière générale sont régulés par la densité cellulaire et donc le *Quorum Sensing* (Zhu et al., 2002). En effet, lorsque les bactéries sont proches des entérocytes, la mobilité est inhibée pour leur permettre de s'attacher aux cellules épithéliales et ainsi induire l'expression des gènes codant pour la toxine cholérique et le TCP. Puis, la densité cellulaire augmentant; les bactéries perçoivent les signaux qui vont leur permettre de rejoindre la lumière intestinale pour sortir de l'hôte. Elles vont alors à ce moment-là, grâce au *Quorum Sensing* et à l'expression du gène *hapR*, réactiver ses gènes de mobilité et arrêter la production des autres gènes de virulence. En effet, une fois synthétisé, HapR va induire les gènes de biosynthèse du flagelle et donc de la mobilité ainsi que le gène *hapA* codant pour la mucinase HapA permettant le détachement de la bactérie aux entérocytes (Jobling & Holmes, 1997). HapR va aussi inhiber les gènes de la toxine cholérique montrant bien que lorsque le QS de *Vibrio cholerae* est actif elle n'exprime plus ses gènes de virulence et donc que la virulence est réprimée à haute densité cellulaire.

La régulation transcriptionnelle des gènes du biofilm des loci *vpsI*, *vpsII*, *rbmA-F* et *bapI* passe effectivement par la régulation par le *Quorum Sensing* mais aussi par d'autres voies de régulations majeures chez *Vibrio cholerae* (Figure 4). La formation de biofilm est aussi sensible aux facteurs environnementaux comme la concentration en bile et bicarbonate dans le milieu. La formation de biofilm est aussi renforcée par l'induction des gènes *vps* par les concentrations intracellulaires de diGMPc, un messenger secondaire contrôlant les réponses de la bactérie aux conditions environnementales (Krasteva et al., 2010), (Srivastava, Harris, & Waters, 2011). Ainsi les acides biliaires augmentent le diGMPc intracellulaire qui va à son tour moduler le gène *vpsR* et induire la formation de biofilm. VpsR est un activateur des loci

vpsI-II et *rbmA-F* ainsi que des gènes du SST2 qui permettra la sécrétion des protéines Bap1 et RbmA et RbmC (Yildiz, Dolganov, & Schoolnik, 2001). VpsR va aussi induire le gène *aphA* contrôlant positivement *vpsT* et la boucle de contrôle des gènes *ctxA/B* et du TCP (Yang, Frey, Liu, Bishar, & Zhu, 2010), (Zamorano-Sánchez, Fong, Kilic, Erill, & Yildiz, 2015). AphA fait le lien entre l'expression des gènes de virulence et du biofilm. L'autre régulateur positif de la formation de biofilm est VpsT qui se lie avec le diGMPc et induisent les gènes du *cluster* *rbmA-F* (Casper-Lindley & Yildiz, 2004), (Srivastava et al., 2011). Les régulateurs négatifs de la formation de biofilm sont HapR qui inhibe l'expression des gènes de *vpsII*, H-NS qui se lie directement aux promoteurs des loci des gènes du biofilm et le complexe entre l'AMPc et la protéine réceptrice de l'AMPc (CRP) qui active l'expression de *hapR* par l'induction de la synthèse des autoinducteurs (Wang, Ayala, Silva, & Benitez, 2012), (Liang, Pascual-Montano, Silva, & Benitez, 2007), (Fong & Yildiz, 2008).

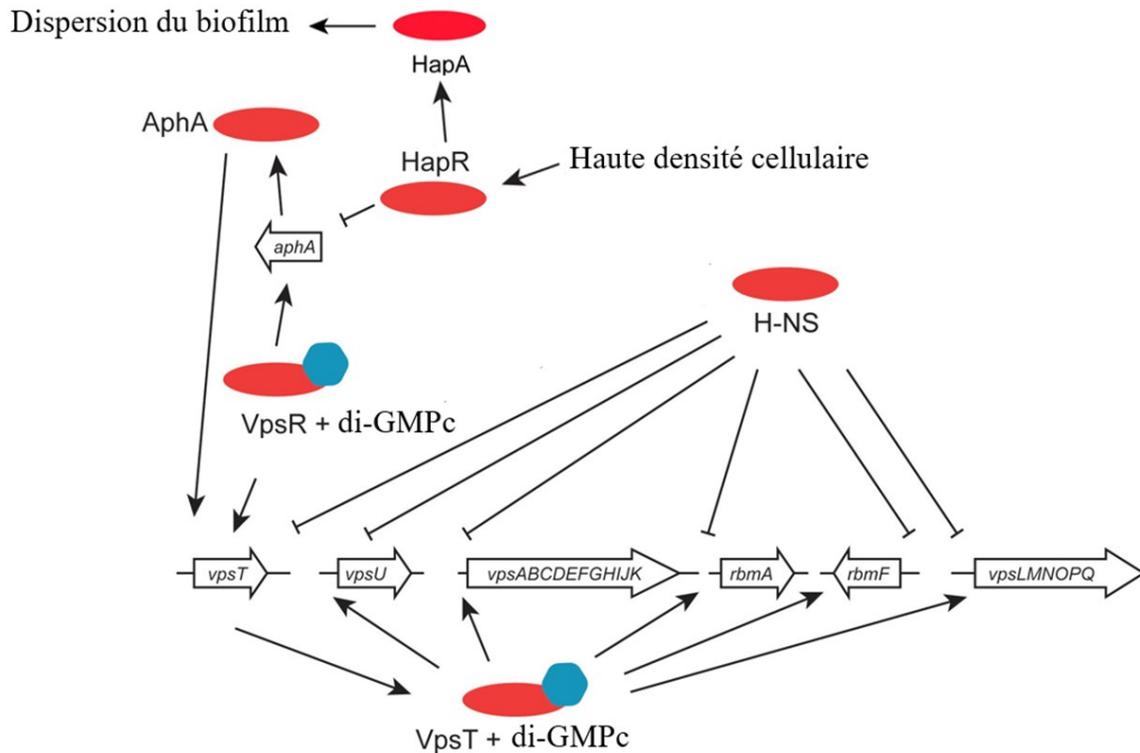


Figure 4. Voies de régulation de la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae*.

Les flèches représentent l'activation par les régulateurs et les lignes se terminant par les barres sont les inhibitions induites par les régulateurs. Figure adaptée de (Dorman & Dorman, 2018). Droits intégraux de reproduction Creative Commons.

4.4 Les Systèmes de Sécrétions

Les systèmes de sécrétion sont des facteurs de virulence grâce à leurs capacités à sécréter des toxines ou autres effecteurs qui permettent à la bactérie d'établir sa niche. De plus, ces systèmes permettent aussi l'échange d'ADN avec d'autres bactéries de l'environnement, faisant alors évoluer le génome bactérien vers une meilleure adaptabilité aux stress rencontrés (Costa et al., 2015). Ainsi, chez *Vibrio cholerae*, comme chez tous les autres pathogènes bactériens, il est aisé de considérer tous les systèmes de sécrétion comme participant à la virulence et ainsi à la réussite de l'infection. Cependant, les Systèmes de Sécrétion de Type II (SST6) et de Type VI (SST6) sont plus largement étudiés chez *Vibrio cholerae* du fait de leurs capacités respectives, à sécréter, entre autres, la toxine cholérique et

des effecteurs cytotoxiques et bactéricides (Reichow, Korotkov, Hol, & Gonen, 2010), (MacIntyre et al., 2010). L'ensemble des systèmes de sécrétions fait l'objet d'une section détaillée dans ce document (partie 5.).

4.5 Les autres facteurs de virulence

4.5.1 *Le LPS*

Les facteurs de virulence sont tous les facteurs impliqués de près ou de loin dans la virulence et la pathogénèse bactérienne. Dans le cas de *Vibrio cholerae*, le LPS et plus particulièrement l'antigène O sont considérés comme des facteurs de virulence puisqu'ils sont, tout d'abord, la base de la désignation des sérogroupes auxquels sont associés les caractères virulents et cholériques de la bactérie (Waldor, Colwell, & Mekalanos, 1994). De plus, le LPS joue le rôle de facteur d'adhésion dans la colonisation intestinale et la capsule retrouvée dans le séro groupe O139 serait aussi un facteur de virulence permettant la résistance à la phagocytose et la réussite de la colonisation intestinale (Alam, Miyoshi, Tomochika, & Shinoda, 1997), (Albert et al., 1999), (Nesper et al., 2002).

4.5.2 *Les porines*

Les porines de la membrane externe OmpU et OmpT sont des facteurs de virulence, régulés par les mêmes voies de régulation que les principaux facteurs de virulence (Provenzano & Klose, 2000). Elles permettent la résistance à l'acidité de l'estomac et aux autres facteurs antimicrobiens rencontrés dans la lumière intestinale lors de la colonisation mais aussi l'attachement à différentes surfaces biotiques et abiotiques participant ainsi à l'infectiosité de *Vibrio cholerae*.

4.5.3 *Les adhésines et les mucinases*

Les adhésines Mam7, GbpA et même le flagelle jouent un rôle clé dans la colonisation intestinale grâce à leurs adhésions aux cellules ainsi qu'aux mucines du mucus (Krachler et al., 2011), (Kirn et al., 2005). Elles permettent aussi grâce à des boucles de régulation l'induction d'autres facteurs de virulence dont la TC et le TCP.

Les mucinases HapA et TagA permettent la traversée du mucus par la bactérie, lors de la colonisation de la muqueuse intestinale mais aussi la traversée en sens inverse, pour

rejoindre la lumière intestinale (McGuckin et al., 2011), (Booth et al., 1983), (Szabady et al., 2011). Elles sont aussi régulées par les voies de régulation majeures des facteurs de virulence comme ToxR et aussi le *Quorum Sensing*. La mucinase HapA permet aussi le clivage RbMA produisant alors un substrat recrutant les bactéries planctoniques dans le biofilm (Smith et al., 2015). Elle joue donc de multiples rôles dans la virulence de *Vibrio cholerae*.

4.5.4 Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (S2C) sont des mécanismes permettant aux bactéries de capter des signaux environnementaux et d'en adapter leur réponse au stress. Ils sont composés d'un senseur kinase transmembranaire, captant donc les signaux, et d'un régulateur de réponse cytoplasmique qui, une fois phosphorylé par le senseur, induira ou inactivera l'expression des gènes de réponse aux stimuli environnementaux. Chez *Vibrio cholerae*, plusieurs facteurs de virulence sont régulés par des S2C dont le *Quorum Sensing*, régulé par CqsS et LuxPQ, la formation de biofilm régulée par VpsR et VpsT et le SST6 régulé par ChiS (Miller et al., 2002), (Yildiz et al., 2001), (Yildiz & Visick, 2009), (Meibom et al., 2004), (Kwon, Georgellis, Lynch, Boyd, & Lin, 2000). *Vibrio cholerae* possède bien d'autres systèmes à deux composants, eux aussi impliqués dans la virulence, comme le Système VprA/B, impliqué dans la résistance aux PAM cationiques, montrant que les S2C sont des régulateurs de facteurs de virulence et donc eux aussi des facteurs de virulence à part entière (Herrera et al., 2014). De plus, il existe aussi un S2C, PhoB/PhoR, qui régule les gènes de l'homéostasie du phosphate, élément essentiel à la bactérie et qui peut se retrouver limitant dans certains environnements (Pratt, Ismail, & Camilli, 2010), (Pratt, McDonough, & Camilli, 2009), (von Krüger et al., 2006). PhoR est le senseur de la concentration extracellulaire en phosphate inorganique (Pi), ainsi, lorsque le Pi est en basse concentration, PhoR phosphoryle PhoB qui va alors induire l'expression du gène de la porine PhoE faisant alors rentrer le Pi dans la cellule. De plus, lorsque PhoB/PhoR est activé, il inactive les gènes *vps*, ce qui permet d'inhiber la formation de biofilm pour permettre à la bactérie d'induire ses gènes de mobilité et donc de se rendre dans un environnement riche en Pi.

4.5.5 *Les sidérophores*

Le fer est un élément essentiel pour la bactérie rendant donc les systèmes d'acquisition du fer primordiaux pour la survie bactérienne. Les sidérophores sont des molécules ayant une très forte affinité pour le fer, sécrétées par les bactéries, et qui chélatent le fer extracellulaire. Pour récupérer le fer, la bactérie possède des transporteurs des complexes sidérophores-fer lui permettant ainsi d'assimiler le fer intracellulaire. *Vibrio cholerae* possède plusieurs mécanismes d'acquisition du fer mais a aussi la capacité de transporter et assimiler les sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes de son environnement lui permettant ainsi une économie non négligeable d'énergie (Wyckoff et al., 2007), (Wyckoff, Valle, Smith, & Payne, 1999).

4.5.6 *Le transfert horizontal de gènes*

La plupart des gènes de virulence de *Vibrio cholerae* ont été acquis par transfert horizontal de gènes (Faruque & Mekalanos, 2003). Ils sont, de ce fait, regroupés en larges îlots de virulence, montrant tous un CG% différent du reste du génome (Faruque et al., 1998). En effet, les éléments génétiques mobiles se distinguent du reste du génome par leurs présences associées aux séquences des ARNt, leurs CG% différents ainsi que par les séquences répétées à leurs extrémités (Hacker & Kaper, 2000). Ils peuvent provenir de plasmides, de transposons, d'autres bactéries ou encore de phages. Chez *Vibrio cholerae*, les principaux gènes de virulence ont été acquis de bactériophage, c'est donc pour cette raison que le transfert horizontal de gènes peut être considéré comme un élément participant à la virulence de la bactérie. De plus, lors de la croissance en biofilm, le transfert horizontal de gènes est un facteur clé à la survie bactérienne (Lutz et al., 2013). En effet, il permet, lorsque les bactéries sont rapprochées, de survivre aux différents stress environnementaux comme la prédation, grâce à l'acquisition de nouveaux gènes de résistance. Le gène H-NS, régulateur négatif majeur des gènes de virulence, a également été acquis par transfert horizontal de gènes, montrant bien l'importance de ce mécanisme dans la virulence de *Vibrio cholerae* (Dorman, 2007).

5. Les systèmes de sécrétion

Les pathogènes bactériens ont développé de multiples stratégies de survie, de croissance et d'adaptation leur permettant de répondre aux différentes conditions rencontrées dans leurs environnements. La sécrétion de molécules, protéines et ADN est essentielle à l'adaptation de la bactérie dans son milieu et est utilisée dans plusieurs processus de pathogénèse. Certains systèmes de sécrétion permettent de manipuler les réponses de l'hôte et ainsi induire l'établissement de la nouvelle niche de la bactérie (Green & Meccas, 2016), (Costa et al., 2015). Il existe chez les bactéries à Gram négatif huit systèmes de sécrétion I à VI, VIII et IX, utilisant différents procédés de transports des molécules à travers les membranes interne et externe (Figure 5) (Beeckman & Vanrompay, 2016), (Burdette, Leach, Wong, & Tullman-Ercek, 2018), (Lasica, Ksiazek, Madej, & Potempa, 2017). De plus, la sécrétion peut se dérouler en une seule étape, Systèmes de Sécrétion de Type I, III, IV et VI (SST1, 3, 4 et 6) ou deux étapes, SST2, 5, 8 et 9 où les molécules transloquées possèdent un peptide signal de destination au périplasma. Enfin, certains systèmes de sécrétion se distinguent aussi par leurs capacités à sécréter directement dans la cellule cible et ainsi pouvoir traverser un autre complexe membranaire. *Vibrio cholerae* possède le SST1, 2, 3, 5 et 6 et seront détaillés dans la suite de ce document.

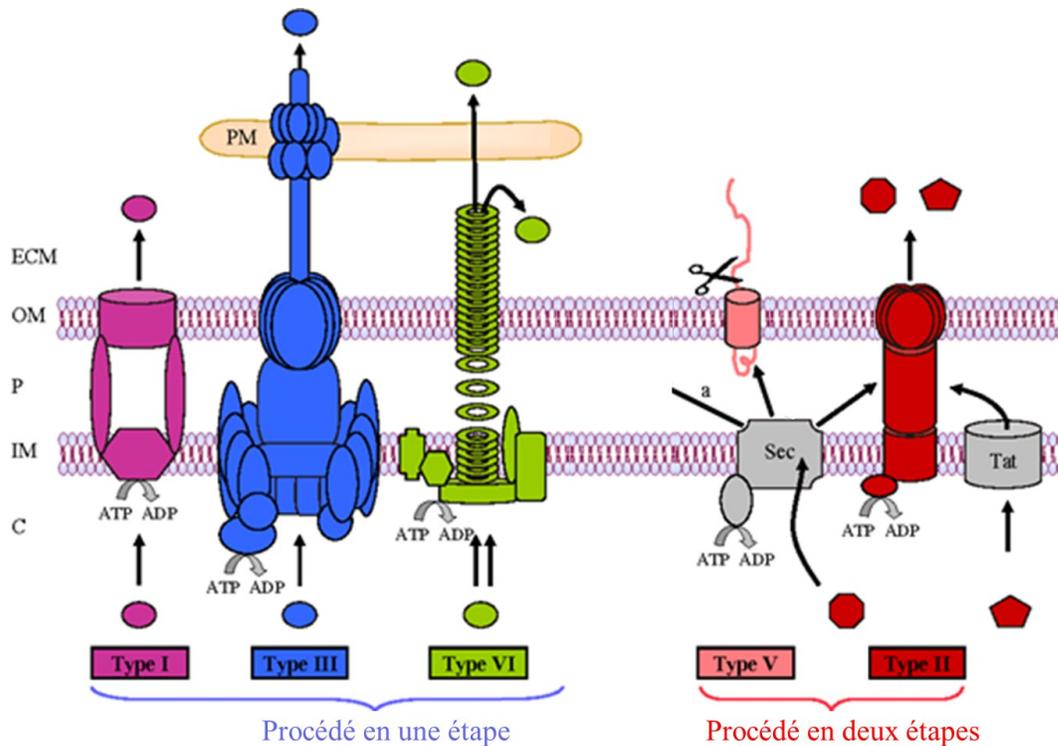


Figure 5. Structure des cinq Systèmes de Sécrétion retrouvés chez *Vibrio cholerae*.

Les systèmes sont ici classés selon le processus par lequel ils permettent la sécrétion des effecteurs dans le milieu extérieur. Ainsi, la sécrétion peut se faire en une seule étape (SST1,3 et 6) où les systèmes ont la capacité de transloquer directement les effecteurs du cytoplasme au milieu extérieur, ou bien en deux étapes (SST5 et 2) où la sécrétion par les systèmes ne commence que lorsque l'effecteur est amené dans le périplasma par les processus Sec ou Tat (Beeckman & Vanrompay, 2016). Droits libres de reproduction permis par Caister Academic Press.

5.1 La sécrétion en deux étapes

Le transport des protéines à travers la membrane interne en direction du périplasma est effectué par deux complexes, Sec (*general secretion*) et Tat (*twin arginin translocation*), qui sont deux voies de sécrétion protéiques très conservées chez tous les organismes vivants (archées, bactéries et eucaryotes) (Papanikou, Karamanou, & Economou, 2007), (Robinson & Bolhuis, 2004). Ces voies de sécrétion sont utilisées par les SST2 et SST5, où les protéines transloquées ont des signaux de transport. Le système Sec est composé d'une ATPase, moteur

du complexe protéique, d'une protéine chaperonne et enfin d'une peptidase qui clivera le peptide signal de translocation à la membrane interne. Ce peptide signal se présente en N-terminal de la protéine, il est composé de 20 acides aminés où trois régions se distinguent : la région N-terminale chargée positivement, le corps du peptide hydrophobe et enfin la région C-terminale polaire, liée au reste de la protéine (Papanikou et al., 2007). Le système Tat, à la différence du système Sec, transloque, tout d'abord, des protéines repliées rendant ce système spécifique aux protéines qui ne nécessitent pas de modifications post-traductionnelles, lesquelles ne pouvant pas avoir lieu dans le périplasma (Berks, Palmer, & Sargent, 2005). La voie de sécrétion Tat est composée d'un complexe de 2 protéines se liant au peptide signal de la forme S-R-R, en N-terminal de la protéine repliée, et d'une troisième protéine formant le canal transmembranaire (Müller, 2005). Une fois dans le périplasma, les protéines transloquées peuvent y rester ou bien être sécrétées par le SST2 ou le SST5, quel que soit le mécanisme de translocation qu'elles aient utilisé.

5.1.1 Le Système de Sécrétion de Type II

Le SST2 est très conservé chez les bactéries à Gram négatif et est considéré comme un mécanisme de virulence grâce à sa capacité à sécréter des toxines bactériennes. Chez *Vibrio cholerae*, le SST2 sécrète le facteur de virulence majeur de la bactérie, la toxine cholérique (Reichow et al., 2010). Bien que le complexe protéique traverse les membranes interne et externe, les molécules sécrétées doivent être transloquées dans le périplasma par les voies de sécrétion Sec ou Tat avant d'être externalisée par le SST2 dans le milieu environnant (Figure 5). Le SST2 est composé de 15 protéines formant quatre structures, dont le canal de la membrane externe, la plateforme de la membrane interne, l'ATPase cytoplasmique ainsi que le pseudopilus ancré dans la membrane interne (Korotkov, Gonen, & Hol, 2011). Le canal membranaire est constitué d'un dodécamère de sécrétine ayant une longue extrémité aminoterminal périplasmique, en contact avec les protéines de la plateforme de la membrane interne. La plateforme est composée de quatre protéines s'étendant jusqu'au périplasma pour se lier avec la sécrétine dont le rôle est essentiel pour la sécrétion par le SST2.

5.1.2 Le Système de Sécrétion de Type V

Le SST5 est un système particulier puisque les protéines se sécrètent elles-mêmes grâce à leur conformation naturelle. Ainsi, après avoir été transloquées par le système Sec, les protéines se trouvant dans le périplasma forment un feuillet- β qui s'intègre à la membrane externe en laissant alors sortir l'autre extrémité de la protéine (Figure 5) (Leyton, Rossiter, & Henderson, 2012). Le SST5 est un système autotransporteur impliquant des protéines possédant quatre domaines fonctionnels où l'extrémité carboxy-terminale forme un canal sur la membrane externe pour le passage du domaine translocateur qui une fois à l'extérieur de la cellule sera clivé par le domaine protéase de la protéine. L'extrémité N-terminale de l'autotransporteur est le peptide signal de translocation par le système Sec et sera clivé une fois arrivé dans le périplasma (van Ulsen, Rahman, Jong, Daleke-Schermerhorn, & Luirink, 2014).

5.2 La sécrétion en une seule étape

A contrario de la sécrétion en deux étapes, les systèmes de sécrétion de cette partie traversent les membranes interne et externe de la bactérie, où les effecteurs sont transloqués sur toute leur longueur. Dans cette section, deux types de systèmes sont étudiés, ceux ayant la possibilité d'injecter leurs effecteurs directement dans la cellule cible eucaryote ou procaryote ou bien ceux sécrétant dans le milieu extracellulaire.

5.2.1 Le Système de Sécrétion de Type I

Le SST1 est largement retrouvé chez les bactéries à Gram négatif, pathogènes de plantes ou d'animaux et participe donc à la virulence bactérienne, comme chez *Vibrio cholerae* qui sécrète des facteurs de virulence tels que la toxine MARTX (*multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin*) chez l'hôte humain à travers ce système de sécrétion (Green & Mecsas, 2016), (Dolores, Agarwal, Egerer, & Satchell, 2015). Le SST1 est aussi associé à la résistance aux antibiotiques puisqu'il a la capacité d'exporter ces molécules en dehors de la cellule (Symmons, Bokma, Koronakis, Hughes, & Koronakis, 2009). Le SST1 est composé de trois structures essentielles, dont un transporteur de type *ATP-Binding Cassette* (ABC) présent dans la membrane interne qui catalyse l'ATP permettant le passage de la molécule à exporter à

travers la protéine de fusion membranaire périplasmique qui fait un pont entre le transporteur ABC et le facteur de la membrane externe formant un pore et libérant ainsi la molécule dans le milieu extérieur (Figure 5) (Thomas, Holland, & Schmitt, 2014), (Lee et al., 2012), (Létoffé, Delepelaire, & Wandersman, 1996).

5.2.2 *Le système de Sécrétion de Type III*

Le SST3 permet l'injection directe dans la cellule cible d'effecteurs qui modulent la réponse de l'hôte et permettent la réussite de l'invasion et la colonisation bactérienne (Costa et al., 2015). C'est le système de sécrétion le plus étudié chez les bactéries dû à son pouvoir virulent et sa capacité à être acquis par transfert horizontal, permettant à des bactéries de différentes espèces ou même différents genres d'avoir le même SST3 (Troisfontaines & Cornelis, 2005). Le SST3 est composé d'une trentaine de protéines dont certaines sont très conservées et dont huit sont partagées avec les protéines d'assemblage du flagelle (Abrusci, McDowell, Lea, & Johnson, 2014). Le SST3 est décrit comme un injectisome formé d'une aiguille et est structuré en 3 parties dont un corps basal traversant les membranes interne et externe, l'aiguille et le translocon inséré dans la cellule hôte (Figure 5). Le corps basal est composé de 15 protéines cytoplasmiques assemblées en anneaux et permettant la formation d'une cavité centrale où à l'extrémité de la membrane externe émane l'aiguille permettant alors la traversée transmembranaire des effecteurs bactériens. L'aiguille est composée de sécrétines formant un noyau creux intérieur assez large pour permettre le passage de protéines non repliées et arrivant ainsi directement dans la cellule cible sous leurs conformations actives (Demers et al., 2014). L'aiguille est surmontée d'une pointe extérieure, importante pour la perception du contact avec la cellule cible et qui permet la régulation de la sécrétion des effecteurs bactériens (Picking et al., 2005). De plus, la pointe est aussi importante pour l'insertion du translocon dans la membrane de la cellule cible. Ainsi, une fois le contact établi, le translocon, qui forme un pore, s'assemble dans la membrane de la cellule cible et permet alors le passage des effecteurs et leurs injections (Holmström et al., 2001), (Håkansson et al., 1996). Chez *Vibrio cholerae*, le SST3 permet la colonisation intestinale grâce à la sécrétion d'effecteurs capables de réorganiser le cytosquelette d'actine des entérocytes (Tam, Serruto, Dziejman, Briher, & Mekalanos, 2007).

5.2.3 Le système de Sécrétion de Type VI

Le SST6 a été découvert chez *Vibrio cholerae* en 2006 par l'équipe de Mekalanos et al. (Pukatzki et al., 2006). Il est ubiquitaire et très conservé chez les bactéries à Gram négatif en jouant un rôle majeur dans les interactions bactériennes, la résistance aux prédateurs eucaryotes, contribuant ainsi à la survie chez l'hôte et la persistance dans l'environnement aquatique (MacIntyre et al., 2010). En effet, le SST6 permet la sécrétion de protéines effectrices aux activités cytotoxiques et bactéricides directement dans les cellules cibles telles que les macrophages humains, les amibes phagocytaires ainsi que les bactéries à Gram négatif (Pukatzki et al., 2007), (Zheng, Ho, & Mekalanos, 2011). L'avantage du SST6 est qu'il ne requière pas de récepteur pour la reconnaissance des cellules cibles, ainsi que pour la délivrance de ses effecteurs, permettant alors à *Vibrio cholerae* de ne posséder qu'un seul SST6 et de cibler plusieurs différents types cellulaires (Toska, Ho, & Mekalanos, 2018). Ce système sera détaillé dans la section suivante (partie 6.).

6. Le Système de Sécrétion de Type VI

6.1 Composition et assemblage du Système de Sécrétion de Type VI

Le SST6 est un complexe protéique de 13 sous-unités formant la base transmembranaire qui permet l'ancrage de l'appareil dans l'enveloppe cellulaire, la seringue surmontée d'une aiguille et d'une pointe protéique (Figure 5). La structuration du SST6 est apparentée à la queue du bactériophage T4 dont leur origine commune a été démontrée, confirmant l'importance du transfert horizontal de gènes chez *Vibrio cholerae* (Figure 6) (Pukatzki et al., 2007) (Leiman et al., 2009).

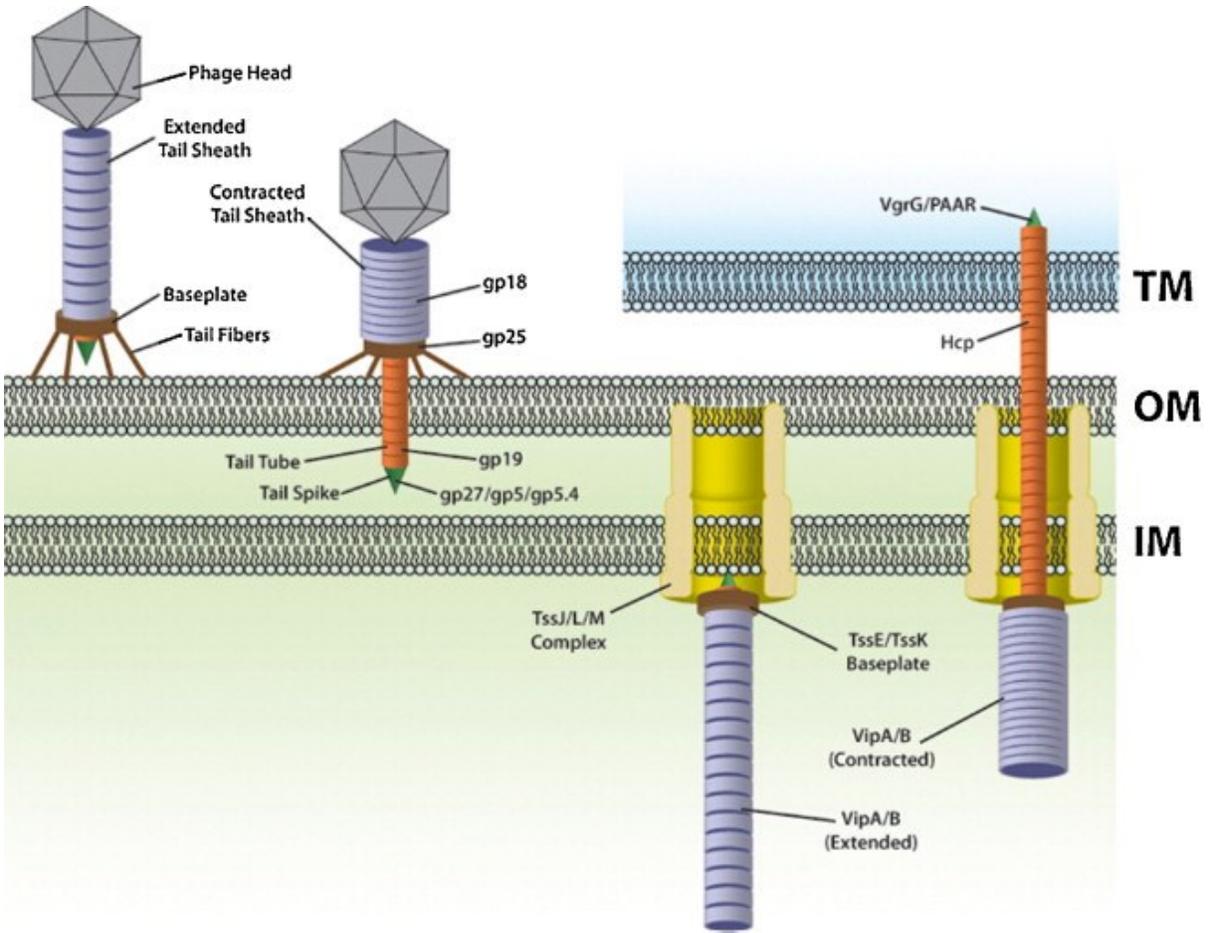


Figure 6. Analogie de structures entre le Système de Sécrétion de Type VI et la queue du bactériophage T4.

Tout comme la queue du bactériophage, le SST6 possède une aiguille moléculaire surmontée d'une pointe protéique qui permet la translocation et l'injection de l'ADN phagique dans un cas et des protéines et effecteurs bactériens dans l'autre cas. Les deux systèmes possèdent un complexe protéique de base qui s'ancre à la membrane et permet ainsi sa stabilité (Chen, Zou, She, & Wu, 2015). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par Elsevier, licence d'exploitation numéro 4621040021411.

Le SST6 est donc composé d'une base transmembranaire formée du complexe des trois protéines VasDFK qui traverse la membrane interne de la bactérie et supporte la formation du reste du système (Figures 6 et 7) (Joshi et al., 2017), (Brunet, Zoued, Boyer, Douzi, & Cascales, 2015). Ainsi lorsque la base transmembranaire est en place, elle permet le recrutement des protéines cytoplasmiques HsiF, VasABE et VgrG1-2et 3 formant alors le complexe de base et s'ancrant à son tour à la membrane interne (Zoued et al., 2016). Par la

suite, la pointe de la seringue, composée du trimère des protéines VgrG s'assemble, formant alors l'aiguille de la seringue et à laquelle vient s'ajouter les protéines au motif répété proline-alanine-alanine-arginine (PAAR) (Shneider et al., 2013). La formation de ces complexes protéiques, encore cytoplasmiques, permet le recrutement des protéines Hcp qui s'assemblent en hexamères et forment alors le tube interne du système, nommé la seringue du SST6, et entouré de la gaine des protéines VipA/VipB (Figure 7). Le SST6 est une structure hautement dynamique, de ce fait, par un signal encore inconnu, le tube polymérisé présent dans le cytoplasme va être transloqué et éjecté dans l'espace extracellulaire et dans la cellule cible par un rapide changement conformationnel de la gaine de VipA/B, qui va alors se contracter (Figure 8) (Nazarov et al., 2018), (Kudryashev et al., 2015), (Zoued et al., 2016), (Basler, Pilhofer, Henderson, Jensen, & Mekalanos, 2012). Lorsque la seringue est éjectée, elle permet alors l'injection dans les cellules cibles des effecteurs bactériens qui ont été recrutés et qui ont transités avec les protéines structurales du système telles que Hcp, VgrG et les protéines au motif PAAR (Silverman et al., 2013), (Hachani, Allsopp, Oduko, & Filloux, 2014), (Unterweger, Kostiuk, & Pukatzki, 2017). Une fois la sécrétion terminée, la gaine VipA/VipB est désassemblée et recyclée grâce à l'activation de l'ATPase ClpV, permettant alors une économie d'énergie pour *Vibrio cholerae* (Figure 7) (Kapitein et al., 2013), (Joshi et al., 2017).

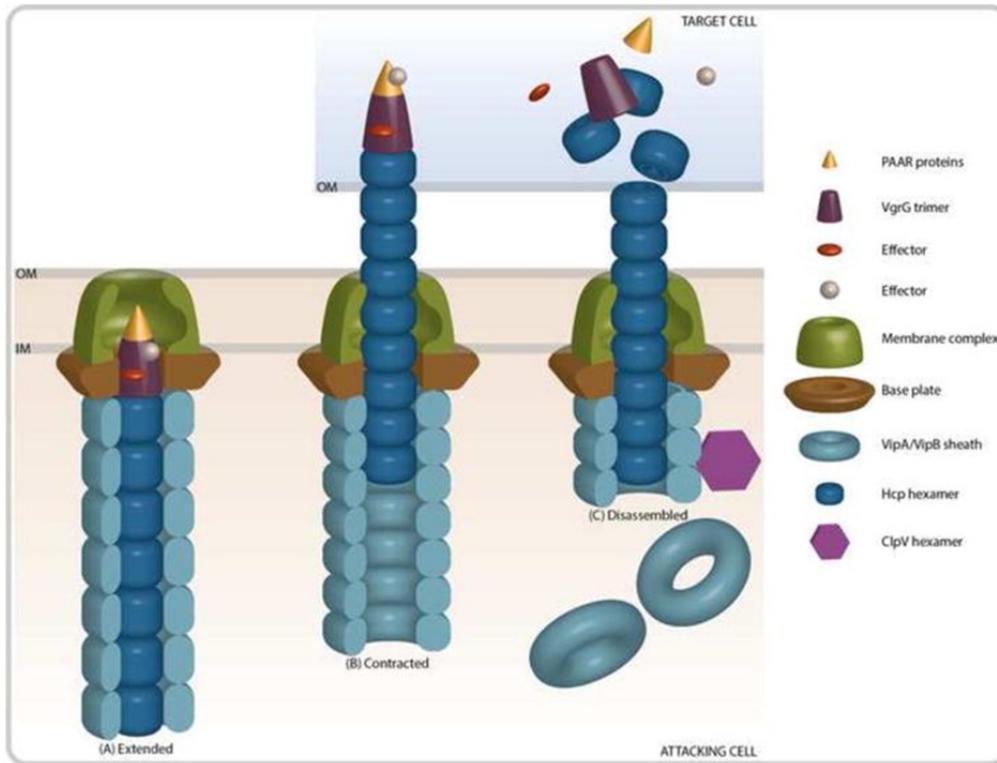


Figure 7. Formation protéique et dynamique du SST6.

A) La base transmembranaire, composée des protéines HsiF et VasABE, permet le recrutement et l'assemblage du complexe de base (VasDFK), ancrant le système à la membrane, de la gaine VipA/VipB, de la seringue formée des hexamères de protéines Hcp, de l'aiguille avec le trimère de VgrG-1-2-3 ainsi que de la pointe avec la protéine au motif PAAR. Les effecteurs sont alors recrutés grâce aux protéines composant le tube sécrétoire. B) Après l'assemblage du système, par un signal encore inconnu, la gaine se contracte permettant l'injection du tube et des effecteurs dans la cellule cible. C) Une fois la sécrétion et l'action des effecteurs structuraux et cargo réalisées, l'ATPase ClpV désassemble et recycle la gaine VipA/VipB (Joshi et al., 2017). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par Elsevier, licence d'exploitation numéro 4620950385832.

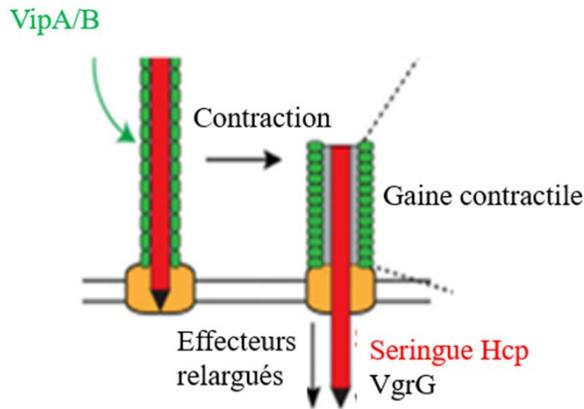


Figure 8. Contraction de la gaine VipA/VipB permettant la sortie de la seringue Hcp et de l'aiguille VgrG et ainsi l'injection des effecteurs bactériens.

Figure adaptée et modifiée de (Kudryashev et al., 2015). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par Elsevier, licence d'exploitation numéro 4621030682793.

6.2 Les effecteurs bactériens, leurs activités et leurs protéines immunitaires

À ce jour, les effecteurs identifiés du SST6 chez *Vibrio cholerae* sont au nombre de cinq et sont directement des composants structuraux du SST6 ou bien sont des effecteurs transloqués lors de la sécrétion (Joshi et al., 2017). Ces effecteurs ciblent tout aussi bien les bactéries à Gram négatif comme les bactéries du microbiote intestinal, en particulier lors de la colonisation, ou bien les cellules eucaryotes telles que les macrophages humains, l'amibe *Dictyostelium discoideum* ou encore les prédateurs environnementaux eucaryotes agissant ainsi comme facteurs de survie et persistance de la bactérie. Cependant, ces effecteurs ne sont actifs que lorsque *Vibrio cholerae* est en contact avec la cellule puisque le SST6 est défini comme est un facteur de virulence seulement contact dépendant avec sa cible et que ses effets ne sont observables que lorsque *Vibrio cholerae* est physiquement proche et au contact des cellules. En effet, MacIntyre et al., en 2010 ont démontré qu'au contact de la souche V52, non O1/nonO139, de *Vibrio cholerae*, la survie d'*Escherichia coli* était diminuée de 100 000 fois. Cependant, le surnageant de culture de V52 mis en culture avec *Escherichia coli* n'a aucune activité, montrant, ainsi, que la virulence par le SST6 est seulement contact dépendante.

Le trimère VgrG-1,-2,-3, en plus de participer à la structuration de l'aiguille, est impliqué dans la virulence de *Vibrio cholerae*, puisque VgrG-1 possède à son extrémité C-terminale le domaine ACD (*actin cross-linking domain*) qui, après endocytose de la bactérie par la cellule eucaryote, induira la formation d'oligomères d'actine toxiques pour la cellule, conduisant ainsi à la mort cellulaire et VgrG-3 est connue pour dégrader le peptidoglycane (PG) des bactéries à Gram négatif (Pukatzki et al., 2006), (Pukatzki et al., 2007), (Fu, Waldor, & Mekalanos, 2013), (Dutta et al., 2019). Les autres effecteurs du SST6 sont des protéines cargo, amenées avec les composants structuraux du nanotube. Ainsi, la protéine VasX, ciblant les cellules eucaryotes et les bactéries à Gram négatif, est connue pour perturber les membranes cellulaires et ainsi induire la lyse cellulaire (Miyata, Kitaoka, Brooks, McAuley, & Pukatzki, 2011), (Dong et al., 2013). La lipase TseL, qui cible aussi les membranes cellulaires et l'amidase TseH, qui cible le PG des bactéries à Gram négatif sont aussi des effecteurs du SST6 chez *Vibrio cholerae* (Brooks, Unterweger, Bachmann, Kostiuk, & Pukatzki, 2013), (Borenstein, Ringel, Basler, & Wingreen, 2015), (Miyata, Unterweger, Rudko, & Pukatzki, 2013), (Chou et al., 2012). Au vu de l'action des effecteurs sur les cellules cibles, il est aisé de comprendre que les bactéries à Gram positif, possédant une large couche de PG, sont protégées des activités bactéricides du SST6, qui même si ce système de sécrétion ne possède pas de récepteur sur ses cibles doit tout de même pouvoir implanter sa seringue protéique dans la membrane cellulaire. *Vibrio cholerae* étant aussi une bactérie à Gram négatif se protège de ses propres effecteurs grâce à des protéines immunitaires anti-effecteurs où les deux sont co-exprimées. Ainsi, seule la protéine VgrG-1, qui cible seulement les cellules eucaryotes n'a pas de protéine immunitaire mais la lipase TseL est co-exprimée avec sa protéine immunitaire TsiV1, VasX avec TsiV2, TseH avec TsiH et enfin VgrG-3 avec la protéine TsiV3 (Figure 9) (Joshi et al., 2017), (Wong et al., 2016), (Dong et al., 2013).

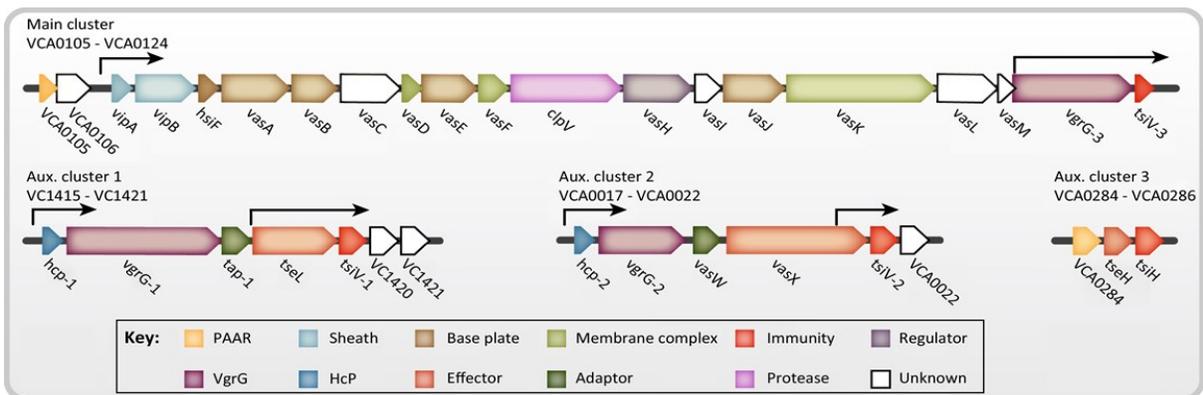
Le SST6 chez *Vibrio cholerae* est un facteur de virulence, permettant la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte grâce à ses capacités de lyse cellulaire, un facteur de persistance environnementale par résistance aux prédateurs aquatiques mais il est aussi un facteur de compétition inter- et intra-espèce et de ségrégation clonale grâce à ses capacités bactéricides contre les bactéries à Gram négatif. (MacIntyre et al., 2010), (Wong et al., 2016). En effet, lorsque le SST6 cible une bactérie, celle-ci peut coder et exprimer la protéine

immunitaire à l'effecteur sécrété, de ce fait la bactérie est protégée et les deux cellules sont compatibles dans un même environnement (Unterweger et al., 2014). Cependant, si la cellule cible ne code pas pour la protéine immunitaire à l'effecteur ou bien ne code pas pour la bonne protéine immunitaire, la cellule va être lysée. Les actions du SST6 ne sont pas dépendantes de l'espèce prédatrice, ainsi dans une même espèce bactérienne la diversité clonale est telle que le SST6 peut permettre de compétitionner contre des bactéries de même espèce mais dont les gènes des protéines immunitaires des effecteurs du SST6 n'induisent pas la résistance; ceci permet alors la ségrégation clonale et la régulation des communautés bactériennes même intra-espèce (Wong et al., 2016). Malgré la diversité des effecteurs du SST6, il existe tout de même une résistance mise en place par les bactéries à Gram négatif. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*, qui possède trois SST6 différents, est capable de sentir les SST6 exogènes et ainsi de contre-attaquer en exprimant et assemblant ses SST6, montrant un mécanisme de régulation bien particulier chez cette bactérie (Jobichen et al., 2010). Les espèces du genre *Bacteroides*, faisant partie du microbiote intestinal, ont un large répertoire de gènes de résistance contre les effecteurs du SST6 même si ces bactéries ne possèdent pas les effecteurs, montrant là aussi un mécanisme de régulation bien particulier (Hachani et al., 2014). Cependant, la meilleure résistance au SST6 reste l'éloignement physique des bactéries prédatrices. En effet, comme les actions du SST6 sont dépendantes du contact avec la cible, les bactéries planctoniques sont protégées du SST6 à la différence des bactéries en biofilm ou présentent sur une surface solide (MacIntyre et al., 2010), (Heckel, Tomlinson, Morton, Choi, & Fuqua, 2014). Cependant, *Vibrio cholerae* a développé un mécanisme de résistance contre les SST6 exogènes, basé sur l'éloignement physique même lorsqu'elle est sous l'état de biofilms. En effet, Toska et al., en 2018 ont montré que la production d'exopolysaccharides, ayant lieu lors de la formation de biofilm et coïncidant avec l'expression des gènes du SST6, protégeait la bactérie des SST6 exogènes sans empêcher l'action de son propre SST6. Les exopolysaccharides joueraient donc le rôle d'armure unidirectionnelle isolant la bactérie (Toska et al., 2018).

6.3 Organisation génétique du Système de Sécrétion de Type VI

Le génome de *Vibrio cholerae* est distribué en deux chromosomes circulaires, dont un gros chromosome I de 2.96 mégabases (Mb) et un plus petit chromosome II de 1.07 Mb et dont leurs réplifications sont indépendamment régulées (Trucksis, Michalski, Deng, & Kaper,

1998), (Heidelberg et al., 2000). Ainsi, les gènes du SST6 sont distribués en quatre *clusters* génomiques, repartis sur les deux chromosomes, dont un *cluster* principal (VCA0105-VCA0124) présent sur le chromosome II avec deux autres *clusters* auxiliaires (VCA0017-VCA0022 et VCA0284-VCA0286) et un quatrième *cluster*, auxiliaire, présent, quant à lui, sur le chromosome I (VC1415-VC1421) (Figure 9) (Joshi et al., 2017), (Pukatzki et al., 2006), (Altindis, Dong, Catalano, & Mekalanos, 2015), (Zheng et al., 2011).



Trends in Microbiology

Figure 9. Organisation génétique du Système de Sécrétion de Type VI de *Vibrio cholerae*.

Les gènes du SST6 sont répartis en quatre clusters dont un principal (VCA0105-VCA0124) présent sur le chromosome II et trois clusters auxiliaires dont un présent sur le chromosome I (VC1415-VC1421) et les deux autres sont sur le chromosome II (VCA0017-VCA0022 et VCA0284-VCA0286). Les gènes sont colorés selon leurs fonctions prédites et les flèches noires indiquent le site de début de transcription (Joshi et al., 2017). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par Elsevier, licence d'exploitation numéro 4620950385832.

Le *cluster* principal code pour la majorité des gènes structuraux du SST6, dont la protéine au motif PAAR, la gaine VipA/VipB, les protéines du complexe transmembranaire, l'ATPase ClpV, ainsi que VgrG-3 et sa protéine immunitaire TsiV-3. Cependant, les autres composants du tube du SST6, dont les protéines Hcp, VgrG-1 et -2 et l'autre protéine au motif PAAR, ainsi que les effecteurs cargo du SST6 et leurs protéines immunitaires sont codés par des gènes présents sur les trois autres *clusters* auxiliaires (Miyata et al., 2013), (Shneider et al.,

2013). Les protéines immunitaires sont directement en aval des effecteurs permettant ainsi à la bactérie de co-exprimer les deux protéines et de lui garantir sa protection. De plus, bien que chaque *cluster* de gènes du SST6 possède un promoteur en 5', un promoteur particulier pour chaque protéine immunitaire a été identifié. Ceci permet à la bactérie, par une régulation encore inconnue, de pouvoir se défendre en tout temps et indépendamment de l'expression de son propre SST6 des effecteurs des SST6 d'autres bactéries (Miyata et al., 2013), (Metzger et al., 2016).

La protéine Hcp est codée par deux gènes, *hcp-1* (VC1415) et *hcp-2* (VCA0017), présents sur les chromosomes I et II, respectivement, et dont les séquences nucléiques diffèrent de seulement 13 paires de bases n'induisant pas de différence en acide aminé pour les protéines Hcp-1 et-2. Ainsi, une délétion d'un des deux gènes n'induirait pas la perte de la protéine Hcp, permettant ainsi la structuration et le fonctionnement normaux du SST6.

6.4 Régulation du Système de Sécrétion de Type VI

Toutes les souches de *Vibrio cholerae* possèdent les gènes du SST6 mais leurs régulations ne sont pas les mêmes, ainsi certaines souches expriment constitutivement le SST6 alors que d'autres ne l'expriment qu'en conditions particulières (Pukatzki et al., 2006), (Zheng, Shin, Cameron, & Mekalanos, 2010), (Bernardy, Turnsek, Wilson, Tarr, & Hammer, 2016). Les souches environnementales et non O1/non O139, comme la souche V52, expriment le SST6 de façon constitutive puisque celui-ci est l'un de leur facteur de virulence majeur et qu'il permet la persistance dans les environnements aquatiques. *A contrario*, les souches des sérotypes O1 et O139, causant les pandémies de choléra, possèdent une régulation plus contrôlée de ce facteur de virulence et n'expriment par exemple pas le SST6 en conditions générales de laboratoire, c'est à dire lorsque la bactérie est cultivée en milieu riche à 37°C (Ishikawa et al., 2009). L'induction du SST6 des sérotypes pandémiques se fera en culture dont l'osmolarité est importante ou à plus faible température (20-25°C), reproduisant les conditions environnementales marines et très probablement les conditions rencontrées dans l'intestin lors de la fuite des électrolytes. Ceci montre que la régulation du SST6 des souches pandémiques, tout comme la régulation des autres facteurs de virulence, est soumise aux facteurs environnementaux aquatiques et de l'hôte, comme l'osmolarité, la température, la

présence de chitine, de mucine et de bile ainsi que les concentrations en diGMPc et AMPc et la densité cellulaire.

6.4.1 Le Quorum Sensing

La communication bactérienne par le *Quorum Sensing* permet la modulation de l'expression des gènes de réponses aux stress environnementaux en fonction de la densité cellulaire et permet ainsi l'adaptation de la population de *Vibrio cholerae*. Le *Quorum Sensing*, en plus de réguler la formation de biofilm, l'expression des facteurs principaux de virulence et la compétence naturelle, module aussi la sécrétion par le SST6 (Figure 10) (Lo Scrudato & Blokesch, 2013), (Hammer & Bassler, 2003), (Zhu et al., 2002), (Hochhut et al., 2001), (Shao & Bassler, 2014). La régulation se fait par une cascade de phosphorylations qui, lorsque la densité cellulaire est basse, ne permet pas la traduction des ARN messagers (ARNm) du cluster principal du SST6 et de HapR. À l'inverse, lorsque la densité cellulaire est haute, la traduction des ARNm du cluster principal du SST6 et de HapR peut avoir lieu, permettant alors la synthèse des protéines du SST6 (Tsou et al., 2009). De plus, lors de l'activation des gènes du *cluster* principal, le gène *vasH* (VCA0117) est transcrit et la protéine VasH est un régulateur transcriptionnel du SST6, le premier régulateur à avoir été découvert (Pukatzki et al., 2006), (Bernard, Brunet, Gavioli, Llobès, & Cascales, 2011). En effet, VasH en se complexant avec le facteur sigma RpoN, permet la coordination de la transcription des gènes des *clusters* auxiliaires résultants en l'assemblage final du SST6 (Kitaoka, Miyata, Brooks, Unterweger, & Pukatzki, 2011), (Dong & Mekalanos, 2012), (Ishikawa et al., 2009). Ainsi, à la différence des autres facteurs de virulence de *Vibrio cholerae*, la sécrétion par le SST6 est induite par le *Quorum Sensing* et la haute densité cellulaire.

6.4.2 La chitine comme inducteur du SST6

Lors de son cycle de vie, *Vibrio cholerae* est souvent retrouvée associée avec des surfaces chitineuses comme l'exosquelette des mollusques marins. La bactérie a donc évolué de manière à trouver avantage de cette association, son métabolisme permet donc l'utilisation de la chitine comme source de carbone mais celle-ci permet aussi l'induction de facteurs de virulence et de persistance environnementale comme l'entrée en biofilm mais aussi l'induction de la compétence naturelle responsable de l'évolution génomique des souches de *Vibrio*

cholerae (Meibom, 2005), (Meibom et al., 2004), (Lo Scudato, Borgeaud, & Blokesch, 2014). Ainsi, la croissance de la bactérie sur chitine induit la cascade de phosphorylations, débutant par ChiS, induisant alors la synthèse du régulateur TfoX qui active le régulateur CytR, impliqué dans la récupération nucléosidique permettant la transformation naturelle (Figure 10) (Watve, Thomas, & Hammer, 2015), (Antonova, Bernardy, & Hammer, 2012). TfoX active aussi le régulateur de la compétence naturelle, QstR, qui est aussi activé par HapR et donc par le *Quorum Sensing* (Lo Scudato & Blokesch, 2013), (Borgeaud et al., 2015). Puis TfoX et les régulateurs CytR et QstR activent la transcription des gènes du *cluster* principal du SST6, ce qui permet, grâce à la lyse bactérienne induite par le SST6, de récupérer l'ADN des bactéries incompatibles avec la souche de *Vibrio cholerae* participant ainsi à l'évolution et la diversité génomique de la bactérie.

6.4.3 Les autres échelles de régulation du SST6

Le SST6 a été trouvé comme étant actif chez l'hôte humain et permet ainsi, la virulence de *Vibrio cholerae* ainsi que la colonisation intestinale (Zheng et al., 2010), (Ma & Mekalanos, 2010), (Cheng, Ottemann, & Yildiz, 2015). En effet, la bile semble inhiber la sécrétion par le SST6 en inhibant la formation de l'aiguille et de la seringue. Les mucines sont quant à elles activatrices du SST6 permettant alors la compétition avec le microbiote intestinal qui se trouve attaché à la couche de mucus (Bachmann et al., 2015). Le microbiote intestinal permet à l'hôte de résister à la colonisation par les pathogènes en occupant la niche écologique, en limitant l'accès aux nutriments et en produisant des composés inhibiteurs des pathogènes comme les peptides antimicrobiens (Buffie & Pamer, 2013), (Romero et al., 2011). Cependant, *Vibrio cholerae* a évolué pour permettre sa résistance aux attaques du microbiote intestinal et même de les surpasser en induisant la sécrétion des effecteurs par le SST6 dont la protéine VgrG-3 qui en dégradant le PG, lysera les bactéries du microbiote (Fu et al., 2013), (Cheng et al., 2015).

L'osmolarité et la température sont des signaux environnementaux modulant l'activation du SST6 (Figure 10) (Ishikawa et al., 2012). En effet, en conditions de faible osmolarité, le régulateur, OscR, inhibe la transcription des gènes des *clusters* du SST6 alors qu'en conditions de forte osmolarité, comme retrouvées dans l'environnement aquatique de

Vibrio cholerae, le SST6 est actif, ce qui permet à la bactérie les échanges génétiques sur les surfaces chitineuses (Shikuma & Yildiz, 2009). De plus, le SST6 a aussi été retrouvé activé lorsque la température du milieu est entre 25 à 37°C, reproduisant aussi les conditions environnementales (Lipp et al., 2002), (Miller et al., 1984). Ainsi la protéine de choc thermique (CspV) inhibe la transcription des gènes du SST6 à basse température (15°C) et l'induit aux hautes températures (Townsend, Sison Mangus, Mehic, & Yildiz, 2016).

Le SST6 est aussi modulé par les taux d'AMPc et du complexe CRP-AMPc dans la cellule et donc par la présence de l'adénylate cyclase (CyaA) (Figure 10) (Ishikawa et al., 2009). En effet, le complexe CRP-AMPc est connu pour moduler plusieurs facteurs de virulence et ici induit, par une voie de régulation encore inconnue le SST6.

La présence messenger secondaire, diGMPc, régule négativement l'expression des clusters génomiques du SST6 en se liant à l'ARNm TfoY, homologue à TfoX (Figure 10) (Metzger et al., 2016). Ainsi, lorsque les taux intracellulaires de diGMPc diminuent, l'ARNm peut être traduit en protéine TfoY qui va ensuite induire les gènes du SST6.

L'inhibiteur général des facteurs de virulence chez *Vibrio cholerae* H-NS (ou TsrA), inhibe aussi la synthèse du SST6 mais la voie de régulation demeure à ce jour inconnue (Figure 10) (Zheng et al., 2010).

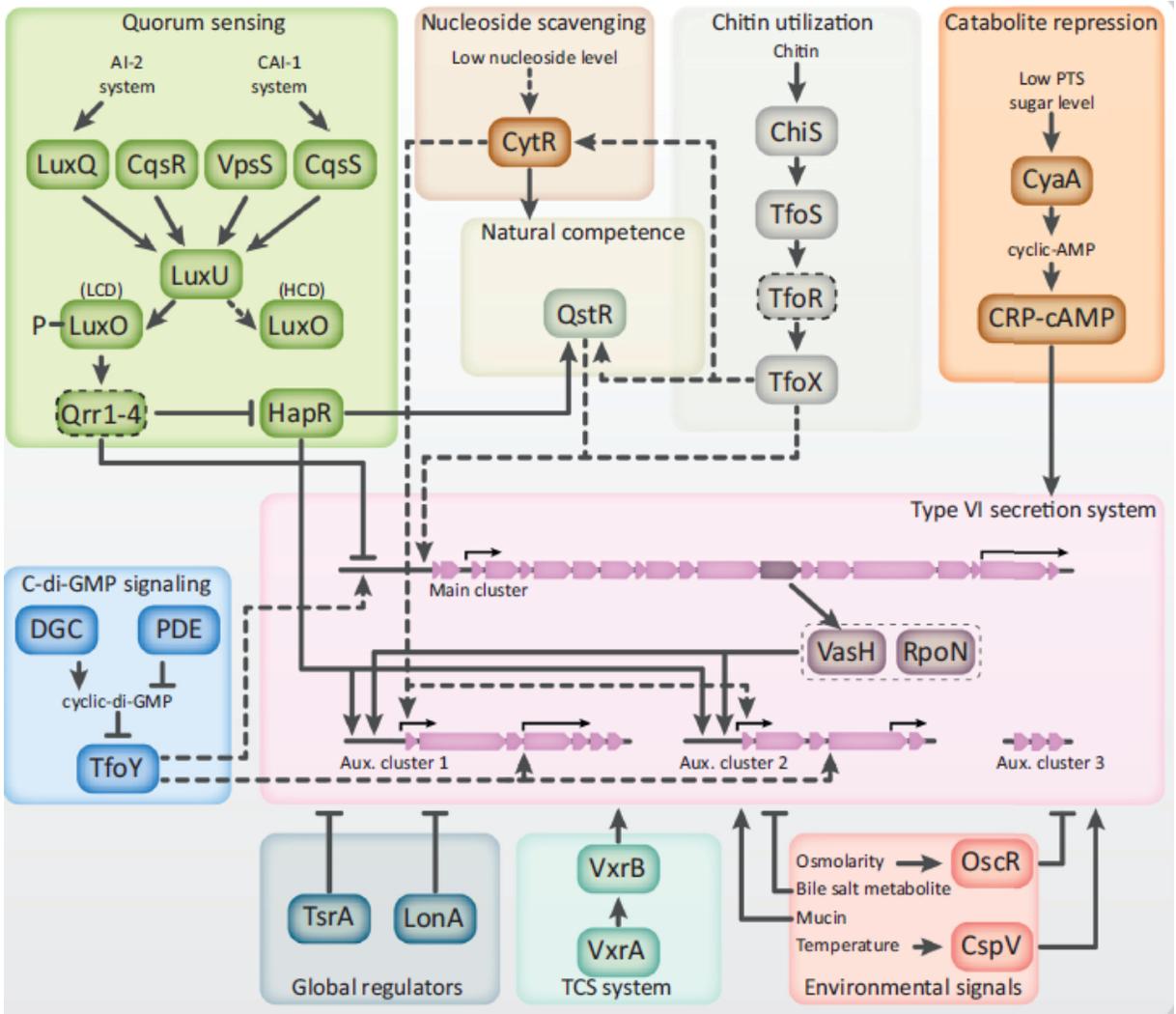


Figure 10. Voie de régulation du Système de Sécrétion de Type VI chez *Vibrio cholerae*.

Les flèches représentent l'activation alors que les lignes se terminant par des barres représentent l'inhibition. Les lignes pleines représentent une régulation dont les régulateurs se lient directement à leurs promoteurs et les lignes en pointillés et les lignes qui n'entrent pas dans le cadre du SST6 indiquent une régulation dont les mécanismes sont encore inconnus (Joshi et al., 2017). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par Elsevier, licence d'exploitation numéro 4620950385832.

7. Les antimicrobiens

Les antimicrobiens, de manière générale, sont toutes les molécules retrouvées dans la nature ayant des activités reconnues comme tuant ou inhibant la croissance des microorganismes. Ils ont diverses origines : naturels, synthétisés par les micro- et macro-organismes, dérivés de la nature ou chimiques. Cette partie s'intéressera particulièrement aux peptides antimicrobiens et aux antibiotiques, utilisés en médecine humaine et en lien avec le cycle de vie de *Vibrio cholerae*. En 1922, Alexander Fleming a découvert pour la première fois un peptide antimicrobien, le lysozyme, mais cette découverte a été éclipsée par la découverte en 1928 de la pénicilline dont les effets en médecine étaient révolutionnaires (Zhang & Gallo, 2016). Cependant, avec la montée en puissance des bactéries multi résistantes aux antibiotiques, l'intérêt se porte à nouveau sur les activités bactéricides des peptides antimicrobiens.

7.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques (ATB) sont des molécules du métabolisme secondaire des bactéries, produites lors de la phase stationnaire de croissance et dont la régulation de la production est dépendante du *Quorum Sensing* (Ruiz et al., 2010), (Horswill, Stoodley, Stewart, & Parsek, 2007). Dans la nature, les ATB ont pour rôle de tuer ou inhiber les compétiteurs des niches écologiques en contrôlant leur croissance ou en modulant leur métabolisme. Cependant, en médecine, les ATB sont utilisés à des concentrations actives beaucoup plus importantes que celles naturellement retrouvées dans l'environnement (Yim, Huimi Wang, & Davies FRS, 2007). De plus, par l'utilisation massive de ces molécules en agriculture, médecine et autres activités anthropiques, l'eau et les sols sont contaminés par les déchets encore actifs de ces activités et exercent sur les populations bactériennes des pressions sélectives conduisant à la génération de bactéries résistantes par contact constant avec de faibles doses en antibiotiques (Andersson & Hughes, 2014), (Gullberg et al., 2011). Les concentrations sous inhibitrices en ATB sont aussi reconnues comme ayant des activités de modulation de l'expression géniques sur les populations cibles, pouvant ainsi, induire ou inhiber la transcription, la traduction, le transport protéique, les réponses au stress et même les facteurs de virulence et le *Quorum Sensing* des bactéries (Romero et al., 2011). Ainsi, *Vibrio cholerae* étant une bactérie

largement environnementale aquatique peut se retrouver au contact de ces concentrations sous inhibitrices où les gènes de ses processus biologiques peuvent potentiellement être modulés. La présence de quantités importantes d'antibiotiques dans l'eau des rivières de certaines zones endémiques est probablement responsable de l'augmentation de l'incidence de la résistance aux antibiotiques observée chez *Vibrio cholerae* (Ahmad, Khan, Wahid, Ali, & Ahmad, 2013). De plus, *Vibrio cholerae* est aussi en contact avec les ATB lors du processus infectieux chez l'Homme. En effet, les traitements du choléra, en plus de la réhydratation par solutions aqueuses glycosylées et ionisées, peuvent se compléter d'un traitement à la tétracycline et aux quinolones permettent la réduction de la durée et de l'intensité des symptômes, réduisant donc la propagation des épidémies par réduction de la durée des symptômes (Towner, Pearson, Mhalu, & O'Grady, 1980). Cependant, ces traitements antibiotiques induisent l'émergence de souches résistantes et doivent donc se limiter aux cas très sévères de déshydratation (Garg et al., 2001).

7.1.1 Les grandes classes d'antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être bactéricides, qui tuent les bactéries, ou bien bactériostatiques, qui arrêtent la croissance de la bactérie tout au long de l'application du traitement et peuvent être à large spectre d'action et cibler tout autant les bactéries à Gram positif et négatif ou bien avoir un spectre d'action plus restreint et cibler seulement quelques espèces bactériennes particulières (Tableau I).

Tableau I. Les classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.

(Kapoor, Saigal, & Elongavan, 2017)

Mécanismes d'action	Classes	Exemples	Cibles thérapeutiques	
Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (bactéricide)	β -lactamines	Pénicillines Céphalosporines 1 ^{re} , 2 nd e et 3 ^{ème} génération Carbapénèmes	Bactéries à Gram+/-	
	Glycopeptides	Vancomycine		
Inhibiteurs de la synthèse protéique	Sous unité 30s	Aminoglycosides (bactéricides) Tétracyclines (bactériostatiques)	Streptomycine Tétracycline	Bactéries à Gram+/-
	Sous unité 50s (bactériostatiques)	Chloramphénicol Macrolides Oxazolidinones	Chloramphénicol Érythromycine Linézolide	
Inhibiteurs de la synthèse d'ADN (bactéricide)	Fluoroquinolones Métronidazole	Ciprofloxacine Métronidazole	Bactéries à Gram+/-	
Inhibiteurs de la synthèse d'ARN (bactéricide)	Rifampicine	Rifampicine	Bactéries à Gram+ et <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Inhibiteurs de la synthèse d'acide folique (bactériostatique)	Sulfamides	Sulfadiazine	Bactéries à Gram+/-	

7.2 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des petites molécules, ubiquitaires, produites tout aussi bien par les plantes, les invertébrés, les vertébrés et les bactéries (Zhang & Gallo, 2016). Les PAM sont des peptides d'environ 10 à 50 acides aminés, ayant des activités antivirales, antibactériennes antiparasitaires et antifongiques. Chez l'Homme, les PAM sont synthétisés par une multitude de types cellulaires, tels que les cellules épithéliales ou les cellules de l'immunité et sont des acteurs majeurs de l'immunité innée, qui peuvent être exprimés constitutivement ou en réponse à une infection (Destoumieux-Garzón et al., 2014). De plus, les bactéries des microbiotes intestinaux, pulmonaires, cutanés et autres produisent

aussi des PAM participant, ainsi, à la défense de l'Homme aux infections. Plus de 3000 PAM sont répertoriés dans la base de données des PAM (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) et plusieurs classification existent, où les PAM sont classés selon leurs origines, leurs charges, leurs conformations ou leurs cibles.

7.2.1 Les peptides antimicrobiens cationiques

En règle générale, les PAM sont cationiques, ce qui leur permet d'établir des liaisons électrostatiques avec les membranes bactériennes anioniques (Brogden, 2005). Les PAM cationiques (PAMc) sont sous divisés selon leurs conformations en trois classes : les peptides en hélice alpha, les peptides enrichis en proline ou arginine et les peptides avec des résidus cystéines établissant donc des ponts disulfures et des feuilletts *bêta* stables (Bechinger, Zasloff, & Opella, 1993), (Mehra et al., 2012). Il existe, cependant, des PAM non cationiques et donc anioniques ou neutres, participants à l'immunité innée des invertébrés, des plantes et des vertébrés mais dont l'activité est faible et dont le rôle est généralement l'amélioration de l'activité des PAMc par effet synergique (Vizioli & Salzet, 2002), (Harris, Dennison, & Phoenix, 2009). Ainsi, la liaison des PAMc aux membranes bactériennes induit la désorganisation membranaire, la formation de canaux transmembranaires conduisant à la lyse cellulaire et donc à la mort de la bactérie (Guilhelmelli et al., 2013). En effet, les PAMc sont généralement amphiphiles, ce qui leur confère la capacité de s'insérer directement dans la double couche lipidique membranaire ce qui forme un canal et par le recrutement d'autres PAMc induit la formation de pores de plus en plus importants permettant donc la fuite du contenu cellulaire dans le milieu extérieur (Ehrenstein & Lecar, 1977), (Breukink & de Kruijff, 1999). Les PAMc peuvent aussi former un tapis sur la surface de la bactérie et agir comme les détergents en déstabilisant la membranaire et induire la lyse cellulaire (Rotem & Mor, 2009), (Lohner, 2009). L'activité bactéricide des PAM peut aussi être intracellulaire grâce à la translocation des PAM dans le cytoplasme et se caractérise par l'inhibition de la transcription, de la traduction ou encore de la synthèse de la paroi cellulaire (Brogden, 2005). Les PAM ont aussi des propriétés immunomodulatrices, sans avoir pour autant d'activité antibactérienne, ils sont capables de réguler l'inflammation, moduler les cytokines, induire le stress oxydatif ou même encore induire la différenciation cellulaire et l'entrée en apoptose (Steinstraesser et al., 2011), (Kanduc et al., 2002).

7.2.2 *Les peptides antimicrobiens de l'épithélium intestinal humain rencontrés par *Vibrio cholerae**

Lors de la colonisation intestinale, *Vibrio cholerae* est en contact avec les peptides antimicrobiens des entérocytes et des cellules immunitaires retrouvées au niveau du tractus digestif. De plus, bien que *Vibrio cholerae* soit un pathogène extracellulaire, il est aussi intracellulaire facultatif dans les cellules phagocytaires et se retrouve donc en contact avec leurs molécules bactéricides où il résistera, comme vu précédemment, grâce à l'activité *cross-linking* du SST6 (Ma, McAuley, Pukatzki, & Mekalanos, 2009). La majorité de ces PAM sont aussi cationiques, parmi lesquels on retrouve les α - et β - défensines, les cathélicidines, la protéine bactéricide augmentant la perméabilité (BPI), ou encore les lectines de type C (Destoumieux-Garzón et al., 2014). Les concentrations en PAM tout le long du tractus digestif ne sont pas homogènes, les peptides sont concentrés au niveau des entérocytes grâce à la sécrétion par les cellules de Paneth, qui en sont la source majeure (Zhang & Gallo, 2016). Les α -défensines entériques humaines telles que HD-5 et HD-6 sont directement relarguées par les cellules de Paneth et par les neutrophiles dans la lumière intestinale de l'intestin grêle après une exposition aux bactéries ou à leurs antigènes mais leur expression reste constitutive dans ces cellules (Chu et al., 2012) (Zhang & Gallo, 2016). HD-5 a un effet direct sur les bactéries alors que HD-6 induit la formation de « filets » attrapant les bactéries et les empêchant donc d'atteindre les cellules épithéliales intestinales. Les α -défensines sont co-exprimées avec les lectines de type C telles que HIP/PAP et LPLUNC1 colocalisant même avec HD-5 au niveau des cryptes intestinales où se trouvent les cellules de Paneth (Gallo & Hooper, 2012), (Cash, Whitham, Behrendt, & Hooper, 2006), (Shin et al., 2011). LPLUNC1, tout comme BPI, ne possède pas d'activité antibactérienne en tant que tel mais se lie au LPS et inhibe la voie de signalisation du TLR4 en réponse au LPS O1 de *Vibrio cholerae*. Les cathélicidines, sont des PAMc en hélice alpha, majoritairement produites par les cellules de l'épithélium intestinal et les neutrophiles et donc leur cible cellulaire est la paroi bactérienne; LL-37 est le seul PAM humain de la famille des cathélicidines (De Smet & Contreras, 2005).

Vibrio cholerae est aussi en contact avec les PAM des bactéries du microbiote intestinal. En effet, les bactéries du microbiote intestinal sécrètent des molécules

antimicrobiennes, dont les peptides antimicrobiens, afin de réguler les communautés bactériennes et contre-carrer l'attaque des bactéries compétitrices (Romero et al., 2011). Plusieurs classifications et dénominations de peptides antimicrobiens bactériens existent et sont évolutives mais il est aisé de définir les bactériocines comme chef de file des PAM bactériens (Moll, Konings, & Driessen, 1999). Les bactériocines sont donc des petites molécules ribosomales pouvant être modifiées post-transcriptionnellement et qui ont une activité antimicrobienne ; la thuricine S produite par *Bacillus thuringiensis* est une bactériocine cationique active sur les bactéries à Gram positif (Chehimi, Pons, Sablé, Hajlaoui, & Limam, 2010). La lactocine 705 est une bactériocine qui est produite chez *Lactobacillus casei* et dont l'activité est de rendre la membrane de la cellule cible perméable, grâce à sa structuration secondaire en hélice α (Castellano, Raya, & Vignolo, 2003). La polymyxine B et la colistine (polymyxine E) sont aussi des bactériocines, utilisées en milieu hospitalier en dernier recours lors d'infection à bactéries multi-résistantes. Ces molécules agissent comme détergent pour les membranes et induisent la mort cellulaire (Zavascki, Goldani, Li, & Nation, 2007). Une grande place est aussi donnée aux microcines, PAM bactériens dont les cibles cellulaires semblent être cytoplasmique : inhibition de l'ARN polymérase par la microcine J25 et inhibition de l'aspartyl ARNt synthétase par analogie de structure (Semenova, Yuzenkova, Peduzzi, Rebuffat, & Severinov, 2005), (Piskunova, Maisonneuve, Germain, Gerdes, & Severinov, 2017).

Les peptides antimicrobiens bactériens, par leur sécrétion dans l'environnement et dans des organismes vivants, doivent être résistants aux protéases et aux conditions environnementales (Semenova et al., 2005). Ils sont, ainsi, connus pour être thermorésistants même à très hautes températures et pour résister aux protéases, grâce à leur structuration. En effet, Blond et al., 1999, ont montré que la microcine J25 ne perdait pas son activité même après avoir été autoclavée (121°C pendant 30 minutes à forte pression). Ainsi, *Vibrio cholerae* étant une bactérie environnementale et infectant l'intestin de l'Homme, a été au contact des PAM tout au long de son évolution et a donc développé des mécanismes de résistance à ces molécules antibactérienne.

7.3 Les mécanismes de résistance de *Vibrio cholerae* aux antimicrobiens

Les principaux mécanismes de résistance de *Vibrio cholerae* ont été, auparavant décrits dans ce rapport, en partie 3.3 faisant référence aux réponses de la bactérie aux attaques de l'hôte lors de la colonisation intestinale. En effet, *Vibrio cholerae* est capable de résister aux PAM de l'hôte et du microbiote intestinal grâce au remodelage de sa paroi cellulaire, limitant alors les interactions avec les molécules antimicrobiennes (Destoumieux-Garzón et al., 2014). En effet, grâce à l'ajout d'un groupement au lipide A du LPS par l'acyltransférase secondaire codée par le gène VC0212 les PAM tels que la PmB et la LL-37 ne peuvent plus se lier à la bactérie et n'ont, donc, plus d'effet sur le biotype El Tor de *Vibrio cholerae* (Matson, Yoo, Hakansson, & DiRita, 2010b), (Hankins et al., 2011). De plus, *Vibrio cholerae* possède les protéines AlmE, F et G qui ont des séquences analogues aux protéines de D-alanylation des acides téichoïques chez les bactéries à Gram positive et permettant alors la modification du lipide A et la résistance à la PmB (Hankins et al., 2012). Ainsi, le biotype Classique du séro groupe O1 chez *Vibrio cholerae* qui est connu comme étant largement plus sensible à la PmB que le biotype El Tor, possède une mutation non-sens dans le gène VC1578 conduisant alors à la synthèse de la protéine AlmF tronquée et donc à une résistance moindre à la PmB (Faruque et al., 1998), (Hankins et al., 2012). L'expression de l'opéron *alm* est régulé par le système à deux composants VprA/B, où VprB est l'histidine kinase phosphorylant le régulateur VprA (Herrera et al., 2014). Toutefois, lorsque les PAM arrivent à créer des dommages aux membranes, la bactérie en les détectant, peut activer ses gènes de réponses aux stress grâce à l'expression du facteur σ^E induite par le changement de conformation de la protéine de la membrane externe OmpU (Mathur et al., 2007). Les mécanismes de résistance de la bactérie passent aussi par le piégeage des PAM par les vésicules extracellulaires qui ont à leur surface des protéases, incluant PrtV, pouvant dégrader les PAM et des protéines permettant la liaison des PAM et ainsi diminuer leur concentration proche des bactéries (Rompikuntal et al., 2015), (Duperthuy et al., 2013). De plus ce mécanisme de résistance permet par l'exposition à un PAM, la résistance croisée à un autre PAM comme c'est le cas avec la PmB et la LL-37. La partie 3.3 faisait aussi référence aux capacités immunomodulatrices de la toxine cholérique par l'inhibition de la transcription de la LL-37 dans les entérocytes (Chakraborty et al., 2008). De plus, un mécanisme de résistance très

commun chez les bactéries et tout aussi bien efficace contre les PAM que les antibiotiques, les détergents et toutes autres molécules antibactériennes sont les systèmes d'efflux permettant le relargages des molécules en dehors de la cellule bactérienne (Paulsen, Brown, & Skurray, 1996).

Les systèmes d'efflux se divisent en deux groupes selon leurs sources d'énergie : l'hydrolyse de l'ATP pour les transporteurs de type ABC et la force protomotrice avec le passage transmembranaire des ions H^+ ou Na^{2+} pour les pompes telles que MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance*) et RND (*resistance-nodulation-cell division*). Chez *Vibrio cholerae*, le transporteur ABC est VcaM et permet l'export de plusieurs antibiotiques structurellement divergents. Les pompes MATE sont au nombre de six chez *Vibrio cholerae*, sont nommées VcmB, D, H, N, A et VcrM et permettent la résistance à plusieurs antibiotiques comme les fluoroquinolones et les aminoglycosides (Begum et al., 2005), (Huda et al., 2003). Concernant les transporteurs MFS, *Vibrio cholerae efflux systems*, ils permettent la résistance à la bile et au chloramphénicol (Colmer, Fralick, & Hamood, 1998). Les transporteurs RND sont des transporteurs importants chez les bactéries à Gram positif et plus particulièrement chez *Vibrio cholerae* puisqu'ils ne sont pas seulement des mécanismes de résistance aux antimicrobiens mais ce sont aussi des modulateurs de l'expression des gènes de virulence de la toxine cholérique et du TCP (Taylor, Bina, & Bina, 2012). Ils sont codés par six opérons : *vexAB*, *vexCD*, *vexEF*, *vexGH*, *vexIJK* et *vexLM* où *VexAB* est la pompe à efflux principale impliquée dans la résistance aux acides biliaires, aux antibiotiques, aux PAM comme la PmB et même aux détergents tels que le laurylsulfate de sodium (SDS) (Bina et al., 2006), (Bina, Provenzano, Nguyen, & Bina, 2008). *VexCD* permet l'efflux des acides biliaires, *VexGH* l'efflux d'antibiotiques tels que l'ampicilline et de détergents, tout comme *VexIJK*. Ce sont *VexEF* et *VexLM* qui ne sont pas requis pour l'export des molécules antimicrobiennes mais participent plutôt à la modulation des facteurs de virulence tels que la toxine cholérique et le TCP.

Un autre mécanisme de résistance des bactéries aux molécules antimicrobiennes est l'organisation en biofilms. En effet, ils permettent grâce à leur matrice extracellulaire un isolement, presque impénétrable, des antibiotiques, PAM et autres détergents où molécules bactéricides (Romero et al., 2011). De plus, par la forte concentration bactérienne, la

concentration appliquée en molécule antimicrobienne sur les biofilms atteignant les bactéries est diminuée et donc souvent insuffisante. Il est aussi connu que dans les biofilms, les bactéries acquièrent de nombreux gènes par transfert horizontal leur permettant aussi la résistance aux antibiotiques et PAM, notamment dans le cas de biofilms multi-espèces (Lipp et al., 2002). La résistance de *Vibrio cholerae* aux molécules antimicrobiennes par transfert horizontal de gènes est en effet permise dans les biofilms mais aussi lors de la colonisation intestinale où elle va échanger avec les bactéries commensales et dans son environnement aquatique riche en ADN libre, bactéries résistantes, et tous autres sources de gènes de résistance (Kitaoka, Miyata, Unterweger, & Pukatzki, 2011). De plus, *Vibrio cholerae*, comparée à *Escherichia coli* a la grande capacité d'acquérir des mutations spontanées lui permettant alors une meilleure résistance par évolution génique (Towner et al., 1980). Effectivement, les antibiotiques soumettent les populations bactériennes à des pressions évolutives importantes permettant la génération de mutations spontanées bénéfiques à la survie de la population au contact de ces molécules antimicrobiennes. Ainsi, il a été montré que les gènes *gyrA*, codant pour la sous-unité de l'ADN gyrase, et *parC*, codant pour la topoisomérase IV, ont été mutés permettant de diminuer l'affinité de l'antibiotique pour ces enzymes et donc protéger la bactérie aux effets de ces antibiotiques (Baranwal, Dey, Ramamurthy, Nair, & Kundu, 2002).

Ainsi, cette partie fait état des lieux des mécanismes de résistance mis en place par *Vibrio cholerae* contre les molécules antimicrobiennes si différentes les unes des autres. De ce fait, il est primordial de développer de nouvelles alternatives au traitement de la maladie et à la gestion de la virulence de la bactérie.

Problématique et objectifs

Les infections à *Vibrio cholerae* sont à ce jour un problème majeur de santé publique concernant plus d'un tiers des pays du monde. Le meilleur traitement du choléra reste la réhydratation et l'administration de sels permettant la compensation des pertes d'électrolytes et d'eau. Cependant, certains antibiotiques peuvent être donnés aux patients et réduisent la durée et l'intensité des symptômes mais sous peine de développer des résistances. La prévention du choléra passe par la vaccination de la population, où dans certains cas une dose rappel est nécessaire, rendant alors difficile les campagnes vaccinales dirigées par l'Organisation Mondiale de la Santé dans des pays où le suivi de la population n'est pas possible. Ainsi, par les grandes capacités de *Vibrio cholerae* à développer rapidement des résistances aux antibiotiques et les difficultés rencontrées lors des campagnes vaccinales, il est important de trouver des cibles alternatives de traitement du choléra.

Les peptides antimicrobiens (PAM) et plus généralement les antimicrobiens, sont connus pour moduler l'expression des gènes de virulence des pathogènes à des doses sous-létales. *Vibrio cholerae* dans l'environnement aquatique et lors de l'infection chez l'Homme est en permanence soumise à des doses variables en antimicrobiens modulant donc ses gènes de virulence. Ainsi, à défaut d'utiliser des doses bactéricides sur les bactéries lors de l'infection qui induisent une pression sélective sur la population bactérienne et génèrent donc la sélection de souches résistantes, l'idée serait d'utiliser des concentrations sous-létales en antimicrobiens afin de moduler l'expression des gènes de virulence ou moduler les cascades régulatrices de la virulence chez *Vibrio cholerae*. Lors de ce projet, nous nous intéresserons à la modulation d'un facteur de virulence spécifique chez *Vibrio cholerae* qui est le Système de Sécrétion de Type VI par des peptides antimicrobiens d'origine bactérienne pouvant être retrouvés dans l'intestin grêle humain et des antibiotiques pouvant être retrouvés dans l'environnement aquatique, à faibles concentrations. En effet, il a déjà été montré chez d'autres espèces bactériennes, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, que les antimicrobiens avaient la capacité d'induire le SST6 (Jones et al., 2013). L'étude portera donc sur (i) l'analyse comparative par spectrométrie de masse quantitative des protéines cytoplasmiques, périplasmiques, membranaires et sécrétées du SST6, en réponse à une exposition sous-létale en PAM d'origine

bactérienne, (ii) la confirmation de la modulation vue en spectrométrie de masse lors des traitements aux PAM et l'évaluation de la modulation de concentrations sous-létales en antibiotiques par Western blots dirigés contre différentes protéines du SST6, (iii) les activités bactéricides du SST6 de *Vibrio cholerae* traitée aux antimicrobiens par compétitions inter bactériennes avec *Escherichia coli*, et (iv) l'évaluation de la résistance aux antimicrobiens apportée par le SST6. En effet, il a déjà été montré chez *Burkholderia cenocepacia* que le SST6 avait la capacité d'apporter une résistance à la Polymyxine B (Rosales-Reyes et al., 2012). Ce rapport met donc en lumière les résultats de cette étude et propose de nouvelles perspectives quant à de nouveaux objectifs du projet et à la modulation du SST6 de *Vibrio cholerae* par les antimicrobiens.

Matériel et Méthodes

1. Souches, plasmides et conditions de culture

La souche utilisée lors de cette étude est la souche A1552 de *Vibrio cholerae*, séro groupe O1, biotype El Tor, sérotype Inaba, isolée à partir d'échantillons d'un patient ayant voyagé au Pérou en 1992 (Allué-Guardia, Echazarreta, Koenig, Klose, & Eppinger, 2018). Précédemment à l'étude, la souche A1552 a été manipulée génétiquement, le gène *lacZ* codant pour la *bêta*-galactosidase a été inséré chromosomiquement et le double mutant *hcp1-hcp2* (A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2*), ne codant donc plus pour les protéines Hcp1 et Hcp2 et n'ayant plus le Système de Sécrétion de Type VI fonctionnel, a été créé. Les deux souches A1552 « sauvage » (WT) et A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* sont spontanément résistantes à la rifampicine à 50 μ g/mL.

Pour les tests de compétitions inter bactériennes, la souche MC4100 d'*Escherichia coli* K-12 a été utilisée (Ferenci et al., 2009). Cette souche, fréquemment utilisée en laboratoires de recherches est résistante à la streptomycine à 50 μ g/mL et ne code ni pour les gènes de la *bêta*-galactosidase ni pour ceux de la GFP.

Lors de cette étude, le plasmide pKen2, codant pour les gènes de la GFP et portant les gènes de résistance à l'ampicilline ou carbénicilline (CB), a été transformé dans *Vibrio cholerae* A1552 WT et A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2*. Les souches pKen2 seront donc cultivées avec 100 μ g/mL de CB afin de maintenir la sélection du plasmide.

L'ensemble des bactéries utilisées dans cette étude, a été cultivé en erlenmeyer à 37°C sous agitation à 120 rotations par minute (RPM), en milieu Lysogeny Broth ou Luria-Bertani (LB), composé de 1% poids/volume (p/v) de tryptone, 0.5% p/v d'extrait de levure, 0.5% p/v de chlorure de sodium (NaCl) et additionné avec 1.2% d'agar (LBA) pour les cultures en milieu solide.

Lors des tests sur le Système de Sécrétion de Type VI, les deux souches de *Vibrio cholerae*, A1552 WT et A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2*, sont cultivées dans un milieu où la pression osmotique est élevée, conditions dans lesquelles le SST6 est actif et sécrète donc les effecteurs et autres protéines (Ishikawa et al., 2012). Ainsi, A1552 WT et A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* sont cultivées en LB à 2% NaCl, toujours en erlenmeyer à 37°C sous 120 RPM d'agitation lors des cultures

liquides et en LB à 2% NaCl et 1.2% d'agar (LBA 2% NaCl) en milieu solide. La sécrétion par le SST6 chez la souche A1552 s'activant avec le *Quorum Sensing* commence aux alentours de la Densité Optique à 600nm (DO_{600nm}) égale à 2 mais va cependant être vérifiée au cours de cette étude.

Lors de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), les bactéries sont cultivées dans un milieu pauvre en nutriments mais toujours en présence de 2% de NaCl pour continuer à activer le SST6. Ce milieu, Poor Broth (PB), est composé de 1% p/v de tryptone et 2% p/v NaCl et ne contient donc pas d'extrait de levure.

Les différentes souches sont conservées à -80°C et sont issues d'une culture de nuit (O/N) faite en LB et complétée avant le stockage avec 20% de glycérol.

2. Concentrations Minimales Inhibitrices et Concentrations de travail

Puisque l'étude porte sur les effets des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*, il est important de déterminer les bonnes concentrations de travail des différents antimicrobiens utilisées. Le tableau II résume tous les antibiotiques et peptides antimicrobiens utilisés dans cette étude, leurs origines et leurs cibles d'action. Nous avons choisi d'utiliser des PAM d'origine bactérienne, analogues à ceux produits par des bactéries du microbiote intestinal, tels que des microcines et thuricines (Garcia-Gutierrez, Mayer, Cotter, & Nabad, 2019). D'autres part, nous avons choisi d'inclure dans notre étude une lactocine, produite par *Lactobacillus casei*, puisque celle-ci est un ferment usuel de l'industrie alimentaire retrouvé en quantité significative dans le tractus digestif (Cuozzo, Sesma, Palacios, de Ruíz Holgado, & Raya, 2000). De plus, bien que peu de producteurs de polymyxines aient été identifiés dans le microbiote intestinal, nous avons choisi d'analyser la réponse de *V. cholerae* à la Polymyxine B comme PAM cationique communément utilisé.

Tableau II. Origines et cibles des antimicrobiens de l'étude.

		Origines	Cibles	Références
Peptides antimicrobiens	Microcine C7 (MC7)	Entérobactéries	Inhibition de l'aspartyl-ARNt synthétase par analogie de structure	(Piskunova, Maisonneuve, Germain, Gerdes, & Severinov, 2017), (Severinov, Semenova, Kazakov, Kazakov, & Gelfand, 2007)
	Lactocine 705 (Lact705)	<i>Lactobacillus casei</i>	Formation de pores membranaires	(Castellano, Raya, & Vignolo, 2003)
	Thuricine S (ThuS)	<i>Bacillus thuringiensis</i> sous sérotype <i>entomocidus</i>	Formation de pores, actif sur les bactéries à Gram positif et négatif	(Chehimi, Pons, Sablé, Hajlaoui, & Limam, 2010)
	Microcine J25 (MJ25)	<i>Escherichia coli</i> et d'autres bactéries intestinales à Gram négatif	Inhibition de la transcription en inhibant l'ARN polymérase	(Semenova, Yuzenkova, Peduzzi, Rebuffat, & Severinov, 2005)
	Polymyxine B (PmB)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Par son groupement hydrophobe, cible les membranes des bactéries à Gram négatif en s'y intercalant et en la désorganisant. Augmentation de la perméabilité membranaire	(Zavascki, Goldani, Li, & Nation, 2007)
Antibiotiques	Carbénicilline (CB)	Dérivée de l'ampicilline, CB préférée en laboratoire de recherche pour sa meilleure stabilité	Cible la dernière étape de la biosynthèse de la paroi cellulaire	(Sambrook, Russell, & Laboratory, 2001)
	Tétracycline (TC)	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Cible la sous unité ribosomale 30s en bloquant l'entrée de l'ARN de transfert aminocyl au niveau du site A	(Romero, Traxler, López, & Kolter, 2011)
	Chloramphénicol (CM)	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Inhibition de la synthèse protéique en inhibant la peptidyl transférase lors de l'élongation de la chaîne protéique	(Schifano et al., 2013)
	Kanamycine (KA)	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Inhibition de la sous unité ribosomale 30S conduit à l'inhibition de la synthèse protéique	(Gao, Wu, Sun, Ni, & Xia, 2017)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration en antimicrobien capable d'inhiber la croissance bactérienne, où le milieu de culture est donc resté limpide après 16 à 24 heures de culture. En réalité, la CMI se situe entre cette concentration et celle où les bactéries peuvent encore croître.

Ainsi, la culture de nuit (O/N) de chacune des deux souches de *Vibrio cholerae* est diluée au cinquantième dans du LB 2% puis relancée en culture de jour (O/D) jusqu'à $DO_{600nm}=0.3$. La culture O/D est alors diluée 300 fois pour atteindre une $DO_{600nm\text{ théorique}}=0.001$ dans du PB 2% NaCl, puis, estensemencée avec les différentes concentrations en antimicrobiens en plaque 96 puits pendant 16 à 24 heures à 37°C sous 120 RPM d'agitation. À la suite de la culture, la CMI est déterminée comme la concentration où le milieu de culture est resté limpide.

Les concentrations de travail pour les différentes souches utilisées sont déterminées à partir des CMI et correspondent aux concentrations auxquelles les souches ne subissent pas retard de croissance ni de modifications quantitatives. Elles correspondent en général à 1/16 à 1/64 de la CMI ou lorsque la CMI n'a pas été atteinte, elles correspondent à la concentration la plus forte testée et n'ayant aucun effet sur la croissance. Ainsi, les cultures O/N sont diluées au cinquantième dans du LB 2% NaCl contenant les antimicrobiens aux concentrations prédéterminées par les CMI puis les DO_{600nm} sont prises à intervalles réguliers afin de permettre le suivi de croissance. Lorsque les cultures atteignent une $DO_{600nm}=2$, un dénombrement par dilutions en série est effectué afin de s'assurer qu'à même DO_{600nm} , les cultures comptent aussi le même nombre de bactéries. Ainsi, la culture est diluée 10^6 fois dans du tampon phosphate salin (PBS) stérile pour atteindre un dénombrement entre 30 et 300 colonies par boîtes de Pétri LBA. 100 μ L de la dilution sont étalés et les boîtes sont incubées O/N à 37°C. À la suite des dénombrements, les unités formatrices de colonies (UFC) par millilitre (UFC/mL) sont déterminées selon la formule

suivante :
$$\frac{\text{nombre de colonies (entre 30 et 300)}}{\text{volumeensemencé} \times \text{dilution choisie}} = \text{UFC/mL.}$$

3. Analyse du sécrétome et des protéomes cytosolique/périplasmique et membranaire par spectrométrie de masse de la souche A1552 traitée avec différents peptides antimicrobiens

La culture O/N de la souche A1552 est diluée au cinquantième dans du LB 2% NaCl contenant les PAM aux concentrations figurant dans le tableau III.

Tableau III. Concentrations molaires et massiques des PAM utilisées lors de l'analyse protéomique.

Peptides antimicrobiens (PAM)	Concentrations molaires d'utilisation des PAM (μM)	Concentrations massiques d'utilisation des PAM ($\mu\text{g/mL}$)
Microcine C7	350	345
Lactocine 705	50	179
Thuricine S	188	357
Microcine J25	8.8	18.5
Polymyxine B	9	11.8

Lorsque les cultures atteignent une $\text{DO}_{600\text{nm}}=2$, elles sont centrifugées 5 minutes à 5500g, le surnageant de culture (SN) est alors récupéré et les protéines qu'il contient vont être précipitées dans 82.5 $\mu\text{g/mL}$ d'acide trichloracétique (TCA) O/N à 4°C. Les culots bactériens vont quant à eux être lavés deux fois au PBS froid à pH=7.4, centrifugés à 5500g pendant 5 minutes à 4°C puis suspendus dans du Tris HCl froid à pH=8 à 10mM dans le même volume que le SN enlevé. Par la suite, les culots bactériens sont soniqués dans la glace quatre fois 30 secondes à 30% amplitude puis centrifugés à 13 500g pendant 2 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires non lysés et recentrifugés à 20 000g pendant 30 minutes à 4°C. À cette étape, la majorité des membranes se trouvant dans le culot sont séparées des protéines cytoplasmiques et périplasmiques se trouvant dans le surnageant. Ainsi les surnageants sont précipités au TCA à 82.5 $\mu\text{g/mL}$, O/N à 4°C et les culots membranaires gardés à -20°C. Tous les précipitats au TCA sont ensuite centrifugés à 20 600g pendant 20 minutes à 4°C. Par la suite, les échantillons sont traités par la plateforme de protéomique de l'Institut de Recherches en Immunologie et en Cancérologie (IRIC) où ils vont subir une digestion trypsique. Les peptides alors générés seront chargés sur colonne et les spectres obtenus seront comparés à la

base de données de *Vibrio cholerae* sérotype O1, biotype El Tor, séro groupe Inaba, souche N16961, génétiquement très proche de la souche A1552. Les résultats sont analysés grâce au logiciel Scaffold 4.3.0 où le seuil protéique est fixé à 99% et où un minimum de 2 peptides différents est requis pour identifier une protéine. Ces 2 peptides ne doivent pas contenir un taux d'erreur de plus de 1% pour être effectivement présents dans la protéine. Ainsi, les protéines des quatre *clusters* de gènes du SST6 sont recherchées dans les différents compartiments et l'analyse comparative quantitative en présence et en absence de PAM est effectuée à l'aide du logiciel Scaffold.

4. Analyse par Western blot des effets des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*

Afin d'évaluer les effets des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*, des Western blots (WB) dirigés contre les protéines Hcp (protéine, sécrétée, de la seringue du SST6), VipB (protéine membranaire de la gaine du SST6), ClpV (ATPase de recyclage de la gaine du SST6) et TseL (effecteur sécrété) sont réalisés sur les échantillons de la souche A1552 traitée aux différents antimicrobiens.

La culture O/N de la souche A1552 est diluée au cinquantième dans du LB 2% NaCl contenant les antimicrobiens aux concentrations figurant dans le tableau IV. En perspectives des prochaines manipulations avec *Escherichia coli*, la concentration de la PmB utilisée a été diminuée à 0.39 et cette concentration sera conservée tout au long de l'étude.

Tableau IV. Concentration massiques des antimicrobiens utilisés lors de l'analyse par Western blot.

Antimicrobiens	Concentrations massiques d'utilisation des antimicrobiens ($\mu\text{g/mL}$)
Carbénicilline	0.78
Tétracycline	0.05
Chloramphénicol	0.025
Kanamycine	1.6
Polymyxine B	0.39

La concentration en PmB a été modifiée par rapport à l'analyse par spectrométrie de masse (0.39 $\mu\text{g/mL}$ au lieu de 11.8) en vue des prochaines manipulations où la PmB va être utilisée.

Ainsi, un suivi de la croissance est effectué grâce à la prise de DO_{600nm} à intervalles réguliers puis une cinétique de sécrétion et de présence cellulaire de Hcp est réalisée grâce à la récupération de petites quantités de culture aux DO_{600nm}=1.5, 2 et 3. Les culots bactériens (représentatifs des protéines présentes dans les bactéries) et les surnageants (SN) de culture (représentatifs des protéines sécrétées) sont séparés par 5 minutes de centrifugation à 5500g. Les protéines du SN sont ensuite précipitées à 82.5 µg/mL de TCA O/N à 4°C puis centrifugées, afin de récupérer le culot de protéines sécrétées, à 20 600g pendant 20 minutes à 4°C. Les échantillons des culots bactériens et des SN sont ensuite suspendus dans du Laemmli 5% β-mercaptoéthanol (Bio-Rad), bouillis 5 minutes et chargés sur gel de polyacrylamide 13% et laurylsulfate de sodium (SDS). L'électrophorèse se poursuit pendant 1 heure 30 à 200V puis les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Bio-Rad). Les protéines d'intérêt sont ensuite identifiées en utilisant leurs anticorps polyclonaux spécifiques obtenus chez le lapin et révélées grâce à l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Invitrogen) et la solution ECL prime (GE Healthcare) dont la chimioluminescence sera détectée sur films photo ou enregistrée par l'Amersham Imager 600 (GE Healthcare). À la suite des WB, les membranes sont colorées au bleu de Coomassie afin d'assurer un contrôle du chargement égalitaire entre les puits, permettant alors leur comparaison quantitative. Les anticorps primaires provenant d'un autre laboratoire (Pr. Sun Nyunt Wai, Umeå Universitet, Suède), leurs spécificités ont été auparavant vérifiées et validées. De plus, afin d'assurer l'absence de protéines cytoplasmiques dans les échantillons des surnageants de culture, un WB dirigé contre une protéine exclusivement cytoplasmique (CRP) a été réalisé sur les SN.

5. Tests de compétitions inter bactériennes

Le SST6 est un système permettant, grâce à la sécrétion d'effecteurs ayant des activités antibactériennes, de compétitionner avec les bactéries à Gram négatif de l'environnement de *Vibrio cholerae*. Ainsi, des tests de compétitions sont réalisées entre notre souche, A1552, de *Vibrio cholerae* et la souche MC4100 d'*Escherichia coli*. Cependant, afin d'être certains que les effets vus sur *E. coli* sont bien dus au SST6 de *Vibrio cholerae*, il est important de travailler avec une souche n'ayant pas son SST6 fonctionnel. La souche A1552 a donc été

mutée pour ces deux gènes *hcp1* et *hcp2* ne pouvant donc plus former un système fonctionnel par l'absence de la seringue moléculaire du SST6.

La souche MC4100 est utilisée au laboratoire et couramment traitée à la Polymyxine B. Ainsi la CMI de cette souche pour la PmB avait été effectuée et la concentration de travail établie à 0.39 µg/mL. De ce fait, nous utiliserons tout au cours de cette étude, sauf lors des tests de spectrométrie de masse réalisés en amont, cette concentration-ci en PmB afin d'être constant dans les concentrations en antimicrobiens utilisées.

5.1 Vérification de la résistance des souches MC4100 d'*Escherichia coli* et A1552

***Δhcp1Δhcp2* de *Vibrio cholerae* aux antimicrobiens utilisés en conditions d'interaction**

Afin de vérifier si les concentrations en antimicrobiens utilisées lors des manipulations précédentes pourront aussi être utilisées lors des tests de compétitions avec *Escherichia coli*, un test préliminaire de résistance est effectué. En effet, les interactions sont réalisées en milieu LB solide, 2% NaCl, pendant 2 à 4h, alors que les CMI ont été déterminées en milieu PB ou LB liquides, 2% NaCl, pendant 16 à 24h. De plus, comme la souche A1552 *Δhcp1Δhcp2* sera utilisée comme contrôle, la résistance de cette souche doit aussi être testée.

Ainsi, une culture O/N de MC4100 d'*E. coli* est diluée à 1/50 dans du LB puis amenée à la $DO_{600nm}=1.3$. En parallèle, une culture O/N d'A1552 *Δhcp1Δhcp2* de *Vibrio cholerae* est aussi diluée au 1/50 dans du LB 2% NaCl contenant les antimicrobiens testés : CB à 0.78 µg/mL, TC à 0.05 µg/mL et PmB à 0.39 µg/mL. Les cultures d'A1552 *Δhcp1Δhcp2* sont ensuite amenées à $DO_{600nm}=2$. Par la suite, une goutte de 10 µL de chacune des cultures est déposée sur boîte de Pétri LB à 2% NaCl et 1.2% d'Agar contenant les antimicrobiens aux concentrations de travail. Les boîtes de Pétri sont incubées 3 heures, puis les bactéries des spots sont récupérées en découpant la gélose et en la suspendant dans 500 µL de PBS stérile. Les bactéries sont alors diluées 10^6 fois puis 100 µL des dilutions sont étalés sur boîtes LBA qui seront alors incubées O/N à 37°C. Les boîtes contenant 30 à 300 colonies sont comptées et les unités formatrices de colonies (UFC) par millilitre (UFC/mL) sont déterminées et les traitements antimicrobiens seront comparés entre eux.

5.2 Mise en contact des deux espèces bactériennes

La culture O/N de MC4100 d'*E. coli* est diluée à 1/50 dans du LB puis cultivée jusqu'à la $DO_{600nm}=1.3$ et les cultures O/N d'A1552 WT et d'A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de *Vibrio cholerae* sont aussi diluées au 1/50 dans du LB 2% NaCl contenant les antimicrobiens testés : CB à 0.78 $\mu\text{g/mL}$, TC à 0.05 $\mu\text{g/mL}$ et PmB à 0.39 $\mu\text{g/mL}$ et amenées à $DO_{600nm}=2$.

Par la suite, les deux espèces sont mélangées suivant un ratio volumique précis. Lors des mises au point de la technique trois ratios sont testés : un volume de culture d'*E. coli* pour quatre volumes de culture de *Vibrio cholerae* (1/4), autant de chaque culture (1/1) et quatre volumes d'*E. coli* pour un de *V. cholerae* (4/1). Ainsi, pour un volume final de 100 μL de culture d'interaction, 80 μL de culture de *Vibrio cholerae* sont mélangés à 20 μL de culture d'*E. coli*, (1/4) ou inversement (4/1) ou 50 μL pour 50 μL (1/1). De plus, pour les contrôles où les bactéries sont seules, le volume est conservé et complété avec le milieu de culture des bactéries non mises (*E. coli* seule avec du LB 2% NaCl au volume de *V. cholerae* ou *V. cholerae* avec du LB au volume d'*E. coli*), afin de conserver la même proportion du nombre de bactéries dans la culture. Ainsi, lorsque MC4100 est seule, la culture de *Vibrio cholerae* est remplacée par du LB 2% NaCl et lorsque les souches de *Vibrio cholerae* sont seules, MC4100 est remplacé par le même volume de LB.

Une fois les espèces bactériennes mélangées, une goutte de 10 μL du mélange est déposée sur les boîtes de Pétri contenant le LBA à 2% NaCl avec ou sans les antimicrobiens aux concentrations adéquates. Les boîtes de Pétri des interactions sont alors incubées à 37°C en position inversée et là encore 4 temps ont été testés, permettant la sélection de la meilleure durée d'interaction possible. Ainsi, les interactions ont été poursuivies pendant 1, 2, 3 et 4 heures.

À la suite des incubations, les spots sont récupérés en découpant la gélose et en la suspendant dans 450 μL de PBS stérile. Puis différentes méthodes permettant l'identification et la quantification des deux espèces bactériennes ont été aussi testées.

5.2.1 Identification des deux espèces après compétitions

Afin de différencier MC4100 d'A1552, pour permettre leur quantification respective, plusieurs techniques ont été essayées.

5.2.1.1 Quantification des deux espèces par différence de fluorescence mesurée en cytométrie en flux

Les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ ont été transformées avec le plasmide pKen2 contenant les gènes de la GFP. Ainsi, lors des interactions, les bactéries GFP positives seront identifiées comme les *Vibrio cholerae* et la différence entre le nombre de cellules totales et les GFP positives seront identifiées comme les *Escherichia coli*. Cependant, le plasmide pKen2 porte la résistance à la carbénicilline (CB), l'un des antibiotiques étudié. De ce fait des tests sont ici réalisés afin de voir si en ne maintenant pas la sélection à la CB, les bactéries peuvent garder le plasmide. Deux cultures O/N de chaque souche sont donc réalisées, une culture avec la carbénicilline à 100 $\mu\text{g/mL}$ et l'autre sans l'antibiotique de sélection (A1552pKen2 \emptyset et A1552pKen2 CB et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 CB) (Figure 11). Puis ces cultures O/N sont diluées à 1/50 dans du LB avec 2% NaCl contenant ou pas la sélection à la CB à 100 $\mu\text{g/mL}$: la culture O/N sans la sélection est relancée toujours sans ATB (A1552pKen2 \emptyset_{\emptyset} et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset_{\emptyset}) et la culture de nuit où la sélection a été maintenue et relancée avec ou sans sélection, respectivement A1552pKen2 CB_CB, A1552pKen2 CB_ \emptyset et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 CB_CB et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset_{\emptyset} (Figure 11). En parallèle, une culture O/N de la souche MC4100, diluée à 1/50 dans du LB a aussi été réalisée pour servir de contrôle négatif GFP-.

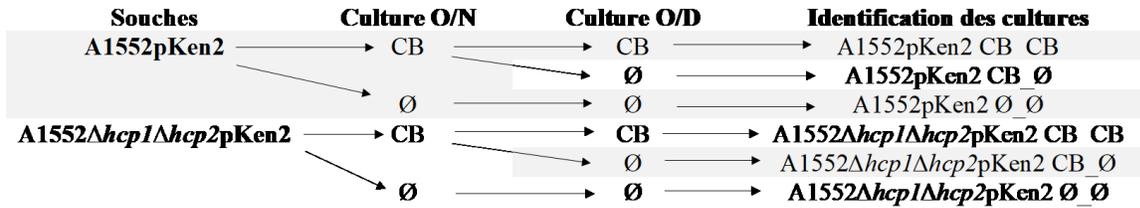


Figure 11. Schéma indicatif des identifications des cultures lors du maintien ou non de la sélection plasmidique.

Lorsque les cultures des souches de *Vibrio cholerae* atteignent les $DO_{600nm}=2$ et celle d'*E. coli*, 1.3, les deux espèces bactériennes sont mises en interaction à un ratio d'un volume d'*E. coli* pour quatre volumes de *Vibrio cholerae* sur LBA avec 2% de NaCl, sans antibiotique, pendant 3 heures (Figure 12). Les cultures des souches A1552pKen2 CB_CB et A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 CB_CB, où la sélection plasmidique a toujours été conservée, ne sont pas mises en interaction avec *E. coli* puisqu'elles ne permettent pas l'étude des effets de la CB, à faible concentration, sur le SST6. Elles sont alors déposées sur LBA avec CB à 100 µg/mL pendant toute la durée d'interaction des autres souches, pour être traitées de la même façon (Figure 12). De plus, les cultures des souches de *Vibrio cholerae* pKen2 ∅_∅ et CB_∅ et de *Escherichia coli*, mises en interaction, sont aussi déposées seules sur LBA 2% de NaCl, sans antibiotique, pendant 3 heures (Figure 12).

Identification des cultures	Spots sur	
A1552pKen2 CB_CB	LBA + CB 100µg/mL	Seule
A1552pKen2 CB_∅	LBA 2% NaCl + ∅	Seule
		Interaction avec MC4100
A1552pKen2 ∅_∅	LBA 2% NaCl + ∅	Seule
		Interaction avec MC4100
A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 CB_CB	LBA + CB 100µg/mL	Seule
A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 CB_∅	LBA 2% NaCl + ∅	Seule
		Interaction avec MC4100
A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 ∅_∅	LBA 2% NaCl + ∅	Seule
		Interaction avec MC4100
MC4100	LBA 2% NaCl + ∅	Seule

Figure 12. Schéma indicatif du traitement des différentes cultures où la sélection plasmidique a été maintenue ou pas.

À la suite des trois heures d'incubation, les spots de bactéries sont récupérés, suspendus dans 450 µL de PBS stérile et lavés par centrifugation à 5500g pendant 5 minutes, puis une nouvelle fois suspendus dans 500 µL de PBS. Le pourcentage de bactéries GFP positives et négatives est évalué et l'intensité de fluorescence de ces deux populations est quantifiée au cytomètre en flux (BD Canto II, FSC :523 Volts (V); SSC :586V).

5.2.1.2 Identification des deux espèces par production de la bêta-galactosidase

Afin de pouvoir différencier et quantifier les deux espèces bactériennes après la mise en contact, les spots contenant MC4100 et A1552 WT ou $\Delta hcp1\Delta hcp2$ sont dilués 10^6 fois, puis 100 µL des dilutions sont étalés sur LBA contenant 100 µL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Ainsi, les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$, ayant l'insertion chromosomique du gène *lacZ*, vont hydrolyser le X-gal et libérer un composé bleu, ce qui formera alors des colonies bleues, grâce à la production de la β -galactosidase. La souche MC4100, ne possédant pas le gène *lacZ* formera des colonies blanches sur boîtes LBA+ X-gal. Ainsi les colonies bleues seront identifiées comme étant les *Vibrio cholerae* et les colonies blanches seront les *Escherichia coli*.

5.2.1.3 Sélection par antibiotiques des trois souches, A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et MC4100

La souche MC4100 étant résistante à la streptomycine à 50 µg/mL et les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ étant résistantes à la rifampicine à 50 µg/mL, les deux espèces bactériennes pourront être sélectionnées, après la mise en contact, sur leur milieu respectif de résistance. Ainsi, après les dilutions en séries des spots de contact, 100 µL de ces dilutions bactériennes sont étalés sur LBA sans antibiotique, LBA avec la streptomycine et LBA avec la rifampicine. Ainsi, les souches de *Vibrio cholerae* vont être sélectionnées et quantifiées sur LBA contenant la rifampicine et la souche d'*Escherichia coli* le sera sur milieu LBA contenant la streptomycine. Dans le cas des bactéries seules, l'étalement sur le milieu sans antibiotique permet de pouvoir tester leur résistance effective à l'antibiotique par comparaison avec le dénombrement de la boîte avec l'antibiotique en question et l'étalement sur le milieu contenant l'autre antibiotique permettra de vérifier leur réelle sensibilité.

5.3 Calculs des unités formatrices de colonies par millilitre et du taux de fatalité

À la suite des tests de compétition, les colonies sur les boîtes de dénombrement sont comptées et les dilutions prises en compte sont seulement celles comprenant entre 30 et 300 colonies. Les unités formatrices de colonies (UFC) par millilitre (UFC/mL) sont alors calculées et permettent alors la comparaison entre les différentes conditions.

Puis, afin d'apprécier la capacité du SST6 de *Vibrio cholerae* à tuer *Escherichia coli*, le taux de fatalité est calculé et prend en compte le nombre de colonies de MC4100 seule auquel est divisé la différence entre le nombre de colonies de MC4100 mise en interaction avec le double mutant du SST6 et le nombre de colonies de MC4100 avec A1552 sauvage :

$$\frac{(\text{nombre de MC4100 avec } \Delta hcp1\Delta hcp2) - (\text{nombre de MC4100 avec A1552 WT})}{\text{nombre de MC4100 seule}} \times 100 \text{ (L. Liu et al., 2017).}$$

5.4 Étude de la sécrétion par le SST6 lors des tests de compétition

Lors des tests de compétition, il est aussi important de pouvoir contrôler l'activité du SST6 des bactéries se trouvant sur les boîtes LBA 2% NaCl. Ainsi, afin de pouvoir récupérer les protéines et effecteurs qui seraient sécrétés lors des interactions, une membrane de cellophane a été placée entre le milieu de culture et le spot de culture bactérienne. Cette membrane est assez poreuse pour laisser passer les nutriments du milieu de culture sans laisser passer les protéines qui seraient sécrétées par le SST6. À la fin de l'interaction la membrane est lavée avec du PBS stérile puis les bactéries et protéines sont récupérées. Un dénombrement des bactéries est réalisé et un Western blot anti Hcp est aussi réalisé afin d'apprécier la sécrétion de cette protéine et donc le niveau d'activation du SST6.

6. Contact entre les antimicrobiens à fortes doses et les souches A1552 WT et

$\Delta hcp1\Delta hcp2$

Afin de déterminer si le SST6 de la souche A1552 accroît la résistance aux antimicrobiens, les bactéries SST6+ et SST6- sont mises en contact avec de fortes doses en antimicrobiens dans du PBS stérile à pH=7.4 (milieu ne permettant pas la croissance

bactérienne). À la fin de ce contact, un dénombrement sera réalisé et la comparaison des UFC/mL des deux souches permettra une meilleure appréciation des activités du SST6 sur la résistance aux antimicrobiens.

Ainsi, les cultures O/N des souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ sont diluées au cinquantième dans du LB 2% NaCl puis relancée en culture de jour jusqu'à $DO_{600nm}=0.3$. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par du PBS stérile par centrifugation à 5000g pendant 5 minutes et les cultures sont ensuite diluées 300 fois pour atteindre une DO_{600nm} théorique =0.001. Les bactéries sont alors mises en contact avec une concentration en antimicrobien correspondante à 1/2 de la CMI et incubées en plaque 96 puits pendant 1 heure à 37°C sans agitation. À la fin de l'incubation, les bactéries sont récupérées, 50 μ L du volume de culture du puits est directement étalé sur boîte LBA et les 50 autres μ L du puits sont dilués 10 fois et étalés sur LBA. Les boîtes sont ensuite incubées O/N à 37°C puis un dénombrement entre 30 et 300 colonies est effectué et le calcul des UFC/mL est réalisé. Les dénombrements des deux souches SST6+ et SST6- seront alors comparés entre traitements afin de rendre compte des effets du SST6 sur la résistance aux antimicrobiens.

Résultats

1. Analyse du sécrétome et des protéomes cytosolique/périplasmique et membranaire de la souche A1552 sauvage en présence de doses sous-létales en peptides antimicrobiens bactériens

Afin de déterminer les effets des peptides antimicrobiens bactériens sur la sécrétion de *Vibrio cholerae*, une analyse quantitative des protéines sécrétées et présentes dans les bactéries traitées ou non aux PAM a été réalisée par spectrométrie de masse.

1.1 Détermination des concentrations de travail des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont utilisés à des concentrations sous létales afin de mettre en évidence la réponse de la bactérie face aux PAM. Ainsi, les CMI des peptides antimicrobiens ont été recherchées mais aucune CMI n'a jamais été atteinte malgré l'utilisation de doses maximales pouvant être testées. De ce fait, les concentrations de travail ont été choisies comme la concentration la plus élevée testée en CMI. Puis, les DO_{600nm} après 4 heures de culture ont été mesurées afin de s'assurer de la bonne croissance des bactéries en présence de ces PAM (Tableau V). Ces cultures sont alors centrifugées afin de séparer les surnageants, représentatifs des protéines sécrétées des culots bactériens qui vont être soniqués pour permettre la séparation physique des membranes cellulaires du contenu protéique cytoplasmique et périplasmique. La composition en protéines des trois compartiments va alors être analysée en spectrométrie de masse.

Tableau V. Concentrations de travail des différents PAM et DO_{600nm} en fin de culture de la souche A1552 WT, ne montrant pas de retard de croissance lors des traitements aux PAM.

Traitements	Concentrations molaires d'utilisation des peptides antimicrobiens (μM)	Concentrations massiques d'utilisation des peptides antimicrobiens (μg/mL)	Densité optique à 600nm après 4heures de culture à 120 RPM à 37°C
Aucun traitement	0	0	1.90
Microcine C7	350	345	1.72
Lactocine 705	50	179	2.12
Thuricine S	188	357	2.00
Microcine J25	8.8	18.5	1.76
Polymyxine B	9	11.8	2.28

Au vu des résultats de densité optique (Tableau V), la croissance bactérienne n'est pas altérée en présence des différents PAM testés (Microcine C7, Lactocine 705, Thuricine S, Microcine J25 et Polymyxine B), permettant alors l'analyse des résultats de spectrométrie de masse.

1.2 Analyse quantitative des protéines du Système de Sécrétion de Type VI par spectrométrie de masse

Chaque protéine dont le gène codant est présent dans les différents groupes de gènes connus du SST6 a été recherchée parmi toutes les protéines retrouvées dans l'analyse de spectrométrie de masse (Figure 13). Ainsi, une dizaine de protéines associées au SST6 a été retrouvée dans les échantillons d'analyse de la sécrétion, des membranes et du cytoplasme/périplasma. Ce sont des protéines structurales mais aussi effectrices, adaptatrices et immunitaires et dont la présence de PAM module l'abondance dans les différents échantillons. Les premiers échantillons envoyés en spectrométrie de masse ont été les surnageants de culture, de ce fait tous les PAM avaient été analysés. Cependant, pour des raisons d'économie pour le laboratoire, nous avons choisi de continuer l'étude des échantillons de membranes et cytoplasme/périplasma pour trois des cinq PAM utilisés, donnant des résultats satisfaisants dans les échantillons des surnageants de culture.

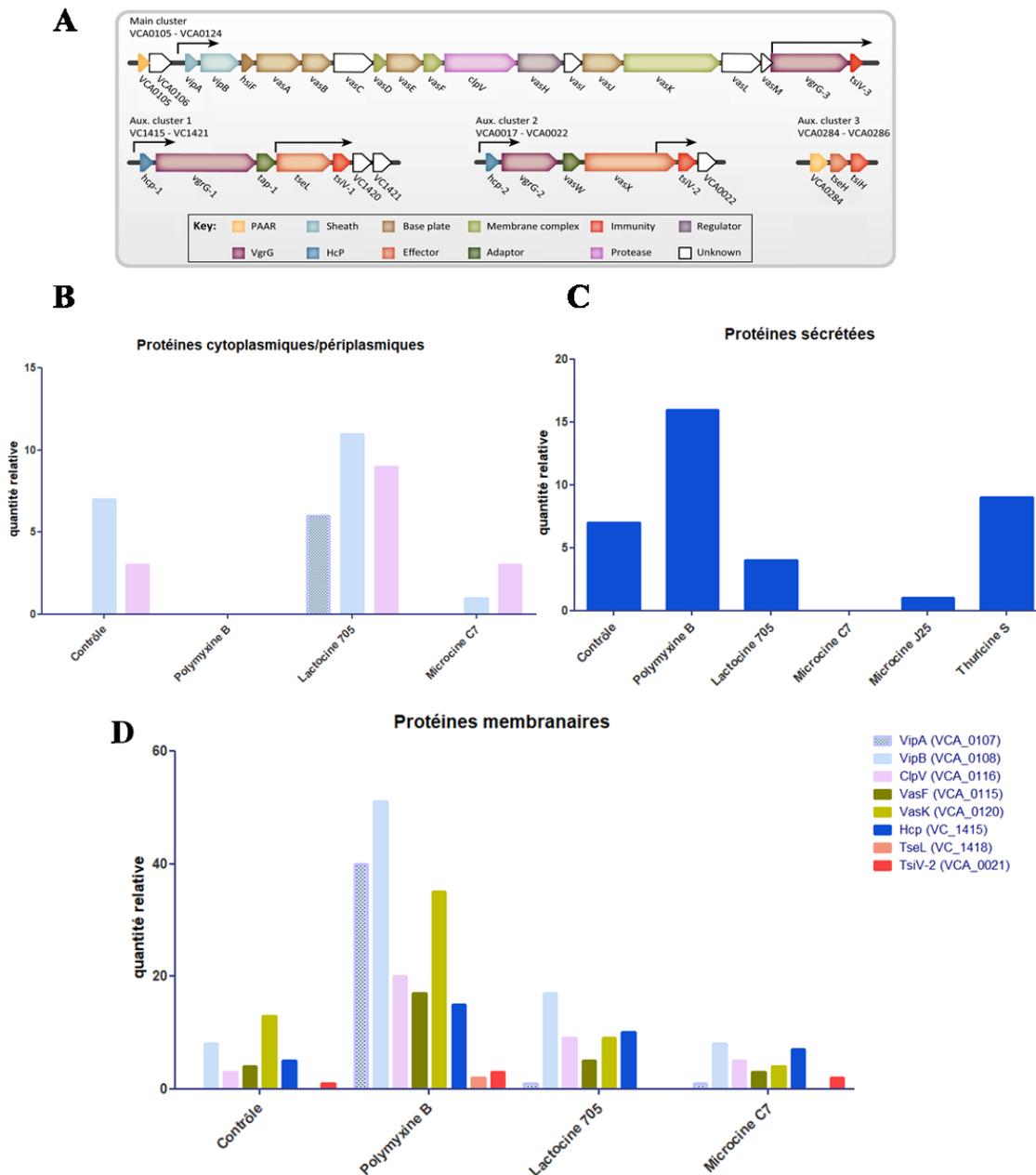


Figure 13. Analyse quantitative de spectrométrie de masse des protéines du SST6 de la souche A1552, modulées par les traitements aux PAM.

A) Loci du SST6 de *Vibrio cholerae*, dont les gènes sont organisés en quatre groupes dont l'opéron principal est situé sur le chromosome II de la bactérie (Joshi et al., 2017). Droits de reproduction, Elsevier, licence d'exploitation numéro 4620950385832. B) C) D) Quantification de la présence dans le cytoplasme et périplasma (B), dans les surnageants de culture (C) et à la membrane (D) des différentes protéines du SST6 retrouvées dans les échantillons des bactéries traitées ou non aux PAM ($n=1$). Les protéines sont indiquées par couleurs qui font référence aux couleurs des gènes en A).

Les peptides antimicrobiens semblent moduler le SST6 étant donné les variations observées dans la sécrétion des protéines mais aussi leur présence à la membrane et dans le cytoplasme et le périplasme (Figure 13B, C, D). La polymyxine B (PmB) semble induire le SST6 en augmentant la sécrétion de la protéine Hcp et la présence à la membrane des autres protéines du SST6 retrouvées par rapport au contrôle sans traitement. De plus, plus aucune protéine du SST6 n'est retrouvée dans la phase cytoplasmique/périplasmique lors du traitement à la PmB indiquant un recrutement massif des protéines à la membrane pour une sécrétion accrue. Lors du traitement à la lactocine 705 (Lact705), la sécrétion de la protéine Hcp semble être diminuée par rapport au contrôle non traité et la quantité des protéines cytoplasmiques, associées au SST6, semble être augmentée, alors qu'aucune différence quantitative des protéines membranaires n'est observée. La Lact705 bloquerait la sécrétion par le SST6 en séquestrant dans le cytoplasme, les membranes et le périplasme de la bactérie les composants du SST6. La microcine C7 (MC7), quant à elle, entraîne la diminution, dans tous les compartiments cellulaires, de la quantité protéique associée avec le SST6. La microcine J25 (MJ25) diminue la sécrétion de la protéine Hcp et la thuricine S ne semble que très peu l'augmenter mais la suite de l'analyse des autres compartiments cellulaire n'a pas été réalisée pour ces PAM pour des raisons économiques.

2 Évaluation par Western blot des effets des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*

Dans le but de confirmer les effets des différents PAM vus lors de l'analyse par spectrométrie de masse sur le SST6 de *Vibrio cholerae*, des Western blots dirigés contre la protéine Hcp ont été réalisés. De plus, afin de mesurer les effets que pourraient avoir les antimicrobiens de manière plus générale, les bactéries ont aussi été traitées à différents antibiotiques et des Western blots dirigés contre plusieurs protéines du SST6 ont été faits.

2.1 Détermination des concentrations de travail des antibiotiques et suivi de croissance et dénombrement des bactéries traitées aux différents antimicrobiens

De même que pour l'étude avec les PAM, les CMI des différents ATB ont été recherchées afin de s'assurer de travailler avec des concentrations sous-létales. À la suite de la détermination des CMI, les concentrations de travail des ATB ont été définies et un suivi de la croissance de la souche A1552 sauvage traitée aux différents ATB et PAM a été effectué. À la fin des cultures, les bactéries sont dénombrées afin de s'assurer qu'à DO_{600nm} équivalentes le nombre de bactéries entre les différents traitements est égal.

2.1.1 Concentrations minimales inhibitrices et concentrations de travail pour les différents antibiotiques

Après avoir défini les CMI, les concentrations de travail des différents ATB sont établies comme étant 1/16 ou 1/64 de ces CMI (Tableau VI).

Tableau VI. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations de travail des ATB pour la souche A1552 sauvage.

Souche A1552	Traitements	Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques (µg/mL)	Concentrations d'utilisation des antibiotiques (µg/mL)
	Aucun traitement	Ø	0
	Carbénicilline	50	0.78
	Tétracycline	3.2	0.05
	Chloramphénicol	0.8	0.025
	Kanamycine	25.6	1.6

2.1.2 Suivi de croissance et dénombrements des bactéries traitées à différents

antimicrobiens

Les bactéries sont cultivées en présence de concentrations sous-létales en antimicrobiens et leur croissance est suivie afin de s'assurer que les bactéries traitées ne subissent aucun retard de croissance du fait de leur traitement (Figure 14A). Puis, lorsque la $DO_{600nm}=2$ est atteinte, le dénombrement des bactéries dans les différents traitements est réalisé. Ce dénombrement permet de vérifier si les traitements antimicrobiens n'entraînent pas une modification de la morphologie bactérienne (filamentation) expliquant qu'elles atteignent la même DO_{600nm} que le contrôle sans antimicrobien (Figure 14B). Une nouvelle fois, une sélection des PAM a été faite et l'analyse se poursuivra seulement avec la PmB.

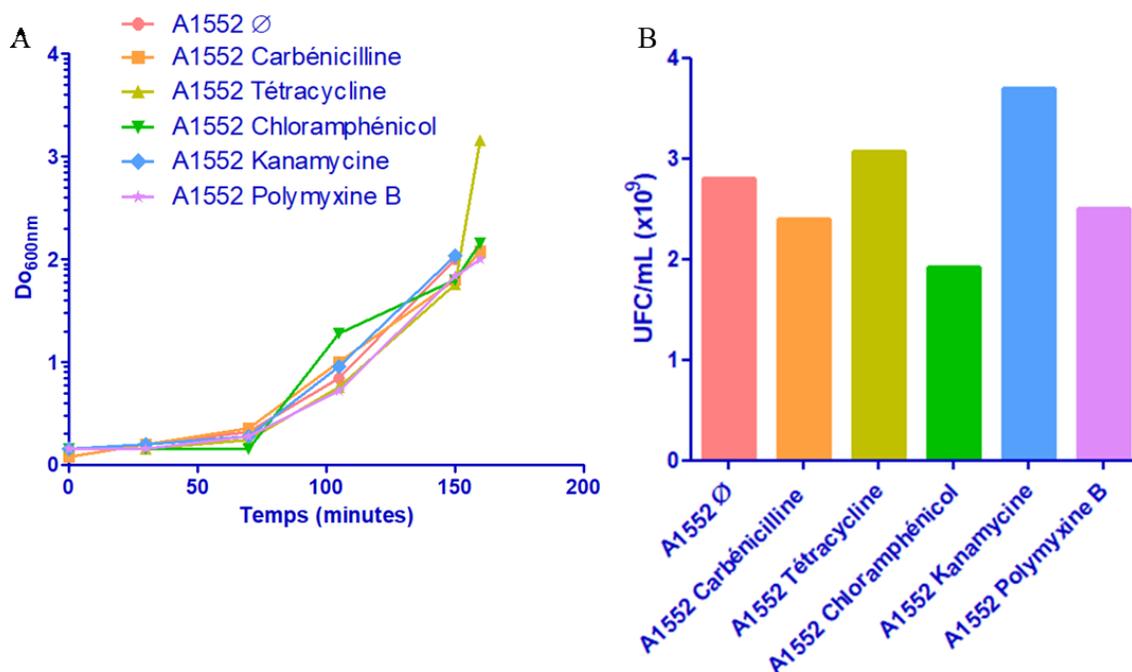


Figure 14. Courbe de croissance et dénombrement après 150 minutes de culture de la souche A1552 traitée aux ATB ne montrant pas de défaut suite aux traitements antimicrobiens.

A) La croissance de la souche A1552 WT est suivie jusqu'à la bonne DO_{600nm} ($DO_{600nm}=2$) pour récupérer les échantillons pour réaliser les Western blots. Les bactéries sont cultivées en LB liquide avec 2% NaCl. B) Dénombrement des colonies rapporté au volume ensemencé. Les bactéries sont récupérées lorsque la bonne DO_{600nm} pour l'activation du SST6 est atteinte ($DO_{600nm}=2$).

D'après la figure 14, les bactéries ne semblent pas subir de retard de croissance ni de modification quantitative et morphologique lors de leurs traitements antimicrobiens. De ce fait, ces concentrations en antimicrobiens peuvent être utilisées pour la suite de l'analyse de la modulation sur le SST6.

2.2 Suivi de l'expression et de la sécrétion de la protéine Hcp de la souche

A1552 traitée aux antimicrobiens

Afin de confirmer les résultats obtenus en spectrométrie de masse suggérant la modulation du SST6 par les PAM chez *Vibrio cholerae*, un suivi de l'expression et de la sécrétion de la protéine Hcp de la souche A1552, traitée à différents antimicrobiens est réalisé par Western blot. Les échantillons sont récupérés à $DO_{600nm}=1.5$; 2 et 2.5 puis les surnageants de culture sont séparés des culots bactériens et sont préparés pour le WB, dirigé contre la protéine Hcp. Ainsi la sécrétion de Hcp sera le témoin de l'activation de la sécrétion par le SST6 (Figure 15).

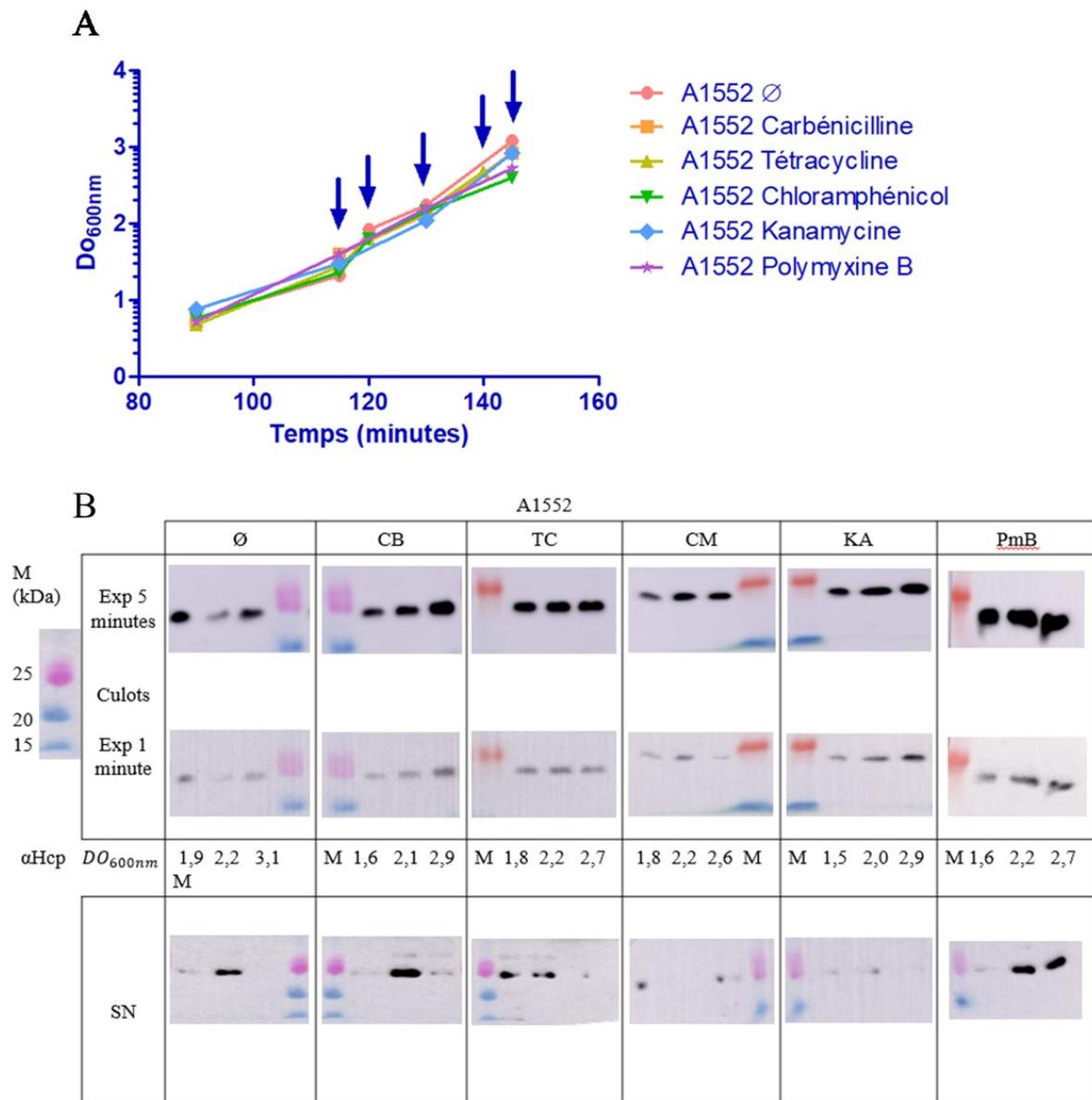


Figure 15. Cinétique d'expression et de sécrétion de la protéine Hcp chez la souche A1552 de *Vibrio cholerae* traitée aux différents ATB ou à la PmB.

A) Suivi de la croissance des bactéries cultivées en milieu LB liquide avec 2% NaCl. Les flèches bleues indiquent les temps où la culture a été récupérée pour la réalisation des WB. Les bactéries n'atteignant pas les DO_{600nm} exactement en même temps pour les différents traitements, la récupération des échantillons s'est réalisée cinq fois pour trois DO_{600nm} étudiées. B) Western blots dirigés contre la protéine Hcp des culots bactériens et des surnageants de culture, représentant les protéines sécrétées (Exp=Exposition). À la suite des WB, les membranes ont toutes été colorées au bleu de Coomassie et aucune différence de chargement des puits n'a été observée.

L'analyse du WB, en figure 26 de l'Annexe, dirigé contre la protéine CRP, protéine exclusivement cytoplasmique, dans les SN démontre qu'aucune protéine cytoplasmique ne contamine les surnageants de culture permettant alors l'étude de ces échantillons SN comme le reflet des protéines sécrétées par la bactérie.

Le WB du contrôle non traité indique que la protéine Hcp est déjà présente dans les culots bactériens à $DO_{600nm}=1.9$ et que sa présence se prolonge jusqu'au moins à la $DO_{600nm}=3.1$ (Figure 15B). La sécrétion de Hcp n'est réellement visible qu'à partir de la $DO_{600nm}=2.2$ mais pourrait commencer à partir de la $DO_{600nm}=1.9$ et est déjà terminée à $DO_{600nm}=3.1$. Il est aussi observable que lorsque la sécrétion de la protéine est active, sa présence dans les culots bactériens est diminuée.

L'analyse du WB du traitement à la carbénicilline (CB), semble indiquer une quantité plus importante de la protéine Hcp dans les culots bactériens et la sécrétion de Hcp semble aussi être quantitativement augmentée, sans toutefois pouvoir indiquer qu'elle est rallongée ($DO_{600nm}=2.9$ comparée à la $DO_{600nm}=3.1$ pour le contrôle) (Figure 15B). La CB induirait donc une augmentation de l'abondance globale de la protéine Hcp, possiblement due à une sur-expression des gènes *hcp*, entraînant une augmentation de sa sécrétion. De plus, lors de la sécrétion, la diminution vue dans les culots bactériens pour le contrôle n'est ici pas observable indiquant, une fois de plus, la sur-expression de la protéine par la CB.

Le traitement à la tétracycline (TC) semble induire la sécrétion de la protéine plus tôt que pour le contrôle, $DO_{600nm}=1.8$ pour la TC comparée à la $DO_{600nm}=2.2$ pour le contrôle, sans l'augmenter quantitativement (Figure 15B). La sécrétion est encore active à $DO_{600nm}=2.2$ mais n'est plus aussi marquée et n'est plus observable à $DO_{600nm}=2.7$. Ainsi, le temps de sécrétion entre le contrôle et la TC pourrait être le même mais la TC induirait seulement une anticipation de la sécrétion lors de la croissance bactérienne. À l'observation des culots bactériens, les quantités de Hcp semblent augmentées en fin de culture par rapport au contrôle et de plus la diminution observée dans les culots du contrôle lors de la sécrétion n'est ici pas visible.

L'analyse du WB du traitement au chloramphénicol (CM) semble indiquer une absence de sécrétion de la protéine Hcp, lorsque celle-ci est active pour le contrôle sans traitement

($DO_{600nm}=2.2$) et ne montre aucune autre sécrétion aux autres DO_{600nm} (Figure 15B). De plus, la quantité protéique de Hcp dans les culots bactériens est moindre à $DO_{600nm}=1.8$ par rapport au contrôle à $DO_{600nm}=1.9$, mais est plus importante à la $DO_{600nm}=2.2$, cependant cela s'explique par la diminution dans les culots lors de la sécrétion chez le contrôle qui n'a pas lieu par le CM. Ainsi, le CM retarderait la présence de la protéine Hcp dans les culots bactériens et inhiberait sa sécrétion par le SST6.

Les WB du traitement à la kanamycine (KA) semblent indiquer une forte diminution de la sécrétion de la protéine Hcp, lorsque celle-ci est active pour le contrôle sans traitement ($DO_{600nm}=2.2$) et ne montre aucune autre sécrétion aux autres DO_{600nm} testées (Figure 15B). De plus, il semblerait que la protéine Hcp s'accumule dans les culots bactériens, où la différence avec le contrôle non traité commence à se voir en fin de culture ($DO_{600nm}=2.9$), ce qui peut suggérer que le traitement à la KA bloquerait la protéine Hcp dans la bactérie en limitant sa sécrétion.

Le WB du traitement à la PmB indique une importante quantité de protéine Hcp dans les culots bactériens, sans la diminution quantitative visible lors de la sécrétion (Figure 15B). La protéine Hcp semble aussi être plus présente dans les surnageants de culture que dans le contrôle non traité et peut-être plus longtemps puisqu'à $DO_{600nm}=2.7$ la bande indique encore une forte abondance de protéines. Ces résultats confirmeraient l'analyse de spectrométrie de masse et indiqueraient une nette augmentation de la sécrétion de Hcp et *in fine* une augmentation de l'activité du SST6 en présence de PmB.

2.3 Western blots dirigés contre plusieurs protéines du SST6 sur les bactéries traitées aux ATB

Afin de confirmer la modulation faite par les ATB sur le SST6 de la souche A1552, plusieurs WB dirigés contre différentes protéines du SST6 ont été réalisés. Nous avons récupéré les échantillons aux alentours de la $DO_{600nm}=2$, puis avons réalisé pour les mêmes échantillons des WB anti Hcp, VipB, ClpV et TseL sur les culots bactériens et sur les surnageants de culture (SN), pour les protéines sécrétées seulement (Figure 16).

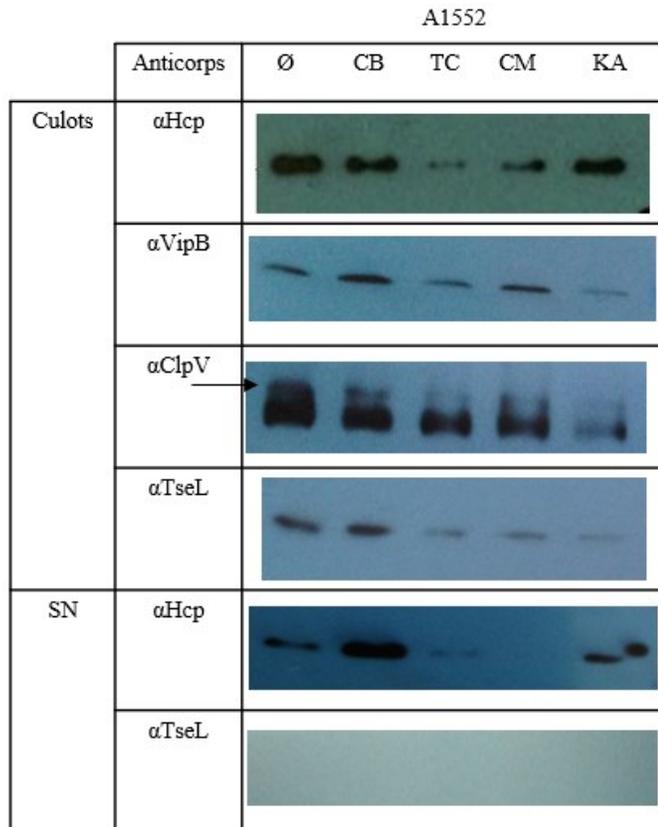


Figure 16. Western blots dirigés contre plusieurs protéines du SST6 chez la souche A1552 de *Vibrio cholerae* traitée aux ATB.

Western blots dirigés contre les protéines Hcp, VipB, ClpV et TseL des culots bactériens et des surnageants de culture. À la suite du WB, les membranes ont toutes été colorées au bleu de Coomassie et aucune différence entre le chargement des puits n'a été observée sauf pour le puits kanamycine de la membrane avec l'anticorps ClpV, qui ne sera donc pas analysé. La flèche noire indique la bande de la protéine ClpV.

La protéine TseL est un effecteur bactérien du SST6 et est donc sécrété, cependant, aucune sécrétion n'est visible en WB et en conditions de laboratoire puisque la protéine n'est sécrétée qu'en faible quantité. Il est, tout de même intéressant d'étudier sa présence dans les culots bactériens et ceci permet d'apprécier le niveau d'activité du SST6.

L'observation des WB dirigés contre la protéine Hcp lors du traitement à la CB confirme, tout d'abord, l'augmentation de la sécrétion vue dans les premiers WB (Figures 15B et 16). Cependant, l'augmentation quantitative de la protéine Hcp observée lors des premiers WB

dans les culots bactériens n'est ici pas visible. En effet, il n'y a aucune différence quantitative de Hcp dans les culots entre le contrôle non traité et la condition CB. Ainsi, la CB n'augmenterait pas l'expression génique de Hcp mais seulement sa sécrétion. Les observations de la protéine VipB, protéine membranaire du SST6 et de l'effecteur TseL montrent une quantité plus importante dans les culots bactériens de la CB que du contrôle non traité. De plus, l'ATPase ClpV, active lors de la fin de la sécrétion pour le recyclage protéique, n'est quantitativement pas augmentée par le traitement à la CB. Ainsi, la CB aurait un effet de suractivation du SST6 en augmentant la sécrétion de la protéine Hcp et en augmentant la présence membranaire des composants du SST6 (protéine VipB de la gaine et l'effecteur TseL), sans toutefois devoir augmenter le recyclage protéique par la ClpV.

Le traitement à la TC indique une diminution quantitative de toutes les protéines observées et ce dans les culots bactériens et le SN (Figure 16). Cependant, lors des premiers WB, la TC avait montré une modulation de la cinétique de sécrétion avec une anticipation de celle-ci (Figure 15B). De plus, lors de cette expérience, les échantillons ont tous été récupérés à la même $DO_{600nm}=2$, DO_{600nm} à laquelle l'activation de la sécrétion avec le traitement à la TC a probablement déjà eu lieu. Ceci pourrait donc expliquer que la diminution quantitative que l'on croyait voir n'est, en fait, qu'un retard dans les observations. Ces observations auraient ainsi dû être faites à la DO_{600nm} où la TC active le système.

L'analyse du WB dirigé contre la protéine Hcp dans les SN de culture bactérienne traitée au CM indique une absence de sécrétion de la protéine, ce qui confirme bien les observations faites lors du premier WB (Figures 15B et 16). Cependant, l'analyse des culots bactériens montre une diminution quantitative de la protéine Hcp, qui n'avait pas été vue lors du premier WB, mais cette diminution se confirme sur les autres protéines du SST6 (ClpV et TseL). La protéine VipB, quant à elle, semble présente en quantité égale au contrôle et son abondance ne semble donc pas être modulée par le traitement au CM.

Les WB des culots bactériens et des SN, lors du traitement à la KA, pour la protéine Hcp ne montrent pas de différence quantitative par rapport au contrôle non traité (Figure 16). Lors du premier WB il avait été suggéré que la KA induisait une accumulation de la protéine Hcp mais à une DO_{600nm} plus tardive que celle ici analysée, expliquant donc l'absence de différence ici vue (Figure 15B). Cependant, il avait été observé une absence totale de sécrétion de la

protéine Hcp qui n'est pas vue dans cette expérience. Toutefois, les autres protéines du SST6 (VipB et TseL) semblent quantitativement diminuées par rapport au contrôle suggérant bien une diminution de l'activité du SST6 lors du traitement à la KA. La bande de la protéine ClpV lors du traitement à la KA n'est pas analysable car une diminution du chargement de puits a été observée lors de la coloration au bleu de Coomassie.

3 Compétitions inter bactériennes

Afin de compléter l'étude de la modulation des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*, des compétitions entre *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* ont été réalisées. En effet, les effets d'inhibition ou d'activation des antimicrobiens sur le SST6 pourraient se répercuter sur, respectivement, une diminution ou une augmentation du taux de mortalité d'*E. coli* face à *V. cholerae*. Ainsi, seuls les antimicrobiens ayant montré une activité prononcée sur le SST6 ont été gardés pour la continuité de l'étude. De plus, afin d'être certain d'évaluer les effets du SST6 sur la survie ou sur la mort de la souche MC4100, la souche A1552 double mutante *hcp1-hcp2*, qui n'a donc plus le SST6 fonctionnel, est mise en contact avec *E. coli* et les interactions entre ces deux souches seront comparées aux interactions entre *E. coli* et A1552 WT.

3.1 Mises au point expérimentales

3.1.1 Résistance des souches MC4100 d'*Escherichia coli* et A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de *Vibrio cholerae* aux antimicrobiens utilisés

Puisque l'étude porte sur des antimicrobiens, il faut tester la résistance de la souche MC4100 d'*E. coli* aux concentrations en antimicrobiens utilisées. De plus, les interactions se faisant sur boîte avec un milieu LB avec 2% NaCl, les tests de résistance doivent aussi se faire sur ce milieu-là. Finalement, la souche A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ n'ayant pas été testée auparavant doit aussi être résistante aux concentrations en antimicrobiens utilisées sur milieu LB contenant 2% NaCl. De ce fait, une culture d'*E. coli* à $DO_{600nm}=1.3$ et une culture de *Vibrio cholerae* $\Delta hcp1\Delta hcp2$ à $DO_{600nm}=2$ (DO_{600nm} à laquelle le SST6 chez *Vibrio cholerae* est étudié) sont incubées trois heures dans un milieu LBA avec 2% NaCl contenant les antimicrobiens aux concentrations de travail. Les bactéries sont ensuite récupérées, diluées 10^6

fois et dénombrées (Figure 17). Ainsi les concentrations testées pour la résistance seront les mêmes que celles utilisées pour les tests en WB, 0.78 $\mu\text{g/mL}$ pour la CB et 0.05 $\mu\text{g/mL}$ pour la TC, sauf pour la PmB puisque la souche MC4100 d'*E. coli* y est plus sensible que *Vibrio cholerae*. De ce fait, la concentration utilisée en PmB sera la concentration utilisée dans le laboratoire pour les souches d'*E. coli*, concentration établie à 0.39 $\mu\text{g/mL}$.

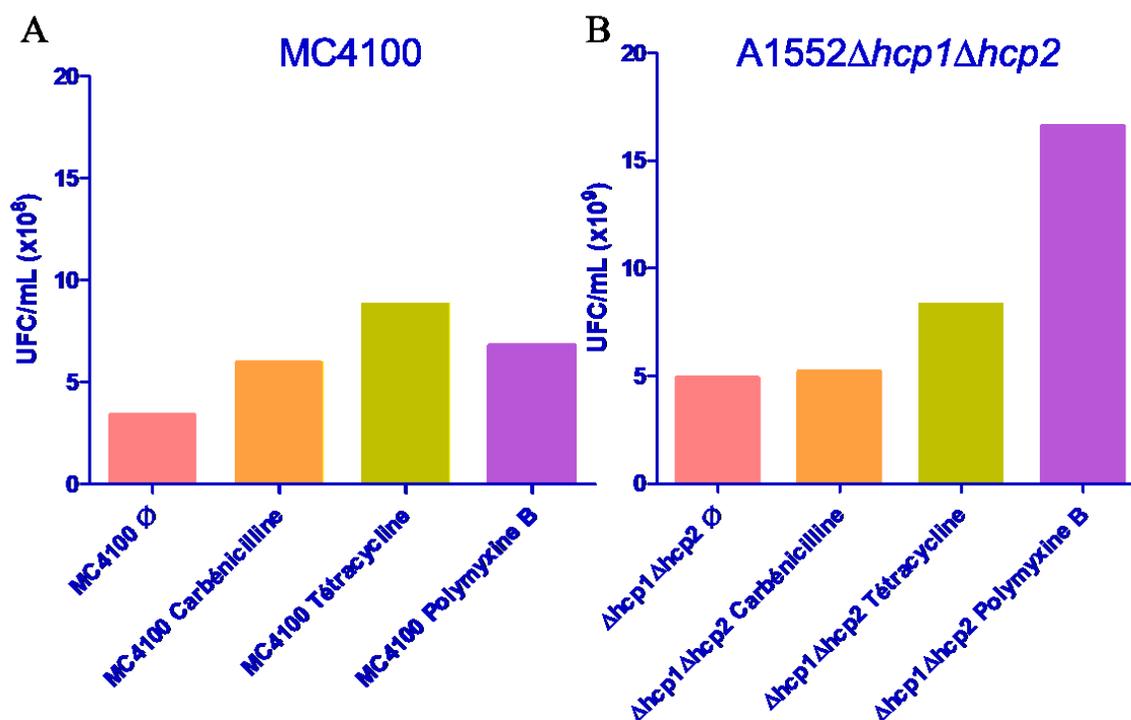


Figure 17. Dénombrement des souches MC4100 et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ incubées 3 heures sur un milieu LBA 2% NaCl contenant les différents antimicrobiens et démontrant leur résistance.

A) et B) La carbénicilline est à une concentration de 0.78 $\mu\text{g/mL}$, la tétracycline à 0.05 $\mu\text{g/mL}$ et la polymyxine B à 0.39 $\mu\text{g/mL}$.

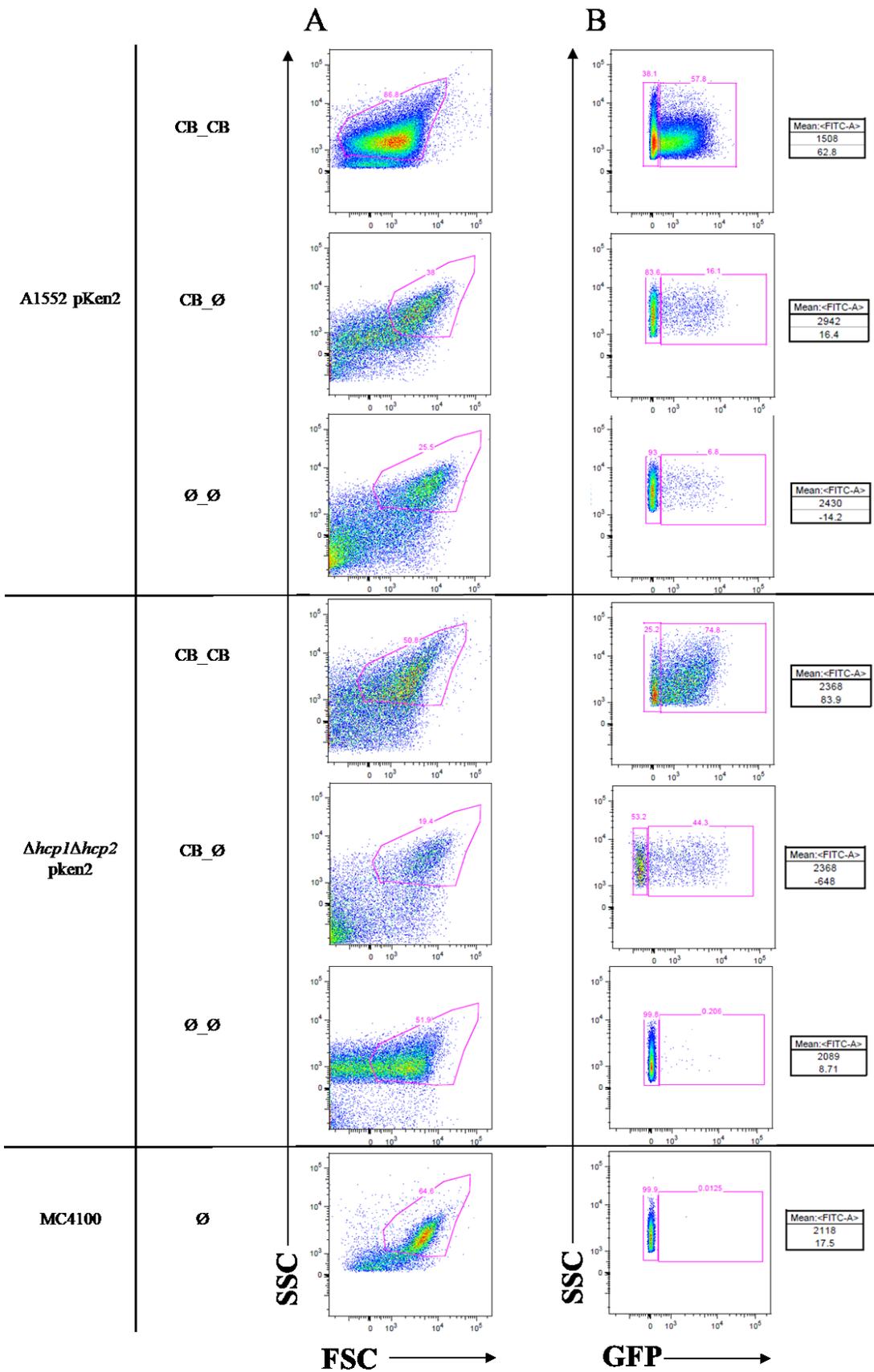
D'après les dénombrements des souches MC4100 d'*E. coli* et A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de *Vibrio cholerae*, les concentrations en antimicrobiens utilisées n'affectent pas la croissance sur boîte LB 2% NaCl et semblent même l'induire, permettant alors de conclure que ces concentrations peuvent être utilisées pour la suite des expérimentations (Figure 17).

3.1.2 Identification des deux espèces après interactions

Après la mise en contact des deux espèces bactériennes, il faut être capable de différencier *Vibrio cholerae* d'*Escherichia coli* afin de quantifier leur présence respective.

3.1.2.1 Quantification des deux espèces par différence de fluorescence mesurée en cytométrie en flux

Afin de différencier A1552 de MC4100, un plasmide portant le gène de la GFP a été introduit dans les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$. Cependant, ce plasmide porte la résistance à la carbénicilline (CB), l'un des antibiotiques étudié. De ce fait des tests sont ici réalisés afin de voir si en ne maintenant pas la sélection à la CB, les bactéries peuvent garder le plasmide. Deux cultures de nuit sont donc réalisées, une culture avec la carbénicilline et l'autre sans l'antibiotique de sélection (A1552pKen2 \emptyset et A1552pKen2 CB et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 CB). Puis ces cultures de nuit sont relancées en culture de jour dans du LB avec 2% de NaCl; la culture de nuit sans la sélection est relancée toujours sans ATB (A1552pKen2 \emptyset _ \emptyset et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset _ \emptyset) et la culture de nuit où la sélection a été maintenue et relancée avec ou sans sélection, respectivement A1552pKen2 CB_CB, A1552pKen2 CB_ \emptyset et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 CB_CB et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ pKen2 \emptyset _ \emptyset . En parallèle, une culture de nuit puis de jour de la souche MC4100 a aussi été réalisée pour servir de contrôle négatif GFP-. Les deux espèces sont ensuite mises en contact ou laissées seules et déposées sur LBA avec 2% de NaCl, sans antibiotique ou, pour les cultures où la sélection a toujours été maintenue, sur LBA contenant la CB. Après 3 heures d'incubation, la fluorescence des échantillons est quantifiée par cytométrie en flux (Figures 18 et 19).



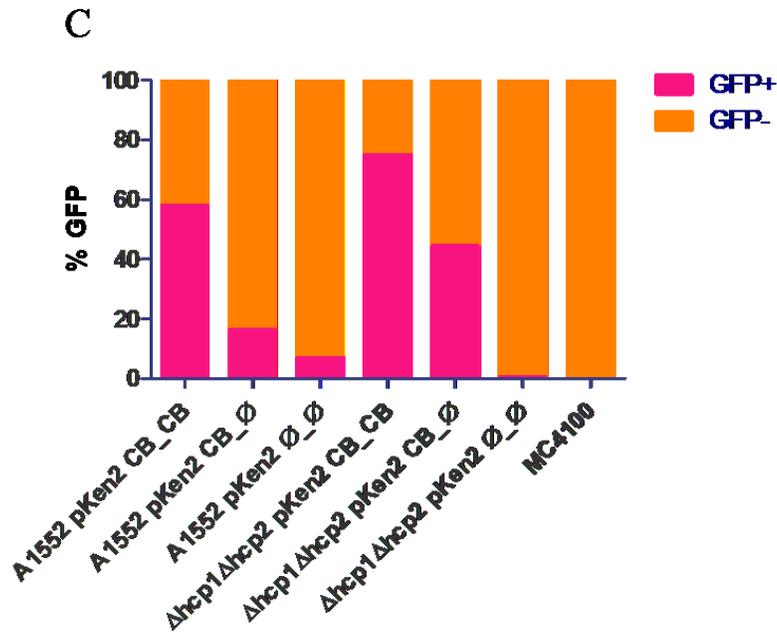
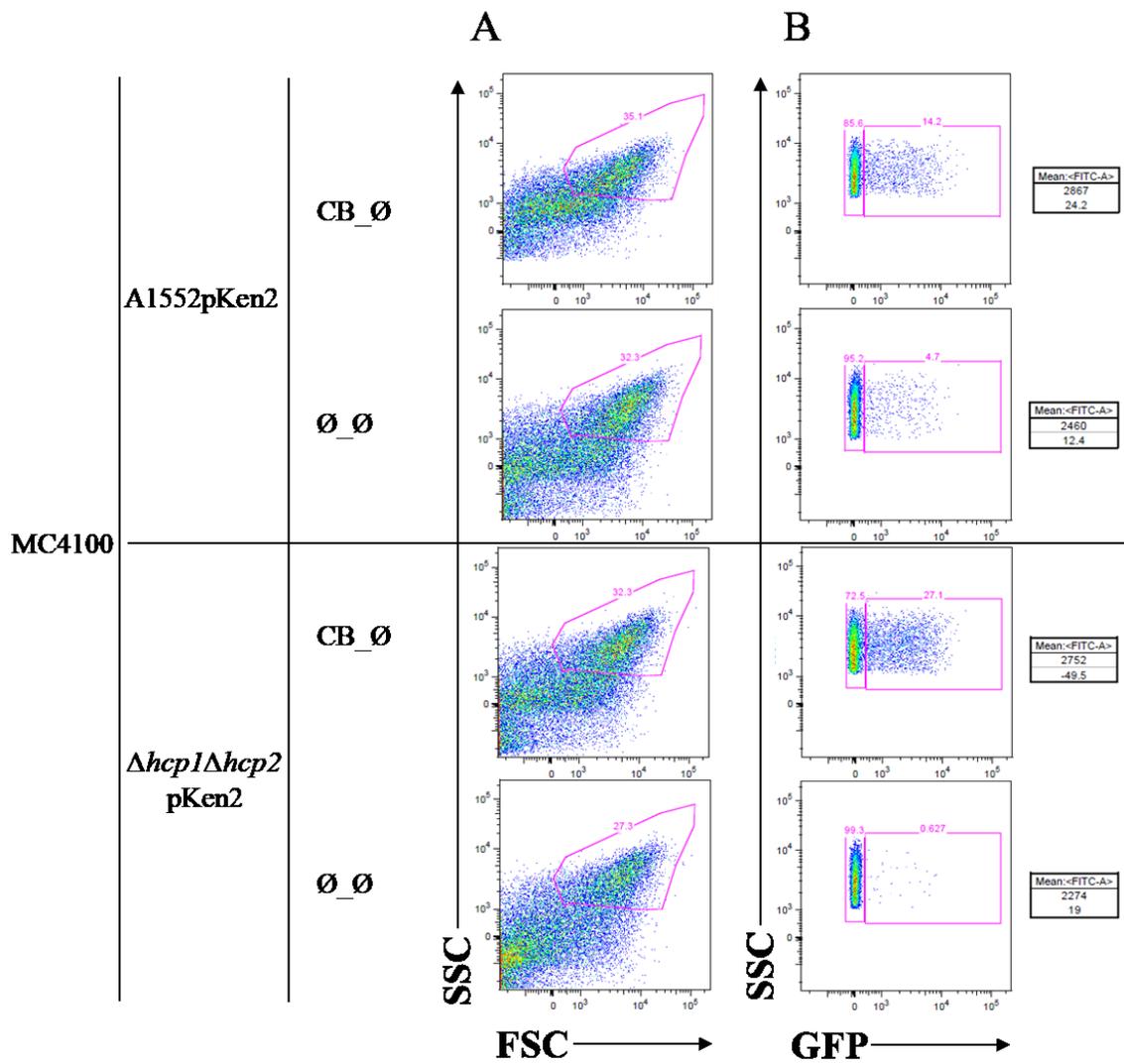


Figure 18. Quantification des bactéries GFP positives et négatives parmi les bactéries A1552pKen2, A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 ou MC4100 laissées seules et dont la sélection antibiotique pour le plasmide pKen2 a été maintenue O/N, O/D ou n'a jamais été maintenue, montrant un faible pourcentage de bactéries GFP positives.

Les cultures sont déposées sur LBA 2% NaCl sans antibiotique ou LBA contenant la CB à 100 µg/mL puis incubées 3 heures. Par la suite, les spots sont récupérés et lavés au PBS. Les échantillons sont alors passés au cytomètre en flux (BD Canto II, FSC :523V; SSC :586V). Après avoir sélectionné la population bactérienne (A), le pourcentage de bactéries GFP positives et négatives est évalué (B), puis l'intensité de fluorescence (Mean :<FITC-A>) est mesurée dans chacune de ces deux populations, respectivement, GFP positive (haut) et GFP négative (bas). L'analyse des résultats a été faite grâce au logiciel flowJO version 9.3.2. C) Représentation graphique du pourcentage de GFP positives et négatives parmi toutes les cellules de la population.



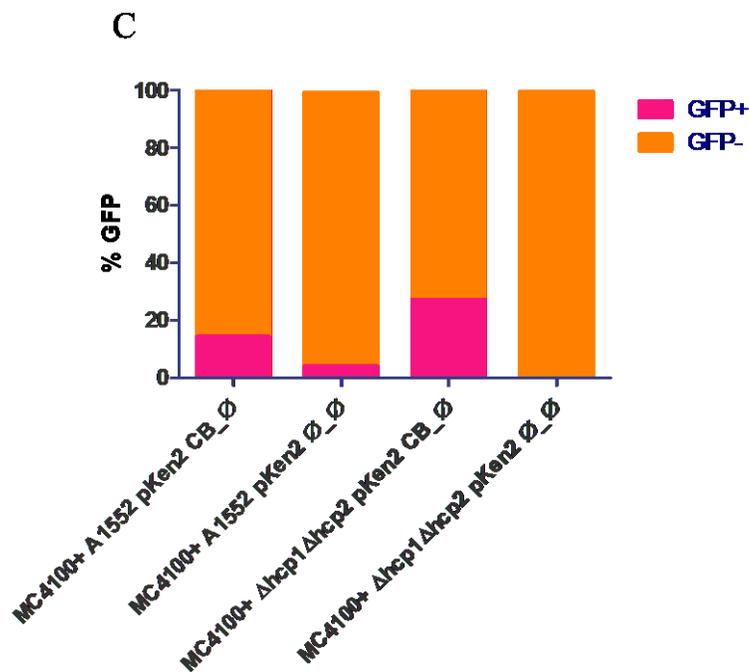


Figure 19. Quantification des bactéries GFP positives et négatives parmi le total de bactéries A1552pKen2 et A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 mises en interaction avec MC4100 dont leur sélection antibiotique pour le plasmide pKen2 a été maintenue en culture O/N, O/D ou n'a jamais été maintenue, montrant un faible pourcentage de bactéries GFP positives.

Les cultures des deux espèces mises en contact sont déposées sur LBA 2% NaCl sans antibiotique puis incubées 3 heures. Par la suite, les spots sont récupérés et lavés au PBS. Les échantillons sont alors passés au cytomètre en flux (BD Canto II, FSC :523V; SSC :586V). Après avoir sélectionné la population bactérienne (A), le pourcentage de bactéries GFP positives et négatives est évalué (B), puis l'intensité de fluorescence (Mean :<FITC-A>) est mesurée dans chacune de ces deux populations, respectivement, GFP positive (haut) et GFP négative (bas). L'analyse des résultats a été faite grâce au logiciel flowJO version 9.3.2. C) Représentation graphique du pourcentage de GFP positives et négatives parmi toutes les cellules de la population.

Les résultats de cytométrie en flux indiquent que seulement 0.01% des bactéries de la souche MC4100 échantillonnées sont GFP+, confirmant que cette souche est effectivement GFP- (Figure 18). En effet, la souche MC4100 ne porte pas le plasmide pKen2 et ne possède pas naturellement les gènes de la GFP. Concernant les souches A1552pKen2 et A1552Δhcp1Δhcp2pKen2, il est, tout d'abord, possible d'observer que lorsque la sélection à

l'antibiotique n'est pas maintenue durant toute la culture ou seulement en culture de jour, le pourcentage des souches GFP+ diminue drastiquement (Figure 18). En effet, lorsque la sélection à la CB n'est pas maintenue en culture de jour, A1552pKen2 CB_Ø et A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 CB_Ø, ¼ des bactéries perdent le plasmide et lorsque la sélection n'est jamais maintenue, A1552pKen2 Ø_Ø et Δhcp1Δhcp2pKen2 Ø_Ø, la majorité des bactéries peuvent perdre le plasmide (Figure 18). Cependant, l'analyse indique que les souches A1552pKen2 CB_CB et A1552Δhcp1Δhcp2pKen2 CB_CB, où la sélection a toujours été maintenue, ne sont qu'à, respectivement, 57.8% et 74.6% GFP+. Ceci suggère que lors de la quantification des souches après les interactions, il ne sera pas possible de discriminer toutes les *Escherichia coli* (GFP-) des *Vibrio cholerae* (GFP+). Les tests d'interactions ont, cependant, été réalisés et une majorité des bactéries échantillonnées sont GFP- alors que les ratios entre les deux souches priorisaient *Vibrio cholerae* (GFP+) (Figure 19). Cette méthode de distinction entre les deux espèces ne peut donc pas être utilisée.

3.1.2.2 Identification des deux espèces par production de bêta-galactosidase

Les deux souches A1552 WT et Δhcp1Δhcp2 ont été auparavant transformées et portent une insertion chromosomique du gène *lacZ*, codant la bêta-galactosidase. De ce fait, après avoir mis en contact les deux espèces et fait des dilutions en série de la culture, les bactéries sont étalées sur boîte avec X-gal. Les colonies bleues sont donc *Vibrio cholerae* et les colonies blanches sont *Escherichia coli* (Tableau VII).

Tableau VII. Apparence des colonies des souches MC4100 d'*E. coli* et A1552 WT et Δhcp1Δhcp2 de *V. cholerae* sur boîte avec X-Gal après 3h d'interaction.

Apparence des colonies		
Bactéries seules	A1552	Bleues mais certaines sont blanches
	Δhcp1Δhcp2	Bleues mais certaines sont blanches
	MC4100	Blanches
Interactions	A1552+ MC4100	Tapis avec mélange de bleu et blanc
	Δhcp1Δhcp2 +MC4100	Tapis avec mélange de bleu et blanc

D'après le tableau VII, toutes les *Vibrio cholerae*, souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ ne sont pas bleues, de ce fait la discrimination entre les deux espèces bactériennes ne peut pas se faire précisément. De plus, lors des interactions, le ratio utilisé entre les deux espèces est en faveur de *Vibrio cholerae*, induisant donc lors de l'étalement un tapis de cette espèce sur les boîtes de sélection à la *bêta*-galactosidase. Il est donc préférable de pouvoir sélectionner les deux espèces indépendamment.

3.1.2.3 Sélection par antibiotiques des trois souches, A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et

MC4100

Afin de dénombrer les bactéries en fin de compétition, la sélection de chacune des souches est nécessaire. De ce fait, la souche MC4100 étant résistante à la streptomycine et pas les souches A1552 WT et mutantes, *E. coli* est sélectionnée sur milieu LB contenant de la streptomycine à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ sont, quant à elles, résistantes à la rifampicine et donc sélectionnées sur LB contenant de la rifampicine à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puisque la souche MC4100 y est sensible à cette concentration (Figure 20).

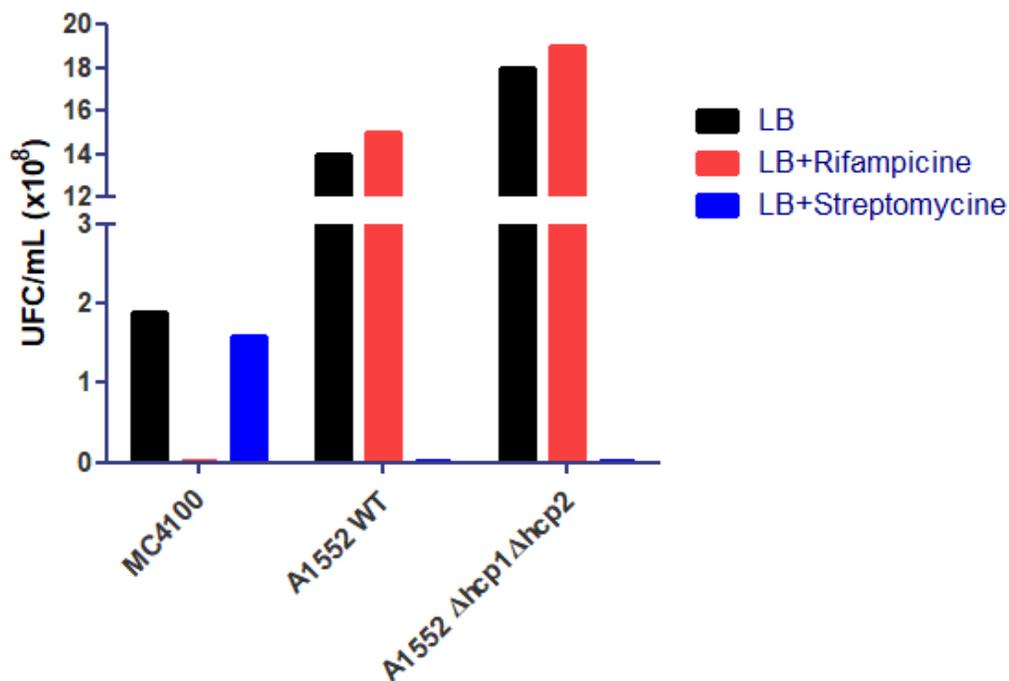


Figure 20. Sélection des souches MC4100 d'*E. coli* et A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ de *Vibrio cholerae* sur LBA streptomycine ou rifampicine, où *E. coli* est résistante à la streptomycine et *V. cholerae* est résistante à la rifampicine.

La souche MC4100 est sensible à la dose de 50 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicine et les souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ sont sensibles à la streptomycine à 50 $\mu\text{g/mL}$.

La figure 20 indique clairement que la souche MC4100 d'*E. coli* est bien sensible à la rifampicine à 50 $\mu\text{g/mL}$ et qu'elle est bien résistante à la streptomycine 50 $\mu\text{g/mL}$. De plus, les deux souches de *Vibrio cholerae* sont bel et bien résistantes à la rifampicine et sensible à la streptomycine. De ce fait, la sélection des deux espèces bactériennes par les antibiotiques streptomycine et rifampicine sera utilisée lors des interactions.

3.1.3 Paramètres de compétitions inter bactériennes

Les compétitions inter bactériennes sont couramment utilisées dans les projets ayant pour sujet d'étude le SST6. Les conditions d'interactions, comme le temps d'interaction, le ratio à utiliser et le milieu dans lequel se font les compétitions inter bactériennes ont au préalable étaient mises au point et ont fait l'objet de plusieurs publications. Cependant, ces conditions dépendent grandement des bactéries mises en interactions et du fait des multiples

paramètres entrant en jeu et pouvant alors faire évoluer le résultat final, nous avons voulu tester plusieurs conditions afin établir des paramètres dans lesquels la modulation par les antimicrobiens, vue en analyse protéomique (spectrométrie de masse et Western blot), se traduirait le mieux dans les taux de fatalité d'*Escherichia coli* en compétition avec *Vibrio cholerae*.

3.1.3.1 Essais de différents temps d'interaction

Quatre temps de compétition ont été testés, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures. La souche sauvage A1552 a été mise en contact avec MC4100 puis elles ont été dénombrées en utilisant la sélection par antibiotiques (rifampicine et streptomycine, respectivement) (Figure 21).

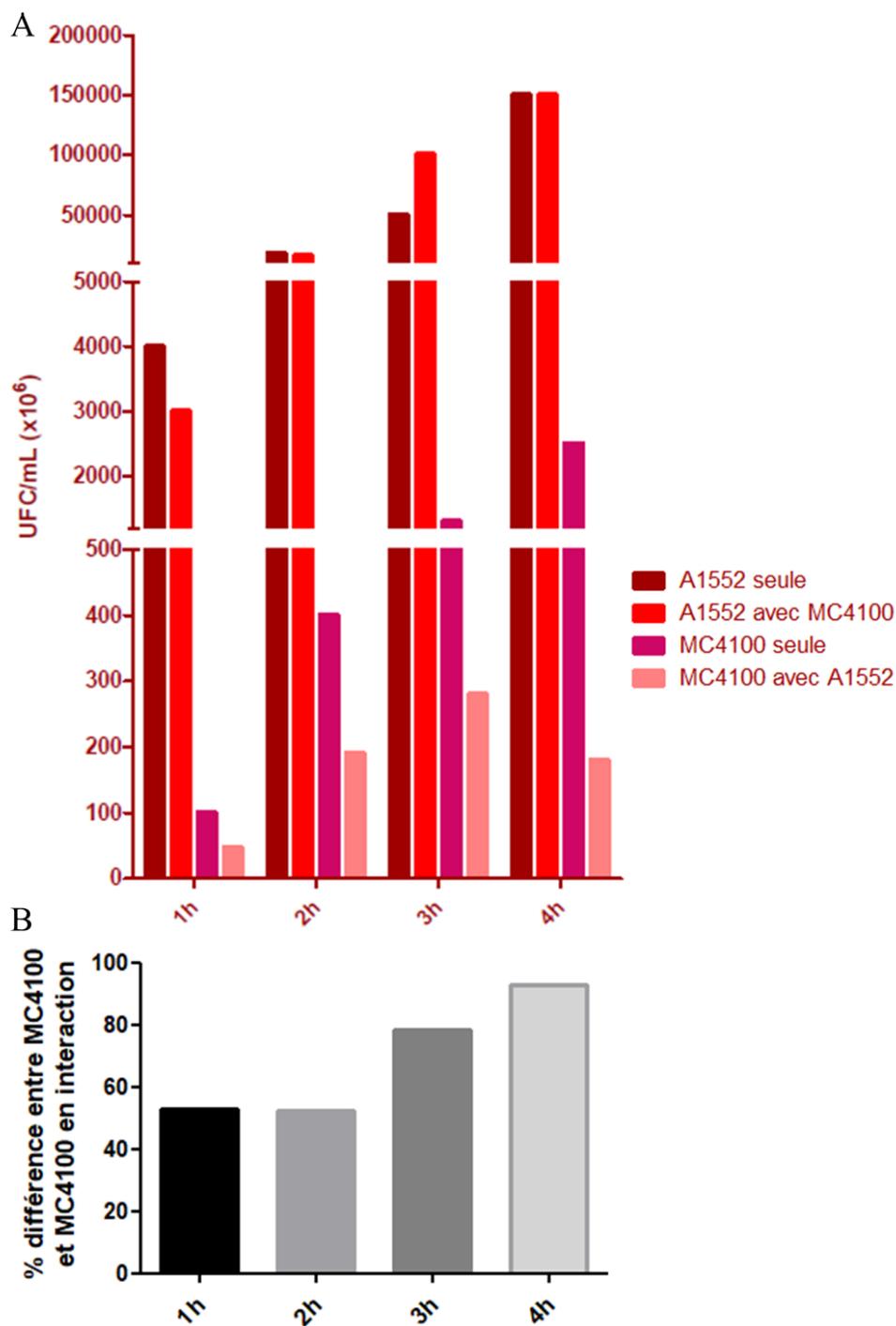


Figure 21. Dénombrement des deux espèces et pourcentage de différence entre *E. coli* en interaction et seule en fonction des temps de compétition.

A) Dénombrement de MC4100 et A1552 WT après différents temps d'interaction et après respectivement sélection à la streptomycine ou à la rifampicine B) pourcentage de la différence entre le nombre de colonies de la souche MC4100 incubée seule ou avec A1552.

Les dénombrements bactériens en figure 21A, semblent indiquer que c'est à partir de 3 heures d'interaction que la souche A1552 pousse mieux en présence de sa proie MC4100 et la figure 21B montre que c'est aussi à partir de 3 heures que la différence entre le nombre de colonies de la souche d'*E. coli* seule et en interaction est augmentée (26%) et cette différence est d'autant plus marquée à 4 heures d'interaction. Nous choisirons donc de travailler avec 3 heures d'interactions entre les deux espèces bactériennes, temps d'interaction nous permettant d'allier les contraintes de la réalisation technique (plus de 8 heures de manipulations) à un temps d'interaction suffisamment long pour tuer plus de 75% des *E. coli*.

3.1.3.2 Essais de différents ratios entre les deux espèces

Le ratio entre les deux espèces bactériennes est un paramètre important des compétitions inter bactériennes. Dans la littérature, le ratio souvent appliqué est une MC4100 pour quatre A1552 (1/4), ratio volumique, ne prenant donc pas en compte la différence de DO_{600nm} entre les deux cultures. Ainsi, les souches, sauvage et double mutante, d'A1552 ont été mises en contact avec MC4100 pendant 3 heures, en utilisant donc les différents ratios testés puis elles ont été dénombrées par sélection aux antibiotiques (rifampicine et streptomycine, respectivement) (Figure 22). À la suite des dénombrements, le taux de mortalité d'*Escherichia coli* face à *Vibrio cholerae* a été calculé. Ce taux prend en compte le nombre de colonies de MC4100 seule auquel est divisé la différence entre le nombre de colonies de MC4100 mise en interaction avec le double mutant du SST6 et le nombre de colonies de MC4100 avec A1552 sauvage. Ce taux est exprimé en pourcentage et est le témoin de la capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli*.

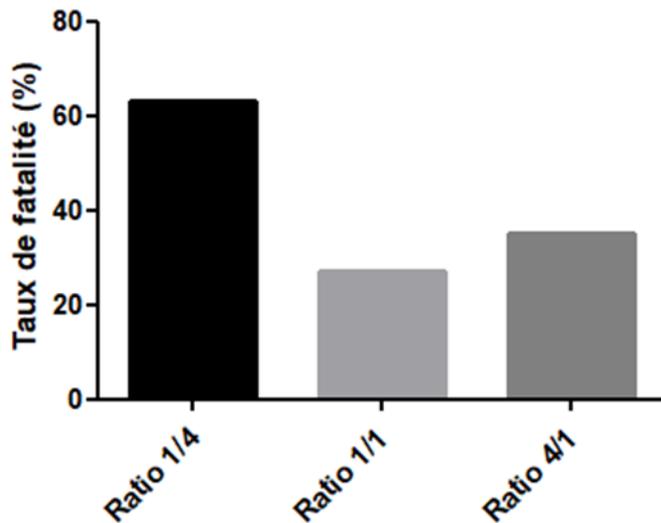


Figure 22. Taux de fatalité de la souche MC4100 face à la souche A1552 WT après l'utilisation de trois ratios entre les deux espèces lors des tests de compétition.

Le ratio 1/4 représente 1 volume de culture de MC4100 pour 4 volumes de culture de A1552 WT ou $\Delta hcp1\Delta hcp2$, le ratio 1/1 traduit qu'il y a autant de culture de MC4100 que d'A1552 WT ou $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et le ratio 4/1 représente 4 volumes de culture de MC4100 pour 1 volume de cultures d'A1552 WT ou $\Delta hcp1\Delta hcp2$.

La figure 22 démontre bien que le ratio induisant un plus haut taux de fatalité pour la souche MC4100 est le ratio 1/4 où 1 volume de culture d'*E. coli* a été mis au contact de 4 volumes de culture de *Vibrio cholerae* sauvage ou mutante, ce sera donc le ratio qui sera utilisé. Ce ratio permet à *V. cholerae* de tuer plus de 60% des *E. coli*, en 3h d'interaction.

3.1.3.3 Étude de la sécrétion par le SST6 lors des tests de compétition

Lors des tests de compétition, les protéines et autres effecteurs sécrétés par le SST6 de la bactérie sont, entre autres, dans les bactéries cibles mais aussi perdus dans le milieu de culture. Ceci ne permet donc pas d'évaluer le niveau d'activation du SST6 de *V. cholerae*. De ce fait, une membrane de cellophane a été placée entre le milieu de culture et le spot de culture bactérienne. Ainsi à la fin de l'interaction la membrane est lavée puis les bactéries et protéines sécrétées sont récupérées. Un dénombrement des bactéries est réalisé et un Western blot anti Hcp est aussi réalisé afin d'apprécier la sécrétion de cette protéine et donc le niveau

d'activation du SST6. Cependant la membrane de cellophane utilisée n'a pas été assez poreuse pour laisser passer les nutriments du milieu de culture, ainsi aucune bactérie n'a pu être dénombrée puisqu'elles ont été tuées lors des quatre heures d'incubation; le Western blot n'a donc pas été réalisé.

3.2 Compétitions entre *Vibrio cholerae* traitée aux antimicrobiens et

Escherichia coli

À la suite des mises au point, les compétitions inter bactériennes peuvent être réalisées. Ainsi, *Vibrio cholerae* est cultivée en bouillon jusqu'à la phase de croissance connue comme celle où le SST6 est actif ($DO_{600nm}=2$), puis les deux espèces bactériennes sont mises en contact pendant 3 heures à un ratio une *Escherichia coli* pour quatre *Vibrio cholerae* sur un milieu LBA 2% NaCl. Les deux espèces sont ensuite dénombrées en utilisant la méthode de sélection par antibiotique.

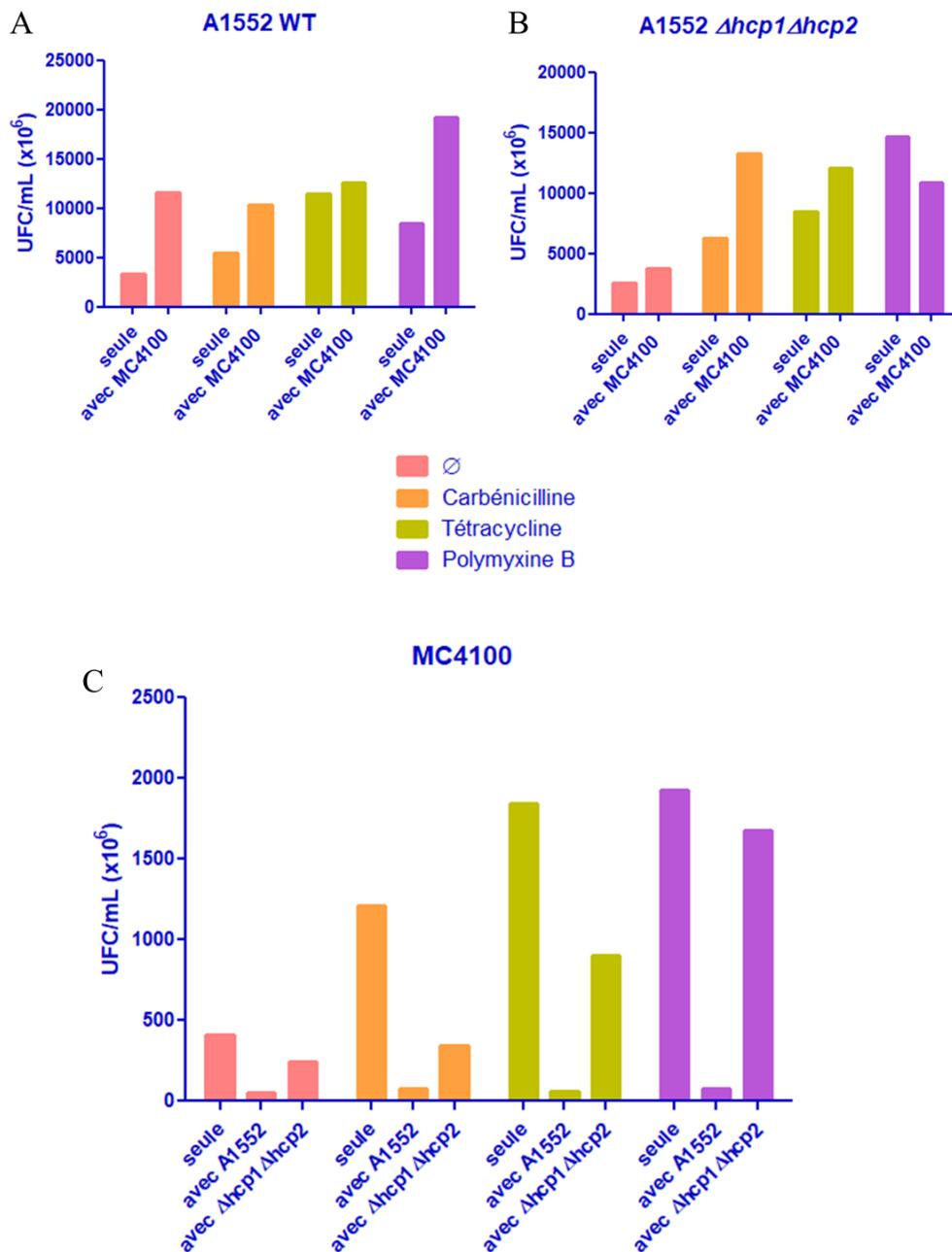


Figure 23. Dénombrement des souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et MC4100 à la suite de 3h de compétition inter bactérienne.

A) et B) Dénombrement des souches de *V. cholerae* en interaction avec *E. coli*. C) Dénombrement de MC4100 en interaction avec A1552 SST6+ (WT) ou SST6- ($\Delta hcp1\Delta hcp2$). A) B) et C) Après les trois heures d'interaction les spots de bactéries sont récupérés, dilués 10⁶ fois puis étalés sur boîtes LB contenant la rifampicine à 50 µg/mL (sélection des *V. cholerae*) et sur boîtes LB contenant la streptomycine à 50 µg/mL (sélection des *E. coli*) (n=1).

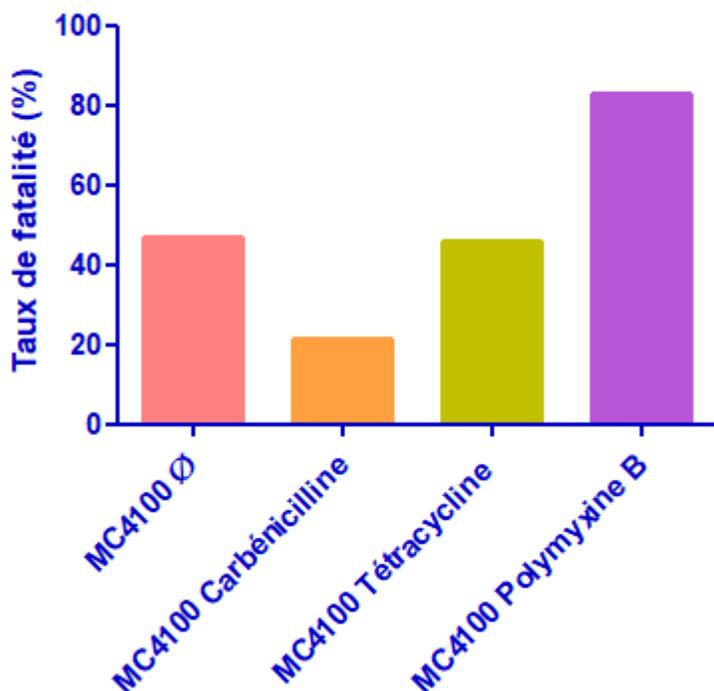


Figure 24. Taux de fatalité de la souche d'*Escherichia coli* MC4100 face à *Vibrio cholerae* A1552 traitée avec différents antimicrobiens.

Premièrement, lorsque l'on compare les dénombrements des bactéries seules et en interaction, indépendamment, en fonction des traitements antimicrobiens, les graphiques de la figure 23 indiquent que les antimicrobiens utilisés ne tuent pas les trois souches bactériennes utilisées mais il paraît même que les bactéries traitées sont plus nombreuses en fin de culture que les bactéries n'ayant pas reçu de traitements antimicrobiens. De plus, lorsque l'on étudie les trois souches indépendamment, le graphique de la figure 23A indique que le nombre de colonies de la souche A1552 sauvage en fin d'interaction est plus important que le nombre de colonies lorsque cette souche est seule et ce quel que soit le traitement antimicrobien (cette observation avait déjà été faite lors des tests des différents temps d'interaction). Il en est de même pour la souche A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$, qui lorsqu'elle est mise en interaction avec M4100 paraît mieux pousser que lorsqu'elle est seule et ce même avec un traitement antimicrobien, sauf avec la PmB où le nombre de colonies après interaction est inférieur au nombre de colonies où la souche a été seule (Figure 23B). Ces observations montrent que lorsque *Vibrio cholerae* est en interaction avec *Escherichia coli*, elle semble trouver avantage de cette interaction en poussant mieux. En ce qui concerne les dénombrements de la souche MC4100,

il est clairement remarquable que lorsque la souche MC4100 est en interaction avec la souche A1552 sauvage, le nombre de colonies diminue de plus de 80% et ce quel que soit le traitement antimicrobien. Cette diminution drastique s'explique par l'activité du SST6 chez la souche sauvage. Cependant, lorsque MC4100 est en interaction avec le double mutant du SST6, *A1552Δhcp1Δhcp2*, une diminution de 50% du nombre de colonies de MC4100 est aussi observable. Ceci démontre que *Vibrio cholerae* a la capacité de tuer la souche MC4100 par un autre mécanisme que le SST6 et ce toujours quel que soit le traitement antimicrobien. De plus, le graphique de la figure 23B indiquait que lors du traitement à la PmB, le nombre de colonies de la souche *A1552Δhcp1Δhcp2* était inférieur en interaction que seule, mettant alors en lumière un effet de la PmB, lors de la mise en contact des deux espèces bactériennes. Le graphique de la figure 23C indique, quant à lui, que la diminution du nombre de colonies de MC4100 lors du traitement à la PmB avec la souche double mutante est bien moins importante, seulement 12% de perte d'*E. coli* contre 50%, ceci sûrement dû à l'effet de la PmB et au nombre moins important de *Vibrio cholerae* *Δhcp1Δhcp2*.

En ce qui concerne les taux de fatalité d'*Escherichia coli* face à *Vibrio cholerae*, celui-ci est calculé en prenant compte le nombre de colonies de MC4100 seule auquel est divisé la différence entre le nombre de colonies de MC4100 mise en interaction avec le double mutant du SST6 et le nombre de colonies de MC4100 avec A1552 sauvage. Ce taux est exprimé en pourcentage et est le témoin de la capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli*. Ainsi, d'après la figure 24, le taux de fatalité de la souche MC4100 lorsqu'A1552 est traitée à la CB, est diminué de près de 50%. La CB diminuerait donc la capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli* alors que nous avons vu que la CB induisait l'activité du SST6.

Le traitement à la TC n'aurait pas d'effet sur la capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli* puisque les taux de fatalité entre le contrôle et le traitement sont égaux. Lors des WB, nous avons identifié une modulation de la cinétique d'action du SST6 par la TC mais aucune modulation quant à l'intensité d'activité de celui-ci, ce qu'il se traduit lors de ces tests de mises en contact.

Le taux de fatalité de la souche MC4100 lorsqu'A1552 est traitée à la PmB est augmenté de près de 50% comparée au taux de fatalité de MC4100 lorsqu'elle est en interaction avec A1552 qui n'a pas été traitée à un antimicrobien. Cette augmentation de la fatalité indiquerait

donc une plus forte capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli* grâce au traitement à la PmB; PAM dont nous avons vu qu'il induisait l'activation du SST6.

Ces tests d'interaction sont des tests faisant intervenir beaucoup de paramètres qui pourraient influencer les taux de mortalité de MC4100 finaux. De ce fait, il est primordial de les répéter afin de s'assurer de la reproductibilité de ces résultats, puisqu'ici n=1 seulement.

4 Évaluation du Système de Sécrétion de Type VI comme facteur de résistance aux antimicrobiens

Dans cette partie de l'étude, nous nous concentrerons sur l'analyse du rôle du SST6 dans la résistance aux antimicrobiens. En effet, nous voulons déterminer si la modulation du SST6, précédemment observée, est le résultat de l'activation du SST6 comme mécanisme de résistance aux antimicrobiens. En d'autres termes, nous chercherons à déterminer si le SST6 permet la sécrétion d'effecteurs de résistance aux antimicrobiens. De ce fait, le double mutant $\Delta hcp1\Delta hcp2$, n'ayant plus le SST6 fonctionnel va être étudié et comparé à la souche sauvage.

4.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la souche

A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$ et rappel pour la souche sauvage

Afin de mesurer si le SST6 amène une résistance accrue aux antimicrobiens, les CMI des antibiotiques ici étudiés ont été effectuées sur la souche A1552 $\Delta hcp1\Delta hcp2$. Aucune différence n'a été observée entre les CMI des antibiotiques de la souche sauvage et mutante (Tableau VIII). De ce fait, la souche double mutante pour le SST6 n'est pas plus sensible ou résistante aux antibiotiques que la souche sauvage, démontrant ainsi que pour les conditions de tests des CMI, le SST6 n'amène pas de résistance accrue aux antibiotiques.

Tableau VIII. Concentrations minimales inhibitrices des ATB pour les souches A1552 WT et

Souches A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$	et $\Delta hcp1\Delta hcp2$. Traitements	Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques ($\mu\text{g/mL}$)
	Aucun traitement	Ø
	Carbénicilline	50
	Tétracycline	3.2
	Chloramphénicol	0.8
	Kanamycine	25.6

4.2 Essais de contact entre les antimicrobiens à fortes doses et les souches

A1552 WT et $\Delta hcp1\Delta hcp2$

Comme aucune différence de CMI entre les deux souches, sauvage (SST6+) et mutante (SST6-) n'a été observée, un nouveau test est réalisé toujours afin de s'assurer que le SST6 n'apporte pas une résistance accrue aux antimicrobiens. De ce fait, les bactéries en condition latente (milieu de culture remplacé par du PBS) sont mises en contact 1h avec d'importantes concentrations en antimicrobiens correspondantes à 1/2 des CMI (Figure 25A). Ceci permettra, après dénombrement des colonies formées, une meilleure appréciation des différences de résistance entre les deux souches (Figure 25B).

A

Souches A1552 WT et <i>Δhcp1Δhcp2</i>	Traitements	Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations d'utilisation des antibiotiques ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations testées lors des tests de contacts ($\mu\text{g/mL}$)
	Aucun traitement	Ø	0	0
	Carbénicilline	50	0.78	25
	Tétracycline	3.2	0.05	1.6
	Polymyxine B	Ø	0.39	11.75

B

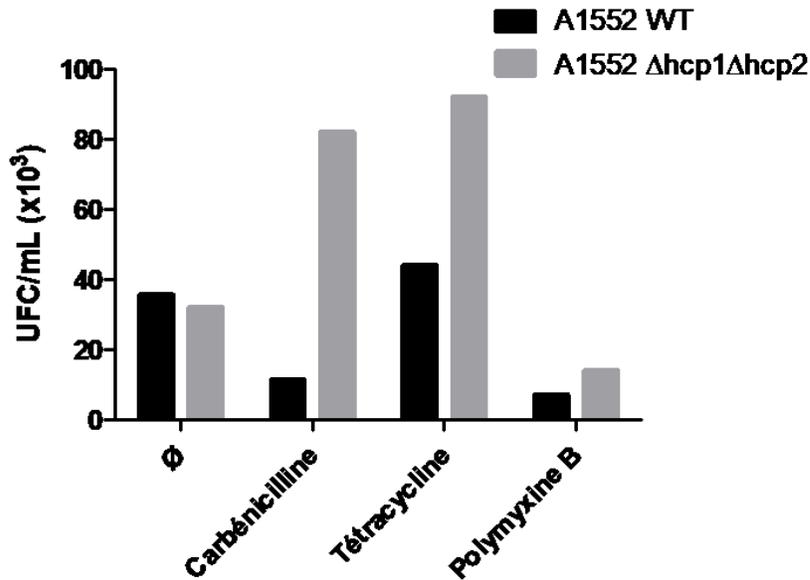


Figure 25. Dénombrement des deux souches SST6+ et SST6- après 1 heure de contact avec d'importantes concentrations en antimicrobiens, où la souche SST6- semble mieux résister aux antimicrobiens.

A) Concentrations des différents antimicrobiens utilisés en fonction des CMI et des concentrations d'utilisation pour les souches A1552 WT (SST6+) et $\Delta\text{hcp1}\Delta\text{hcp2}$ (SST6-). B) Dénombrement des UFC/mL des souches SST6+ et SST6- après 1 heure de contact avec les antimicrobiens.

Le graphique de la figure 25B montre qu'en présence de fortes concentrations en antibiotiques (CB et TC) ou en PAM (PmB), la souche A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* (SST6-) semble mieux pousser et mieux résister que la souche A1552 sauvage (SST6+). Cette indication serait le signe qu'en absence du SST6 fonctionnel, *Vibrio cholerae* serait en mesure de mieux résister aux actions des antimicrobiens. Le graphique démontre donc bien que le SST6 n'apporte pas une résistance accrue aux antimicrobiens et donc que les modulations vues sur le SST6 sont probablement le résultat d'une adaptation de *Vibrio cholerae* à un environnement changeant, pouvant indiquer la présence de compétiteurs producteurs de PAM ou d'ATB.

Discussion

Vibrio cholerae est une bactérie environnementale aquatique ayant la capacité de coloniser le tractus digestif de l'Homme et induire des symptômes diarrhéiques grâce à ces facteurs de virulence, aussi exprimés lorsque la bactérie est dans l'eau (Colwell et al., 1996). Le choléra est une maladie encore à ce jour classée par l'OMS comme un problème majeur de santé publique et dont le traitement le plus efficace reste la réhydratation et l'administration de sels permettant la compensation des pertes d'électrolytes et d'eau (Ali et al., 2015). Les cas sévères de choléra peuvent être traités par antibiotiques où la durée et l'intensité des symptômes seront raccourcies, ce qui permet alors une diminution de la probabilité de propagation de la maladie (Towner et al., 1980). Cependant les traitements antibiotiques induisent chez *Vibrio cholerae* la mise en place de mécanismes de résistance alors que la bactérie est déjà fréquemment en contact avec des molécules antimicrobiennes dans son environnement aquatique et chez son hôte (Garg et al., 2001). En effet, les eaux des rivières et les environnements aquatiques de manière générale sont aujourd'hui pollués par de petites doses en antibiotiques rejetés par les déchets médicaux et de l'agriculture (Larsson, 2014). De plus, lorsque *Vibrio cholerae* colonise le tractus digestif de l'Homme elle se retrouve confrontée à des doses variables en peptides antimicrobiens de système immunitaire inné et du microbiote intestinal (Destoumieux-Garzón et al., 2014). Les molécules antimicrobiennes sont, de plus; connues pour leurs capacités de modulation d'expression des gènes de virulence des pathogènes à des doses sous-létales (Romero et al., 2011). De ce fait les objectifs de ce projet ont été d'analyser la modulation que pourraient avoir certains peptides antimicrobiens d'origine bactérienne et certains antibiotiques sur un facteur de virulence particulier de *Vibrio cholerae* qui est le Système de Sécrétion de Type VI (SST6). En effet, le SST6 est un facteur de virulence qui paraît indispensable à la bactérie lors de l'établissement de la colonisation dans l'hôte grâce à ses capacités de compétition avec le microbiote intestinal et de défense contre les cellules immunitaires eucaryotes (Pukatzki et al., 2006), (MacIntyre et al., 2010). De plus, le SST6 est aussi important à *Vibrio cholerae* lorsqu'elle se retrouve dans l'environnement aquatique puisqu'il lui permet de résister aux attaques de prédateurs eucaryotes et de compétitionner avec les autres espèces bactériennes et donc de survivre dans l'eau (Ishikawa et al., 2009). Ainsi la compréhension de la modulation par les antimicrobiens,

à des doses sous létales, du SST6 pourrait permettre de trouver une alternative aux traitements du choléra permettant l'inhibition de la colonisation intestinale par *Vibrio cholerae* sans induire de pression sélective et donc de population de souches résistantes.

L'étude s'est alors portée sur l'analyse comparative par spectrométrie de masse quantitative des protéines du SST6 qui sont sécrétées et retrouvées dans les différents compartiments cellulaires en réponse à une exposition sous-létale en PAM d'origine bactérienne. Nous avons pu, ainsi, voir que certains PAM avaient la capacité de moduler positivement ou négativement le SST6. Ces résultats ont alors été confirmés par WB dirigés contre la protéine Hcp, qui est le témoin d'activation du SST6. Il a ainsi pu être mis en évidence l'effet activateur de la Polymyxine B (PmB) sur le SST6 et un effet potentiellement répresseur ou inhibiteur des autres PAM sur la sécrétion. De plus, afin de compléter l'étude, la modulation de certains antibiotiques a aussi été analysée par WB dirigés contre plusieurs protéines du SST6 dont VipB, ClpV, TseL et Hcp. Là encore, certains ATB ont montré un pouvoir activateur du SST6, comme la CB, mais d'autres ATB comme le CM semblent avoir un effet inhibiteur du SST6. La TC semble quant à elle, moduler la cinétique d'activation du SST6 en l'anticipant plutôt que de modifier quantitativement son activation. À la suite de ces WB, l'analyse de la modulation des antimicrobiens sur le SST6 a été poursuivie par l'étude de la capacité bactéricide du système. En effet, lorsque le SST6 est actif, il présente une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* en test de compétition inter-bactérienne. Nous avons donc voulu mettre en évidence les effets activateurs ou inhibiteurs des antimicrobiens sur la capacité du SST6 à tuer la bactérie. Ainsi, l'effet activateur de la PmB sur le SST6 est encore visible en tests de compétitions mais les effets de la CB et de la TC n'ont pas pu être appréciés lors de ces tests. Puis l'étude s'est poursuivie par l'évaluation de la résistance aux antimicrobiens apportée par le SST6. Ainsi, aucune différence de CMI n'a été observée entre les deux souches SST6+ et SST6- et lorsque ces souches sont mises en contact avec de fortes concentrations en antimicrobiens, la souche SST6- paraît plus résistante. De ce fait, le SST6 n'apporterait pas de résistance accrue aux antimicrobiens et son absence permettrait même de mieux y résister.

Lors de cette étude, aucune analyse statistique n'a été réalisée puisqu'il n'a jamais été possible de normaliser le temps de culture de *Vibrio cholerae* pour atteindre la DO_{600nm} d'activation du

SST6 voulue. Ainsi, même si certaines des manipulations ont été faites trois fois et plus, il n'est pas possible de compiler les valeurs des manipulations pour en analyser la reproductibilité. C'est un défaut de l'étude et il serait bien de pouvoir le contourner à l'avenir afin d'être plus confiants dans les résultats présentés. La solution serait de travailler avec une durée de culture fixe et non plus une DO_{600nm} fixe, sous la dépendance que cette durée soit suffisante à l'activation du SST6. Cette activation serait confirmée par WB ou bien par un suivi à temps réel lors de la culture grâce à un système rapporteur tel que les gènes de la luciférase.

1. Analyse du sécrétome et des protéomes cytosolique/périplasmique et membranaire de la souche A1552 sauvage en présence de doses sous-létales en peptides antimicrobiens bactériens

1.1 Détermination des concentrations de travail des peptides antimicrobiens

En ce qui concerne la Microcine C7 (MC7), la Lactocine 705 (Lact705), la Thuricine S (ThuS) et la Microcine J25 (MJ25) aucune concentration minimale inhibitrice (CMI) préalable n'était connue pour la souche A1552 de *Vibrio cholerae*, mais la bactérie est connue pour fortement résister aux PAM. De ce fait, les consignes de suspension du fabricant ont été suivies et les concentrations maximales pouvant être utilisées ont été testées. Les CMI de ces PAM n'ont jamais pu être atteintes malgré les fortes concentrations testées, nous forçant alors à utiliser la plus forte concentration possible et vérifier la croissance et les densités optiques à 600nm (DO_{600nm}) en fin de culture. Ainsi à la fin des cultures, aucun retard de croissance n'a été observé, ce qui nous a permis de nous conforter sur les concentrations utilisées. En ce qui concerne la Polymyxine B (PmB), la concentration de travail pour la souche A1552 est bien connue mais pas pour un milieu de culture avec une forte pression osmotique (2% NaCl). Nous avons donc fait le choix de tester les mêmes concentrations que celles couramment utilisées en CMI en milieu contenant 0.5% de NaCl. La CMI pour la PmB n'a alors pas pu être atteinte, nous indiquant donc que les bactéries sont plus résistantes à la PmB en conditions de forte osmolarité. Les tests de CMI ont tout de même été refaits afin d'obtenir une CMI pour la souche A1552 cultivée en milieu LB à 2% NaCl mais pour l'analyse quantitative des protéines en spectrométrie de masse, nous avons fait le choix de ne pas utiliser une forte concentration

en PmB puisque ces résultats serviront aussi pour l'analyse du protéome d'autres facteurs de virulence étudiés dans le laboratoire.

1.2 Analyse quantitative des protéines du Système de Sécrétion de Type VI par spectrométrie de masse

L'analyse quantitative des protéines du SST6 semble indiquer une induction de la sécrétion de la protéine Hcp par le SST6 lors du traitement à la PmB ainsi qu'une augmentation de la présence à la membrane des protéines allant dans le sens d'une activation du SST6 par la PmB. Ceci confirme une observation faite chez *Pseudomonas aeruginosa* dans l'étude de Ho et al., en 2013, où six fois plus d'ATPase ClpV se retrouvait à la membrane lors du traitement à la PmB. Il avait alors été conclu que la PmB activait le SST6 à cause des dommages créés par l'activité de l'antimicrobien sur les membranes cellulaires (Ho et al., 2013). La Lact705 semblerait, quant à elle, diminuer la sécrétion de la protéine Hcp et séquestrer dans la cellule les protéines de structures et les effecteurs du système, alors que la MC7 semble indiquer une diminution générale des toutes les protéines du SST6. Concernant la sécrétion de la protéine Hcp lors des traitements à la MJ25 et à la ThuS, on observe respectivement, une diminution et une légère augmentation quantitative de Hcp dans le sécrétome. La modulation vue lors des traitements à la Lact705, à la MC7, à la MJ25 et à la ThuS est à confirmer par WB et est le sujet d'un projet à part entière. Ici, l'étude s'est focalisée sur la modulation de la PmB et des antibiotiques sur le SST6.

L'analyse quantitative par spectrométrie de masse n'a été réalisée qu'une seule fois, de ce fait, aucune analyse statistique des résultats ici avancés n'a été réalisée. Les résultats sont donc seulement à considérer comme un point de départ à l'étude de la modulation du SST6 par les PAM d'origine bactérienne.

2. Évaluation par Western blot des effets des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*

La suite de l'étude a donc été réalisée avec les traitements à la PmB et aux antibiotiques dont les CMI et les concentrations de travail ont été établies. Aucun retard de croissance ni modification quantitative lors des traitements antimicrobiens n'ont été observés

confirmant que les concentrations utilisées sont effectivement sous létales. De ce fait, la cinétique de la sécrétion et de la présence dans les bactéries de la protéine Hcp a pu être réalisée. Ainsi, sans traitement antimicrobien nous pouvons remarquer que la sécrétion de la protéine Hcp ne commence réellement qu'à partir de la $DO_{600nm}=2.2$ et que cette protéine Hcp est déjà présente dans les culots à la $DO_{600nm}=1.9$. Effectivement, la régulation du SST6 se fait avec le *Quorum Sensing* et à haute densité cellulaire le système est activé, comme ce que l'on peut voir lors de cette cinétique (Ishikawa et al., 2009), (Joshi et al., 2017).

Puis à la suite des cinétiques de sécrétion et de présence dans les culots bactériens de la protéine Hcp, des WB dirigés contre plusieurs protéines du SST6, VipB, ClpV et TseL, ont été réalisés afin de poursuivre de manière plus globale l'étude de la modulation des antibiotiques sur le SST6; pour ces mêmes échantillons, un WB dirigé contre la protéine Hcp a aussi été réalisé permettant de comparer les deux séries d'échantillonnage. De plus, les cultures utilisées pour la préparation des échantillons de ces WB ont été arrêtées et prélevées aux alentours de la DO_{600nm} à laquelle nous avons vu un maximum de sécrétion de Hcp lors de la cinétique pour le contrôle ($DO_{600nm}=2.2$).

Ainsi, l'analyse de la cinétique en réponse au traitement à la CB montre que cet antibiotique induirait la sécrétion par le SST6 de la protéine Hcp grâce à l'augmentation quantitative de la protéine Hcp dans les bactéries. De plus, les WB dirigés contre les protéines VipB et TseL vont aussi dans le sens d'une augmentation de la présence cellulaire de ses protéines. La CB induirait, donc, chez la souche A1552 de *Vibrio cholerae*, l'activation du SST6, en augmentant la sécrétion de la protéine Hcp et sa présence dans les culots bactériens ainsi que la présence de VipB et TseL. Aussi, il a été montré chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes, qu'un traitement en *bêta*-lactamines en concentrations sous létales augmentait la sécrétion et l'expression de la protéine Hcp et d'un effecteur du SST6 allant donc dans le même sens que notre observation (Liu et al., 2017). La sur-expression des gènes du SST6, ici suggérée par les quantités augmentées des protéines dans les culots bactériens lors des WB pourrait être vérifiée par PCR quantitative (qPCR) sur les ARNm des gènes codant pour ces protéines ou bien sur les premiers gènes des quatre opérons du SST6. En effet, lors de l'analyse des WB il est plus rigoureux d'apprécier les résultats des culots bactériens comme des quantités de protéines présentes dans la cellule et

aux membranes seulement, plutôt que d'extrapoler ces résultats en termes d'expression. Les WB ne sont le reflet que de la dernière étape d'expression des gènes en protéines et de ce fait, plusieurs étapes de régulations post-transcriptionnelles et traductionnelles peuvent en modifier la finalité. Ainsi, les prochaines étapes de l'étude seraient d'analyser les quantités d'ARNm des gènes des protéines du SST6 et plus largement des gènes des régulateurs du SST6 par qPCR, permettant alors de s'affranchir de la régulation post-traductionnelle. De plus, le suivi de l'expression des gènes du SST6 ou des gènes de ses régulateurs pourrait aussi se faire grâce au système rapporteur de la luciférase. Ainsi, en effectuant une construction génétique où les gènes de la luciférase sont introduits en aval des promoteurs des gènes à étudier, la transcription de ces gènes peut être suivie et même quantifiée, *in fine*, grâce à la production et la détection de bioluminescence. Ceci permettrait donc de réaliser un suivi en temps réel de l'expression des gènes du SST6 (ou des gènes des régulateurs du SST6) et donc de pouvoir apprécier en temps réel l'impact des antimicrobiens sur cette transcription.

L'analyse de la cinétique de Hcp en réponse à la TC semble indiquer une activation anticipée de la sécrétion par le SST6, par rapport au contrôle sans antibiotique, sans pour autant indiquer de modification quantitative de cette sécrétion. Cependant, la présence de Hcp dans les culots semblerait être augmentée en fin de culture suggérant une modification de la régulation séquentielle de la sécrétion de Hcp sans modification de la cinétique de la présence dans les cellules et donc peut être dans l'expression des gènes *hcp-1* et *hcp-2*. En effet si l'expression des gènes n'est pas modifiée dans le temps mais que la sécrétion est anticipée alors, en fin de sécrétion, la protéine Hcp s'accumulerait dans les cellules, ceci pourrait aussi être vérifié par qPCR en choisissant plusieurs temps de culture et en comparant le traitement à la TC et le contrôle non traité. De plus, les WB des autres protéines du SST6 devraient être refaits avec des échantillons récupérés à la $DO_{600nm} = 1.8$, DO_{600nm} à laquelle la TC active la sécrétion de Hcp. En effet, l'analyse des WB des autres protéines du SST6 montre une diminution quantitative générale des protéines du SST6 mais pour une DO_{600nm} fixe et sûrement pas équivalente à la DO_{600nm} à laquelle la TC permet un maximum d'activation du système.

Lors du traitement au CM, les deux séries de WB dirigés contre la protéine Hcp dans les SN indiquent une absence totale de sécrétion de la protéine. De plus, dans les culots bactériens, les WB dirigés contre ClpV, TseL et Hcp indiquent aussi une diminution de la quantité de ces

protéines pouvant alors suggérer que le CM inhiberait l'activation du SST6, en diminuant la présence cellulaire des protéines du système. Il serait alors intéressant de pouvoir analyser à l'échelle des régulateurs l'effet du CM sur le SST6.

L'analyse de la cinétique de Hcp lors du traitement à la KA semble indiquer une inhibition de la sécrétion de la protéine, quelle que soit la DO_{600nm} , associée à une accumulation de Hcp dans les culots bactériens. Cependant, l'inhibition de la sécrétion de Hcp dans les SN n'a plus été observée lors de la deuxième série de WB et les quantités des autres protéines du SST6 semblaient quant à elles diminuées n'allant donc pas vers un effet d'accumulation des protéines dans les cellules. L'effet de la KA sur le SST6 de *Vibrio cholerae* reste donc encore à être réévalué, d'autant plus que la KA a été montrée comme activatrice de l'expression des gènes du SST6 chez *Pseudomonas aeruginosa*, sans moduler pour autant la sécrétion des effecteurs du système (Jones et al., 2013). De ce fait, une cinétique pourrait être refaite où la présence cellulaire des protéines du SST6, et leurs sécrétions les cas échéants, seraient évaluées par WB. Dans le cas de résultats confirmés, des qPCR pourraient alors être réalisées sur les gènes des protéines du SST6 et/ou des régulateurs, en fonction de la modulation observée.

L'analyse de la cinétique de sécrétion et de présence cellulaire de Hcp confirme la modulation par la PmB, vue lors de l'analyse par spectrométrie de masse, sur le SST6. En effet, les WB des SN et des culots bactériens indiquaient une quantité importante de protéine Hcp par rapport au contrôle sans PAM, confirmant une fois de plus que la PmB active bel et bien la sécrétion de la protéine Hcp et augmente sa présence dans les culots bactériens. Les WB pour les autres protéines n'ont pas été réalisés pour le traitement à la PmB mais les qPCR pourraient tout de même être réalisées sur les gènes des régulateurs du système afin de comprendre les mécanismes de modulation de la PmB sur le SST6.

Les perspectives de ces analyses seraient donc d'étudier par qPCR les réponses des régulateurs du SST6, tels que HapR, VasH, H-NS CqsA, aux traitements antimicrobiens. Cette analyse permettrait alors de voir si la modulation par les antimicrobiens touche l'échelle de régulation du SST6 ou bien si cette modulation passe seulement par les activités intrinsèques des antimicrobiens, directement sur le SST6.

3. Compétitions inter bactériennes

Après avoir mis en évidence la modulation positive ou négative des antimicrobiens sur le SST6 par l'analyse en WB des protéines du système, nous avons voulu voir si cette modulation se traduisait aussi sur la capacité bactéricide de la souche A1552, amenée par le SST6. Cependant, afin d'être certain d'observer les effets du SST6, il est primordial de réaliser en parallèle des tests de compétitions inter bactériennes faits avec la souche A1552 sauvage et *Escherichia coli*, les tests avec la souche A1552 dont le SST6 n'est plus fonctionnel (A1552 Δ hcp1 Δ hcp2). Nous avons choisi de ne poursuivre l'étude qu'avec la CB, la TC et la PmB, afin de simplifier les tests de compétitions. Ainsi, après avoir vérifié la résistance d'*E. coli* et d'A1552 Δ hcp1 Δ hcp2 aux concentrations de travail des antimicrobiens, il a fallu mettre en place une méthode d'identification des deux espèces bactériennes après les contacts.

3.1 Identification des espèces après interactions

Après la mise en contact des deux espèces bactériennes, l'identification de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* a été testée par quantification en cytométrie de flux de la fluorescence de la GFP produite par un plasmide introduit dans la souche A1552. Ainsi, la quantification de la fluorescence serait le reflet de la quantité de *Vibrio cholerae* et la différence entre le nombre de cellules totales et celles fluorescentes serait le reflet de la quantité d'*E. coli*. Nous étions conscients que cette méthode n'était pas des plus précise puisque nous devons déduire des deux valeurs de quantification une troisième valeur mais cette lacune aurait pu être palliée par l'introduction d'un plasmide porteur de gènes de protéines fluorescentes différentes de la GFP dans la souche d'*E. coli*. De plus, comme le plasmide GFP utilisé pour marquer les cellules de *V. cholerae* portait la résistance à la CB, antibiotique utilisé lors de l'étude, il nous a fallu vérifier si en ne maintenant pas la sélection du plasmide, ce dernier pouvait rester et s'exprimer dans la souche. Ainsi, après quantification de la fluorescence, nous nous sommes tout d'abord rendu compte que toutes les bactéries, dont la sélection avait toujours été maintenue, n'étaient pas GFP positives. Ceci peut s'expliquer par le fait que le comptage de la population entière de cellules comprend en plus des cellules vivantes, et potentiellement en train d'exprimer les gènes de la GFP, des cellules mortes. Ainsi, notre population entière n'est, ici, pas représentative des bactéries vivantes, nous

aurions alors dû utiliser un marqueur de cellules vivantes avant de quantifier la fluorescence. De plus, puisque l'étude porte sur la modulation des antimicrobiens, il aurait été plus judicieux de réaliser une insertion chromosomique dans l'une des deux espèces, des gènes de la GFP afin de s'affranchir de la sélection antibiotique. Aussi à défaut de déduire une quantité cellulaire par la différence entre la quantité totale de cellules et la quantité de cellules fluorescentes, il serait plus fiable et précis de quantifier les deux espèces bactériennes, chacune exprimant et synthétisant des protéines fluorescentes.

Ainsi, la quantification par mesure de la fluorescence de *Vibrio cholerae* n'ayant pas été convaincante, nous avons voulu différencier les deux souches par essais blanc/bleu sur milieu contenant du X-Gal. En effet, la souche A1552 que nous utilisons au laboratoire avait été auparavant transformée et le gène *lacZ* avait été introduit chromosomiquement. Cependant, au vu des ratios utilisés, en faveur de *Vibrio cholerae*, et après l'effet du SST6 sur *E. coli*, la quantité de *Vibrio cholerae* est 10 fois voire 100 fois plus importante que la quantité d'*E. coli*, après les contacts, ne permettant donc pas de pouvoir quantifier les deux espèces sur une seule et même boîte de Pétri. De ce fait, il est primordial de sélectionner chacune des deux souches indépendamment, par sélection antibiotique, afin d'apprécier leur quantité respective.

3.2 Compétitions entre *Vibrio cholerae* traitée aux antimicrobiens et

Escherichia coli

Après avoir vérifié la résistance et la sensibilité des souches aux concentrations de travail des antimicrobiens sélectionnés, mis au point la méthode d'identification et de quantification de chacune des deux espèces et déterminé les paramètres d'interactions, les tests d'interactions ont pu être effectués. Ainsi, après l'analyse des dénombrements de chacune des souches, nous nous sommes rendu compte que les souches A1552 sauvage et mutée pour le SST6 (SST6-) poussent mieux lorsqu'elles sont en culture avec *E. coli*. *A contrario* et comme attendu, le nombre de colonies de la souche MC4100 d'*E. coli* est clairement diminué lorsqu'elle est en interaction avec la souche A1552 sauvage. Cependant, lorsqu'*E. coli* est au contact de la souche SST6- de *Vibrio cholerae*, le nombre de colonies est aussi diminué et ne retrouve pas un dénombrement équivalent au dénombrement d'*E. coli* seule. Ces observations démontrent tout d'abord qu'effectivement *Vibrio cholerae* est capable de tuer *E. coli* par le

SST6 puisque le dénombrement des colonies d'*E. coli* avec la souche sauvage est inférieur à celui avec la souche SST6-. Cependant, ceci démontre aussi que lorsque la souche ne possède plus un SST6 fonctionnel elle est encore capable de tuer *E. coli*. *Vibrio cholerae* posséderait donc d'autres mécanismes bactéricides actifs contre *Escherichia coli*. Il a été montré que *Vibrio cholerae* possède onze bactériocines actives contre les entérobactéries et qui sont sécrétées par la bactérie en condition *in vivo* (Chakrabarty, Adhya, Basu, & Dastidar, 1970). De plus, les tests d'interactions sont réalisés dans des conditions de forte pression osmotique à 37°C, rassemblant aux conditions retrouvées dans le tractus digestif de l'Homme lors de la colonisation par *Vibrio cholerae* pouvant alors expliquer les observations ici faites. Aussi, il est connu qu'en conditions de co-culture, les deux espèces bactériennes interagissent entre elles, induisent des modulations géniques les unes chez les autres et permettant alors à l'une des deux espèces de prendre le pas sur l'autre. En effet, il a été montré dans plusieurs études qu'en condition de co-culture les deux espèces bactériennes peuvent moduler leurs gènes et les gènes de l'autre espèce permettant alors un effet mutualiste entre les deux espèces ou *contrario*, permettant à l'une des deux espèces de prendre le dessus sur l'autre (An, Danhorn, Fuqua, & Parsek, 2006), (Yang et al., 2011), (Filkins et al., 2015). Ceci expliquerait aussi pourquoi le nombre de colonies de *Vibrio cholerae* en contact avec *Escherichia coli* est supérieur au nombre de colonies de *Vibrio cholerae* seule.

L'analyse des dénombrements des colonies en réponse aux antimicrobiens indique qu'effectivement les concentrations utilisées ne tuent pas majoritairement les bactéries mais au contraire, les traitements auraient un effet positif sur les dénombrements des trois souches. En effet, il est aisé de penser que les antimicrobiens étant utilisés à faibles concentrations, ils pourraient être utilisés par les bactéries comme source de nutriments ou comme activateurs de croissance. De plus, l'analyse nous a permis de mettre en évidence un effet de la PmB sur la souche A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* lors des interactions avec *E. coli*. En effet, lorsque cette souche est cultivée avec la PmB, le nombre de colonies après interaction est inférieur au nombre de colonies où la souche est seule. Cette différence n'est pas observée lorsqu'A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* seule est mise en contact avec la PmB. Au contraire, elle semble mieux pousser que la souche sauvage dans ces conditions. On peut alors envisager un effet combinatoire de la PmB et d'*E. coli* par sécrétion de bactériocines, par exemple, sur le double mutant Δ *hcp1* Δ *hcp2*, conduisant

à une diminution du nombre d'A1552 Δ hcp1 Δ hcp2. Ainsi, la différence entre les dénombrements des colonies d'*E. coli* seule et après interaction avec A1552 Δ hcp1 Δ hcp2 traitée à la PmB est bien moins importante que celle sans traitement ou avec les autres antimicrobiens. Ceci peut s'expliquer par le nombre moins important de *Vibrio cholerae* disponibles pour agir sur *E. coli* mais pourrait aussi s'expliquer par l'effet qu'a la PmB sur la souche A1552 Δ hcp1 Δ hcp2 lorsque celle-ci est en interaction avec une autre espèce bactérienne. Il serait donc intéressant d'étudier cet effet dans un nouveau projet. Cependant, il serait aussi judicieux de compléter la souche A1552 Δ hcp1 Δ hcp2 avec les gènes *hcp-1* et *hcp-2* afin de montrer, tout d'abord, la restauration du phénotype sauvage et afin de montrer que les effets vus avec cette souche sont bel et bien dus à l'inactivation des deux gènes.

L'analyse des taux de mortalité indique que la CB diminuerait la capacité de *Vibrio cholerae* à tuer *E. coli* alors que la CB avait été montrée comme inductrice du SST6, ce qui aurait donc dû avoir pour effet d'augmenter le taux de mortalité par rapport au contrôle où *V. cholerae* n'a pas été traitée. Dans une étude effectuée sur le SST6 de *Pseudomonas aeruginosa*, il a été montré que la kanamycine induisait l'expression des gènes de l'opéron du SST6 mais que cette induction ne se traduisait pas au niveau des tests de compétitions inter bactériennes, où il avait alors été conclu que l'induction de l'expression n'affecte pas la sécrétion des effecteurs du système (Jones et al., 2013). De ce fait, les tests de compétitions ne sont donc probablement pas assez sensibles pour détecter les modulations des antimicrobiens sur le SST6 ou bien que les effets des antimicrobiens sur le SST6 ne se répercutent pas sur l'effet bactéricide du SST6. Il est également possible qu'*E. coli* sécrète des molécules capables de moduler le SST6 plus efficacement que les antimicrobiens. Il serait donc intéressant de mesurer la quantité de protéine Hcp contenue dans les cellules et sécrétée en présence d'antimicrobiens au cours des interactions.

En ce qui concerne les taux de mortalité d'*E. coli* lorsqu'A1552 est traitée à la TC, aucune différence ne peut être vue par rapport au contrôle où la souche n'est pas traitée à un antimicrobien. La TC avait été montrée comme anticipatrice de l'activation du SST6 pouvant alors expliquer cette absence de différence avec le contrôle. Il serait tout de même judicieux de recommencer l'expérience en arrêtant la culture de la souche en présence de TC au moment où celle-ci montrait une activation maximale du système. Puis, en ce qui concerne les effets de la

PmB sur la modulation du SST6 au niveau des interactions inter bactériennes, là encore la PmB semblerait induire le SST6 puisque le taux de mortalité d'*E. coli* est augmenté lorsqu'elle est mise au contact de *V. cholerae* ayant été traitée à la PmB. La PmB aurait donc un effet assez fort sur le SST6 pour que cela se traduise au niveau des tests de compétitions inter bactériennes. Cependant, cette analyse n'a été réalisée qu'une seule fois (n=1) et doit donc être recommencée au moins deux autres fois afin d'être statistiquement représentative. Les tests d'interactions sont des tests mettant en jeu de nombreux paramètres pouvant à chaque moment faire varier la finalité du résultat. En effet, les cultures liquides de *V. cholerae* sont arrêtées à la DO_{600nm} connue comme celle où le SST6 est le plus actif (environ DO_{600nm}=2) puis sont mises au contact de la culture d'*E. coli*. Cependant, il est déjà peut-être trop tard pour l'activité du SST6 sur sa proie, ou bien le changement de milieu de la culture (interactions faites en milieu solide) induit une activité moindre du SST6 nous permettant alors de ne voir qu'une partie de l'activité bactéricide. Il serait donc intéressant de pouvoir analyser le sécrétome des bactéries lorsqu'elles sont en interactions afin de réellement mettre en évidence la modulation de la sécrétion par le SST6. Lors de cette étude, cela avait été essayé mais la membrane de cellophane utilisée n'était pas assez poreuse et ne permettait pas le passage des nutriments, ayant alors fait mourir notre culture. Cette méthode ayant déjà fait ses preuves avec plusieurs espèces de *Vibrio*, il serait bon de la répéter en utilisant une membrane plus adéquate (Yildiz & Schoolnik, 1999, p. 1), (Madec et al., 2014), (Binesse et al., 2008). Une autre méthode qui pourrait être utilisée pour l'étude de l'activité du SST6 sur les bactéries avoisinantes serait une co-culture avec *P. aeruginosa*. En effet, *P. aeruginosa* n'active son SST6 que lorsqu'elle détecte dans son environnement une attaque par un SST6 exogène (Basler et al., 2013). Ainsi, si *Vibrio cholerae* active son SST6 alors *P. aeruginosa* contre attaquera et induira la mort des *Vibrio cholerae*. Cette méthode pourrait être essayée mais nécessiterait une importante mise au point.

4. Évaluation du Système de Sécrétion de Type VI comme facteur de résistance aux antimicrobiens

L'étude s'est ensuite poursuivie par l'évaluation de la résistance aux antimicrobiens apportée par le SST6. En effet, afin de déterminer si les effets vus sur la modulation du SST6

sont le reflet de l'activation d'un mécanisme de résistance mis en place par la bactérie grâce à l'export des antimicrobiens par le SST6, les CMI des antimicrobiens utilisés ont été réalisées sur une culture de la souche ne possédant pas le SST6 fonctionnel. Ainsi aucune différence de CMI n'a été observée par rapport à la souche sauvage. Puis lorsqu'on met en contact les souches, sauvage et SST6-, avec d'importantes concentrations en antimicrobiens, la souche sauvage paraît plus sensible que la souche mutante montrant alors que lorsque le SST6 n'est plus fonctionnel la souche résisterait mieux aux antimicrobiens. Ainsi, encore une fois il serait judicieux de compléter le double mutant afin de confirmer la restauration du phénotype sauvage. Puis, il serait intéressant de comprendre comment la perte de la fonctionnalité du SST6 entraîne une meilleure résistance aux antimicrobiens. Il se pourrait que l'absence du SST6 au niveau des membranes cellulaires, chez le double mutant, entraîne une rigidité membranaire empêchant alors le passage des antimicrobiens, ou ce pourrait être un mécanisme de résistance mis en place par la modification de la régulation du SST6.

Conclusion et Perspectives

Lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence la modulation par plusieurs antibiotiques et peptides antimicrobiens de l'un des facteurs de virulence de *Vibrio cholerae*, le Système de Sécrétion de Type VI. Ainsi, les résultats des analyses de spectrométrie de masse et des Western blots nous ont permis d'apprécier l'activation du SST6 par la PmB et la CB, son inhibition probable par le CM et la KA et l'anticipation d'activation du système par la TC; ces résultats resteraient tout de même à être confirmés. Les tests de compétitions inter bactériennes avec *Escherichia coli* ne nous ont, en partie, pas permis de visualiser la modulation des antimicrobiens, nécessitant alors plus d'expérimentations afin de comprendre si ce manque d'informations est dû au test en lui-même ou aux mécanismes de modulation sur le SST6. De plus, nous avons pu mettre en évidence que le SST6 n'apportait pas de résistance accrue aux antimicrobiens et même que les bactéries ne possédant pas le système fonctionnel semblaient plus résistantes à ces antimicrobiens.

Ainsi, les perspectives générales de cette étude seraient, tout d'abord, de compléter le double mutant afin de pouvoir confirmer que la souche A1552 Δ *hcp1* Δ *hcp2* est bel et bien SST6-. Pour cela, il faudrait transformer cette souche double mutante avec un plasmide portant les deux gènes manquants et analyser le rétablissement du phénotype sauvage et comparer les souches WT, double mutante et complémentée entre elles. Il serait aussi intéressant de sur-exprimer le SST6 dans la souche A1552, ce qui nous permettrait de nous affranchir de la régulation par le *Quorum Sensing* et donc d'activer le système tout au long de la croissance bactérienne. La sur-expression permettrait alors de contourner les difficultés liées à l'obtention des mêmes DO_{600nm} pour toutes les conditions, ce qui nous permettrait de réaliser des manipulations reproductibles et donc de réaliser une analyse statistique des résultats obtenus. Par la suite, il serait aussi intéressant d'analyser la modulation des antimicrobiens sur les deux SST6 indépendamment. En effet, *Vibrio cholerae* possédant deux gènes *hcp*, chacun sur un chromosome de la bactérie, il est possible de ne déléter qu'un des deux gènes permettant alors l'établissement d'un SST6 particulier. Ainsi, si le gène *hcp-1* est délété, c'est le SST6-2 qui sera fonctionnel et inversement pour la délétion du gène *hcp-2*. Il serait donc intéressant de pouvoir analyser les effets des antimicrobiens sur les SST6-1 et -2 afin, possiblement, de mieux apprécier la modulation par ces antimicrobiens. Ainsi, par la suite il

serait intéressant de réaliser les qPCR sur les cultures de ces mutants mais aussi sur la souche sauvage. Les qPCR pourraient alors être faites sur les gènes des régulateurs connus du SST6, puis sur les gènes des protéines du SST6. L'analyse et la quantification de l'expression des gènes du SST6 ou des gènes des régulateurs pourrait aussi se faire par le système rapporteur de la luciférase. Ceci permettrait alors de suivre en temps réel la transcription des gènes d'intérêt et donc de pouvoir directement apprécier la modulation des antimicrobiens sur le SST6.

En ce qui concerne l'utilisation des antimicrobiens sur le SST6 de *Vibrio cholerae*, l'étude pourrait être complétée en analysant la modulation des PAM d'origine humaine, LL-37, α et β défensines et lectines. Puis une fois que les effets de chacun des PAM et antibiotiques auront pu être identifiés, il serait très intéressant de mélanger ces antimicrobiens. Ceci permettra de mettre à jour de nouvelles modulations et ces conditions seront plus représentatives des conditions rencontrées par la bactérie dans ses environnements naturels.

Références

- Abd, H., Weintraub, A., & Sandström, G. (2005). Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environmental Microbiology*, 7(7), 1003-1008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00771.x>
- Abrusci, P., McDowell, M. A., Lea, S. M., & Johnson, S. (2014). Building a secreting nanomachine: A structural overview of the T3SS. *Current Opinion in Structural Biology*, 25(100), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.11.001>
- Absalon, C., Dellen, K. V., & Watnick, P. I. (2011). A Communal Bacterial Adhesin Anchors Biofilm and Bystander Cells to Surfaces. *PLOS Pathogens*, 7(8), e1002210. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002210>
- Abuaita, B. H., & Withey, J. H. (2009). Bicarbonate Induces *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression by Enhancing ToxT Activity. *Infection and Immunity*, 77(9), 4111-4120. <https://doi.org/10.1128/IAI.00409-09>
- Ahmad, M. (Government C. U., Khan, A. U. (Government C. U., Wahid, A. (Bahauddin Z. U., Ali, A. S., & Ahmad, F. (2013). Role of untreated waste water in spread of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in river. *Pakistan Journal of Science (Pakistan)*, 65(1), 10-14.
- Alam, M., Miyoshi, S., Tomochika, K., & Shinoda, S. (1997). Hemagglutination is a novel biological function of lipopolysaccharide (LPS), as seen with the *Vibrio cholerae* O139 LPS. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(5), 604-606.
- Alam, Munirul, Hasan, N. A., Sadique, A., Bhuiyan, N. A., Ahmed, K. U., Nusrin, S., ... Colwell, R. R. (2006). Seasonal Cholera Caused by *Vibrio cholerae* Serogroups O1 and O139 in the Coastal Aquatic Environment of Bangladesh. *Applied and*

Environmental Microbiology, 72(6), 4096-4104. <https://doi.org/10.1128/AEM.00066-06>

Albert, M. J., Siddique, A. K., Islam, M. S., Faruque, A. S., Ansaruzzaman, M., Faruque, S. M., & Sack, R. B. (1993). Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet (London, England)*, 341(8846), 704.

Albert, M. John, Qadri, F., Bhuiyan, N. A., Ahmad, S. M., Ansaruzzaman, M., & Weintraub, A. (1999). Phagocytosis of *Vibrio cholerae* O139 Bengal by Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 276-278.

Ali, M., Nelson, A. R., Lopez, A. L., & Sack, D. A. (2015). Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003832>

Allué-Guardia, A., Echazarreta, M., Koenig, S. S. K., Klose, K. E., & Eppinger, M. (2018). Closed Genome Sequence of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba Strain A1552. *Genome Announcements*, 6(9), e00098-18, [/ga/6/9/e00098-18.atom](https://doi.org/10.1128/genomeA.00098-18). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00098-18>

Almagro-Moreno, S., & Boyd, E. F. (2009). Sialic Acid Catabolism Confers a Competitive Advantage to Pathogenic *Vibrio cholerae* in the Mouse Intestine. *Infection and Immunity*, 77(9), 3807-3816. <https://doi.org/10.1128/IAI.00279-09>

Almagro-Moreno, S., Pruss, K., & Taylor, R. K. (2015). Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004787. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004787>

- Altindis, E., Dong, T., Catalano, C., & Mekalanos, J. (2015). Secretome Analysis of *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System Reveals a New Effector-Immunity Pair. *MBio*, 6(2), e00075-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00075-15>
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., & Parsek, M. R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3828-3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465-478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Angelichio, M. J., Spector, J., Waldor, M. K., & Camilli, A. (1999). *Vibrio cholerae* Intestinal Population Dynamics in the Suckling Mouse Model of Infection. *Infection and Immunity*, 67(8), 3733-3739.
- Antonova, E. S., Bernardy, E. E., & Hammer, B. K. (2012). Natural competence in *Vibrio cholerae* is controlled by a nucleoside scavenging response that requires CytR-dependent anti-activation. *Molecular Microbiology*, 86(5), 1215-1231. <https://doi.org/10.1111/mmi.12054>
- Asaduzzaman, M., Ryan, E. T., John, M., Hang, L., Khan, A. I., Faruque, A. S. G., ... Qadri, F. (2004). The major subunit of the toxin-coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infection and Immunity*, 72(8), 4448-4454. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4448-4454.2004>

- Attridge, S. R., & Rowley, D. (1983). The Role of the Flagellum in the Adherence of *Vibrio cholerae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 147(5), 864-872.
<https://doi.org/10.1093/infdis/147.5.864>
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., & Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G922-G929.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>
- Azman, A. S., Rudolph, K. E., Cummings, D. A. T., & Lessler, J. (2013). The incubation period of cholera: A systematic review. *The Journal of infection*, 66(5), 432-438.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.11.013>
- B. Nye, M., D. Pfau, J., Skorupski, K., & K. Taylor, R. (2000). *Vibrio cholerae* H-NS Silences Virulence Gene Expression at Multiple Steps in the ToxR Regulatory Cascade. *Journal of bacteriology*, 182, 4295-4303. <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4295-4303.2000>
- 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), e0004031.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004031>
- Baranwal, S., Dey, K., Ramamurthy, T., Nair, G. B., & Kundu, M. (2002). Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2676-2678. <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2676-2678.2002>
- Bari, S. M. N., Roky, M. K., Mohiuddin, M., Kamruzzaman, M., Mekalanos, J. J., & Faruque, S. M. (2013). Quorum Sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in

- environmental water samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9926-9931. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307697110>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, P. G., Jensen, J. G., & Mekalanos, J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483(7388), 182-186. <https://doi.org/10.1038/nature10846>
- Bechinger, B., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2(12), 2077-2084.
- Beeckman, D. S. A., & Vanrompay, D. C. G. (2016). *Chlamydial Type III Secretion System 17 I Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System*.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 625-651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Begum, A., Rahman, M. M., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2005). Gene Cloning and Characterization of Four MATE Family Multidrug Efflux Pumps from *Vibrio cholerae* Non-O1. *Microbiology and Immunology*, 49(11), 949-957. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03690.x>
- Bentivoglio, M., & Pacini, P. (1995). Filippo Pacini : A determined observer. *Brain Research Bulletin*, 38(2), 161-165.

- Berk, V., Fong, J. C. N., Dempsey, G. T., Develioglu, O. N., Zhuang, X., Liphardt, J., ... Chu, S. (2012). Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science*, 337(6091), 236-239. <https://doi.org/10.1126/science.1222981>
- Berks, B. C., Palmer, T., & Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.010>
- Bernard, C. S., Brunet, Y. R., Gavioli, M., Llobès, R., & Cascales, E. (2011). Regulation of Type VI Secretion Gene Clusters by σ_{54} and Cognate Enhancer Binding Proteins ∇ . *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2158-2167. <https://doi.org/10.1128/JB.00029-11>
- Bernardy, E. E., Turnsek, M. A., Wilson, S. K., Tarr, C. L., & Hammer, B. K. (2016). Diversity of Clinical and Environmental Isolates of *Vibrio cholerae* in Natural Transformation and Contact-Dependent Bacterial Killing Indicative of Type VI Secretion System Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2833-2842. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-16>
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356-368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Beyhan, S., Tischler, A. D., Camilli, A., & Yildiz, F. H. (2006). Transcriptome and Phenotypic Responses of *Vibrio cholerae* to Increased Cyclic di-GMP Level. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3600-3613. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3600-3613.2006>
- Bhattacharya, S. K. (2003). An evaluation of current cholera treatment. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 4(2), 141-146. <https://doi.org/10.1517/14656566.4.2.141>

- Bina, J. E., Provenzano, D., Wang, C., Bina, X. R., & Mekalanos, J. J. (2006). Characterization of the *Vibrio cholerae* *vexAB* and *vexCD* efflux systems. *Archives of Microbiology*, *186*(3), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0133-5>
- Bina, X. R., Provenzano, D., Nguyen, N., & Bina, J. E. (2008). *Vibrio cholerae* RND Family Efflux Systems Are Required for Antimicrobial Resistance, Optimal Virulence Factor Production, and Colonization of the Infant Mouse Small Intestine. *Infection and Immunity*, *76*(8), 3595-3605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., ... Le Roux, F. (2008). Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(23), 7108-7117. <https://doi.org/10.1128/AEM.01261-08>
- Binsztein, N., Costagliola, M. C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F. C., Akselman, R., ... Colwell, R. (2004). Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment of Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7481-7486. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004>
- Blackburn, N., Fenchel, T., & Mitchell, J. (1998). Microscale Nutrient Patches in Planktonic Habitats Shown by Chemotactic Bacteria. *Science*, *282*(5397), 2254-2256. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2254>
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M. J., Barthélémy, M., Prigent, Y., ... Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, *259*(3), 747-756. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00085.x>

- Booth, B. A., Boesman-Finkelstein, M., & Finkelstein, R. A. (1983). *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme. *Infection and Immunity*, 42(2), 639-644.
- Borenstein, D. B., Ringel, P., Basler, M., & Wingreen, N. S. (2015). Established Microbial Colonies Can Survive Type VI Secretion Assault. *PLoS Computational Biology*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004520>
- Borgeaud, S., Metzger, L. C., Scignari, T., & Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*, 347(6217), 63-67. <https://doi.org/10.1126/science.1260064>
- Bourassa, L., & Camilli, A. (2009). Glycogen contributes to the environmental persistence and transmission of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 72(1), 124-138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06629.x>
- Box, A. M., McGuffie, M. J., O'Hara, B. J., & Seed, K. D. (2016). Functional Analysis of Bacteriophage Immunity through a Type I-E CRISPR-Cas System in *Vibrio cholerae* and Its Application in Bacteriophage Genome Engineering. *Journal of Bacteriology*, 198(3), 578-590. <https://doi.org/10.1128/JB.00747-15>
- Boyd, E. F., Moyer, K. E., Shi, L., & Waldor, M. K. (2000). Infectious CTX Φ and the *Vibrio* Pathogenicity Island Prophage in *Vibrio mimicus*: Evidence for Recent Horizontal Transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infection and Immunity*, 68(3), 1507-1513.
- Breukink, E., & de Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 223-234. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00208-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00208-4)

- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides : Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brooks, T. M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuk, B., & Pukatzki, S. (2013). Lytic Activity of the *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Toxin VgrG-3 Is Inhibited by the Antitoxin TsaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7618-7625.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436725>
- Brown, R. C., & Taylor, R. K. (1995). Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Molecular Microbiology*, 16(3), 425-439.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02408.x>
- Broza, M., Gancz, H., Halpern, M., & Kashi, Y. (2005). Adult non-biting midges : Possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. *Environmental Microbiology*, 7(4), 576-585. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00745.x>
- Broza, M., & Halpern, M. (2001). Chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. *Nature*, 412(6842), 40. <https://doi.org/10.1038/35083691>
- Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., & Cascales, E. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genetics*, 11(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545>
- Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 13(11), 790-801.
<https://doi.org/10.1038/nri3535>

- Burdette, L. A., Leach, S. A., Wong, H. T., & Tullman-Ercek, D. (2018). Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. *Microbial Cell Factories*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1041-5>
- Butler, S. M., & Camilli, A. (2004). Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5018-5023. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308052101>
- Butler, S. M., & Camilli, A. (2005). Going against the grain : Chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 611. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1207>
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), 1126-1130. <https://doi.org/10.1126/science.1127119>
- Cash, R. A., Music, S. I., Libonati, J. P., Snyder, M. J., Wenzel, R. P., & Hornick, R. B. (1974). Response of Man to Infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, Serologic, and Bacteriologic Responses to a Known Inoculum. *The Journal of Infectious Diseases*, 129(1), 45-52. <https://doi.org/10.1093/infdis/129.1.45>
- Casper-Lindley, C., & Yildiz, F. H. (2004). VpsT is a transcriptional regulator required for expression of *vps* biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1574-1578. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1574-1578.2004>

- Castellano, P., Raya, R., & Vignolo, G. (2003). Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(1), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00479-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00479-8)
- Chakrabarty, A. N., Adhya, S., Basu, J., & Dastidar, S. G. (1970). Bacteriocin Typing of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, *1*(3), 293-299.
- Chakraborty, K., Ghosh, S., Koley, H., Mukhopadhyay, A. K., Ramamurthy, T., Saha, D. R., ... Das, S. (2008). Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human *beta*-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, *10*(12), 2520-2537. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01227.x>
- Chehimi, S., Pons, A.-M., Sablé, S., Hajlaoui, M.-R., & Limam, F. (2010). Mode of action of thuricin S, a new class IId bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, *56*(2), 162-167. <https://doi.org/10.1139/W09-125>
- Chen, L., Zou, Y., She, P., & Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, *172*, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.004>
- Cheng, A. T., Ottemann, K. M., & Yildiz, F. H. (2015). *Vibrio cholerae* Response Regulator VxB Controls Colonization and Regulates the Type VI Secretion System. *PLoS Pathogens*, *11*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004933>
- Chou, S., Bui, N. K., Russell, A. B., Lexa, K., Gardiner, T. E., LeRoux, M., ... Mougous, J. D. (2012). Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system. *Cell Reports*, *1*(6), 656-664. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.016>

- Chowdhury, F. R., Nur, Z., Hassan, N., von Seidlein, L., & Dunachie, S. (2017). Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0185-1>
- Chowdhury, G., Joshi, S., Bhattacharya, S., Sekar, U., Birajdar, B., Bhattacharyya, A., ... Ramamurthy, T. (2016). Extraintestinal Infections Caused by Non-toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00144>
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., ... Bevins, C. L. (2012). Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6093), 477-481. <https://doi.org/10.1126/science.1218831>
- Chun, J., Grim, C. J., Hasan, N. A., Lee, J. H., Choi, S. Y., Haley, B. J., ... Colwell, R. R. (2009). Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15442-15447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907787106>
- Collin, B., Rehnstam-Holm, A.-S., Lindmark, B., Pal, A., Wai, S. N., & Hernroth, B. (2012). The Origin of *Vibrio cholerae* Influences Uptake and Persistence in the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Shellfish Research*, 31(1), 87-92. <https://doi.org/10.2983/035.031.0111>

- Colmer, J. A., Fralick, J. A., & Hamood, A. N. (1998). Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 27(1), 63-72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00657.x>
- Colwell, R. R. (1970). Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio* : Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 410-433.
- Colwell, R. R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., & Levine, M. M. (1996). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12(1), 28-31. <https://doi.org/10.1007/BF00327795>
- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., & Palmer, L. M. (1985). Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment : Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Bio/Technology*, 3(9), 817. <https://doi.org/10.1038/nbt0985-817>
- Colwell, Rita R. (1996). Global Climate and Infectious Disease : The Cholera Paradigm*. *Science*, 274(5295), 2025-2031. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2025>
- Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J., & Yildiz, F. H. (2016). Staying Alive : *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015>
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria : Structural and mechanistic insights. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(6), 343-359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (s. d.). *Microbial Biofilms*. 35.
- Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruíz Holgado, A. P., & Raya, R. R. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), 157-161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09055.x>
- David, L. A., Weil, A., Ryan, E. T., Calderwood, S. B., Harris, J. B., Chowdhury, F., ... Turnbaugh, P. J. (2015). Gut Microbial Succession Follows Acute Secretory Diarrhea in Humans. *MBio*, 6(3), e00381-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00381-15>
- Davies, B. W., Bogard, R. W., Dupes, N. M., Gerstenfeld, T. A. I., Simmons, L. A., & Mekalanos, J. J. (2011). DNA Damage and Reactive Nitrogen Species are Barriers to *Vibrio cholerae* Colonization of the Infant Mouse Intestine. *PLOS Pathogens*, 7(2), e1001295. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001295>
- Dawson, M. P., Humphrey, B. A., & Marshall, K. C. (1981). Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation. *Current Microbiology*, 6(4), 195-199. <https://doi.org/10.1007/BF01566971>
- De Smet, K., & Contreras, R. (2005). Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. *Biotechnology Letters*, 27(18), 1337-1347. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0936-5>
- Deen, J. L., von Seidlein, L., Sur, D., Agtini, M., Lucas, M. E. S., Lopez, A. L., ... Clemens, J. D. (2008). The High Burden of Cholera in Children: Comparison of Incidence from

- Endemic Areas in Asia and Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000173>
- Demers, J.-P., Habenstein, B., Loquet, A., Vasa, S. K., Giller, K., Becker, S., ... Sgourakis, N. G. (2014). High-resolution structure of a *Shigella* type III secretion needle by solid-state NMR and cryo-electron microscopy. *Nature communications*, 5, 4976.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5976>
- Destoumieux-Garzón, D., Dupertuy, M., Vanhove, A. S., Schmitt, P., & Wai, S. N. (2014). Resistance to Antimicrobial Peptides in *Vibrios*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 3(4), 540-563. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040540>
- DiRita, V. J., Parsot, C., Jander, G., & Mekalanos, J. J. (1991). Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5403-5407. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5403>
- Dolores, J. S., Agarwal, S., Egerer, M., & Satchell, K. J. F. (2015). *Vibrio cholerae* MARTX toxin heterologous translocation of *beta*-lactamase and roles of individual effector domains on cytoskeleton dynamics. *Molecular microbiology*, 95(4), 590-604.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12879>
- Dong, T. G., Ho, B. T., Yoder-Himes, D. R., & Mekalanos, J. J. (2013). Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2623-2628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222783110>
- Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. (2012). Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. *Nucleic Acids Research*, 40(16), 7766-7775. <https://doi.org/10.1093/nar/gks567>

- Dorman, C. J. (2007). H-NS, the genome sentinel. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(2), 157-161. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1598>
- Dorman, M. J., & Dorman, C. J. (2018). Regulatory Hierarchies Controlling Virulence Gene Expression in *Shigella flexneri* and *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02686>
- Duperthuy, M., Sjöström, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003620. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003620>
- Dutta, P., Jijumon, A. S., Mazumder, M., Dileep, D., Mukhopadhyay, A. K., Gourinath, S., & Maiti, S. (2019). Presence of actin binding motif in VgrG-1 toxin of *Vibrio cholerae* reveals the molecular mechanism of actin cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 775-785. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.026>
- Ehrenstein, G., & Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10(1), 1-34.
- Epstein, P. R. (s. d.). Algal blooms in the spread and persistence of cholera—ScienceDirect. Consulté 2 mai 2019, à l'adresse <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030326479390050M?via%3Dihub>
- Fang, F. C. (1997). Perspectives series : Host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation*, 99(12), 2818-2825. <https://doi.org/10.1172/JCI119473>

- Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), 1301-1314.
- Faruque, Shah M., Biswas, K., Udden, S. M. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., & Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera : In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6350-6355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601277103>
- Faruque, Shah M., & Mekalanos, J. J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends in Microbiology*, 11(11), 505-510. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.09.003>
- Faruque, Shah M., Naser, I. B., Islam, M. J., Faruque, A. S. G., Ghosh, A. N., Nair, G. B., ... Mekalanos, J. J. (2005). Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1702-1707. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408992102>
- Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., ... Wang, L. (2009). Genomic Sequencing Reveals Regulatory Mutations and Recombinational Events in the Widely Used MC4100 Lineage of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 191(12), 4025-4029. <https://doi.org/10.1128/JB.00118-09>
- Field, M., Fromm, D., al-Awqati, Q., & Greenough, W. B. (1972). Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(4), 796-804. <https://doi.org/10.1172/JCI106874>

- Field, Michael. (1971). Intestinal Secretion : Effect of Cyclic Amp and Its Role in Cholera. *New England Journal of Medicine*, 284(20), 1137-1144. <https://doi.org/10.1056/NEJM197105202842008>
- Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhaju, 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>
- Fishman, P. H. (1982). Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *The Journal of Membrane Biology*, 69(2), 85-97. <https://doi.org/10.1007/BF01872268>
- Fong, J. C. N., & Yildiz, F. H. (2007). The rbmBCDEF Gene Cluster Modulates Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2319-2330. <https://doi.org/10.1128/JB.01569-06>
- Fong, J. C. N., & Yildiz, F. H. (2008). Interplay between Cyclic AMP-Cyclic AMP Receptor Protein and Cyclic di-GMP Signaling in *Vibrio cholerae* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6646-6659. <https://doi.org/10.1128/JB.00466-08>
- Freter, R., & O'Brien, P. C. (1981). Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa : Chemotactic responses of *Vibrio cholerae* and description of motile nonchemotactic mutants. *Infection and Immunity*, 34(1), 215-221.
- Fu, Y., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2013). Tn-Seq Analysis of *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization Reveals a Role for T6SS-Mediated Antibacterial Activity in the Host. *Cell host & microbe*, 14(6), 652-663. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.001>

- Galen, J. E., Ketley, J. M., Fasano, A., Richardson, S. H., Wasserman, S. S., & Kaper, J. B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infection and Immunity*, *60*(2), 406-415.
- Gallo, R. L., & Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature reviews. Immunology*, *12*(7), 503-516. <https://doi.org/10.1038/nri3228>
- Gao, W., Wu, Z., Sun, J., Ni, X., & Xia, H. (2017). Modulation of kanamycin B and kanamycin A biosynthesis in *Streptomyces kanamyceticus* via metabolic engineering. *PLoS ONE*, *12*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181971>
- Garcia-Gutierrez, E., Mayer, M. J., Cotter, P. D., & Narbad, A. (2019). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*, *10*(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1455790>
- Garg, P., Sinha, S., Chakraborty, R., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Ramamurthy, T., & Takeda, Y. (2001). Emergence of Fluoroquinolone-Resistant Strains of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor among Hospitalized Patients with Cholera in Calcutta, India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(5), 1605-1606. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1605-1606.2001>
- Ghosh, C., Nandy, R. K., Dasgupta, S. K., Balakrish Nair, G., Hall, R. H., & Ghose, A. C. (1997). A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and other virulence factors in non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *Microbial Pathogenesis*, *22*(4), 199-208. <https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0105>

- Giglio, K. M., Fong, J. C., Yildiz, F. H., & Sondermann, H. (2013). Structural Basis for Biofilm Formation via the *Vibrio cholerae* Matrix Protein RbmA. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3277-3286. <https://doi.org/10.1128/JB.00374-13>
- Gill, D M. (1975). Involvement of nicotinamide adenine dinucleotide in the action of cholera toxin in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6), 2064-2068.
- Gill, D M, & Meren, R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(7), 3050-3054.
- Gill, D. Michael, Evans, D. J., & Evans, D. G. (1976). Mechanism of Activation of Adenylate Cyclase in vitro by Polymyxin-Released, Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 133, S103-S107.
- Glass, R. I., Svennerholm, A. M., Khan, M. R., Huda, S., Huq, M. I., & Holmgren, J. (1985). Seroepidemiological studies of El Tor cholera in Bangladesh: Association of serum antibody levels with protection. *The Journal of Infectious Diseases*, 151(2), 236-242. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.2.236>
- Glenn, G. M., Francis, D. H., & Danielsen, E. M. (2009). Toxin-Mediated Effects on the Innate Mucosal Defenses: Implications for Enteric Vaccines. *Infection and Immunity*, 77(12), 5206-5215. <https://doi.org/10.1128/IAI.00712-09>
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiology spectrum*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361, 512-519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)

- Guentzel, M. N., & Berry, L. J. (1975). Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, *11*(5), 890-897.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens*, *7*(7), e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG Proteins Are “à la Carte” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(25), 17872-17884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429>
- Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annual Review of Microbiology*, *54*(1), 641-679. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641>
- Håkansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homblé, F., & Wolf-Watz, H. (1996). The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *The EMBO Journal*, *15*(21), 5812-5823.
- Haley, B. J., Chen, A., Grim, C. J., Clark, P., Diaz, C. M., Taviani, E., ... Benediktsdóttir, E. (2012). *Vibrio cholerae* in an Historically Cholera-Free Country. *Environmental*

microbiology reports, 4(4), 381-389. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00332.x>

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

Halpern, M., Broza, Y. B., Mittler, S., Arakawa, E., & Broza, M. (2004). Chironomid Egg Masses as a Natural Reservoir of *Vibrio cholerae* Non-O1 and Non-O139 in Freshwater Habitats. *Microbial Ecology*, 47(4). <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2007-6>

Halpern, Malka. (2011). Chironomids and *Vibrio cholerae*. In E. Rosenberg & U. Gophna (Éd.), *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms* (p. 43-56). https://doi.org/10.1007/978-3-642-21680-0_3

Halpern, Malka, Landsberg, O., Raats, D., & Rosenberg, E. (2007). Culturable and VBNC *Vibrio cholerae*: Interactions with Chironomid Egg Masses and Their Bacterial Population. *Microbial Ecology*, 53(2), 285-293. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9094-0>

Halpern, Malka, Senderovich, Y., & Izhaki, I. (2008). Waterfowl—The Missing Link in Epidemic and Pandemic Cholera Dissemination? *PLoS Pathogens*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000173>

Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2003). Quorum Sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 50(1), 101-104.

Hankins, J. V., Madsen, J. A., Giles, D. K., Brodbelt, J. S., & Trent, M. S. (2012). Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in

- Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8722-8727.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1201313109>
- Hankins, J. V., Madsen, J. A., Giles, D. K., Childers, B. M., Klose, K. E., Brodbelt, J. S., & Trent, M. S. (2011). Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxyacyltransferase and its role in innate immune recognition: Incorporation of hydroxy fatty acids into *V. cholerae* LPS by LpxN. *Molecular Microbiology*, 81(5), 1313-1329.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07765.x>
- Harris, A. M., Bhuiyan, M. S., Chowdhury, F., Khan, A. I., Hossain, A., Kendall, E. A., ... Harris, J. B. (2009). Antigen-Specific Memory B-Cell Responses to *Vibrio cholerae* O1 Infection in Bangladesh. *Infection and Immunity*, 77(9), 3850-3856.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00369-09>
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein & Peptide Science*, 10(6), 585-606.
- Harris, J. B., Khan, A. I., LaRocque, R. C., Dorer, D. J., Chowdhury, F., Faruque, A. S. G., ... Calderwood, S. B. (2005). Blood Group, Immunity, and Risk of Infection with *Vibrio cholerae* in an Area of Endemicity. *Infection and Immunity*, 73(11), 7422-7427.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7422-7427.2005>
- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Chowdhury, F., Khan, A. I., Logvinenko, T., Faruque, A. S. G., ... Calderwood, S. B. (2008). Susceptibility to *Vibrio cholerae* Infection in a Cohort of Household Contacts of Patients with Cholera in Bangladesh. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000221>

- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *The Lancet*, 379(9835), 2466-2476. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60436-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60436-X)
- Hase, C. C., & Mekalanos, J. J. (1998). TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 730-734. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.730>
- Hays, J. N. (2005). *Epidemics and Pandemics : Their Impacts on Human History*. ABC-CLIO.
- Heckel, B. C., Tomlinson, A. D., Morton, E. R., Choi, J.-H., & Fuqua, C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* ExoR Controls Acid Response Genes and Impacts Exopolysaccharide Synthesis, Horizontal Gene Transfer, and Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 3221-3233. <https://doi.org/10.1128/JB.01751-14>
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., ... Fraser, C. M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477-483. <https://doi.org/10.1038/35020000>
- Hentges, D. J. (1967). Influence of pH on the inhibitory activity of formic and acetic acids for *Shigella*. *Journal of Bacteriology*, 93(6), 2029-2030.
- Herrera, C. M., Crofts, A. A., Henderson, J. C., Pingali, S. C., Davies, B. W., & Trent, M. S. (2014). The *Vibrio cholerae* VprA-VprB two-component system controls virulence through endotoxin modification. *MBio*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02283-14>
- Herrington, D. A., Hall, R. H., Losonsky, G., Mekalanos, J. J., Taylor, R. K., & Levine, M. M. (1988). Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(4), 1487-1492. <https://doi.org/10.1084/jem.168.4.1487>

- Hirst, T. R., Sanchez, J., Kaper, J. B., Hardy, S. J., & Holmgren, J. (1984). Mechanism of toxin secretion by *Vibrio cholerae* investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(24), 7752-7756. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7752>
- Ho, B. T., Basler, M., & Mekalanos, J. J. (2013). Type 6 secretion system-mediated immunity to type 4 secretion system-mediated gene transfer. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6155), 250-253. <https://doi.org/10.1126/science.1243745>
- Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S. M., Woodgate, R., & Waldor, M. K. (2001). Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Gene Clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT Constins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(11), 2991-3000. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001>
- Holmgren, J, Lönnroth, I., Månsson, J., & Svennerholm, L. (1975). Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(7), 2520-2524.
- Holmgren, Jan. (1981). Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature*, *292*(5822), 413. <https://doi.org/10.1038/292413a0>
- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., ... Forsberg, A. (2001). LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Molecular Microbiology*, *39*(3), 620-632.
- Horswill, A. R., Stoodley, P., Stewart, P. S., & Parsek, M. R. (2007). The effect of the chemical, biological, and physical environment on Quorum Sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *387*(2), 371-380. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0720-y>

- Hsiao, A., Ahmed, A. M. S., Subramanian, S., Griffin, N. W., Drewry, L. L., Petri, W. A., ... Gordon, J. I. (2014). Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature*, *515*(7527), 423-426.
<https://doi.org/10.1038/nature13738>
- Hu, D., Liu, B., Feng, L., Ding, P., Guo, X., Wang, M., ... Wang, L. (2016). Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(48), E7730-E7739.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1608732113>
- Huda, M. N., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2003). Gene cloning and characterization of VcrM, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiology and Immunology*, *47*(6), 419-427.
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, *59*(1), 193-201.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04846.x>
- Huq, A., Xu, B., Chowdhury, M. A., Islam, M. S., Montilla, R., & Colwell, R. R. (1996). A simple filtration method to remove plankton-associated *Vibrio cholerae* in raw water supplies in developing countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, *62*(7), 2508-2512.
- Ishikawa, T., Rompikuntal, P. K., Lindmark, B., Milton, D. L., & Wai, S. N. (2009). Quorum Sensing Regulation of the Two *hcp* Alleles in *Vibrio cholerae* O1 Strains. *PLoS ONE*, *4*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006734>
- Ishikawa, T., Sabharwal, D., Bröms, J., Milton, D. L., Sjöstedt, A., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2012). Pathoadaptive Conditional Regulation of the Type VI Secretion System in

- Vibrio cholerae* O1 Strains. *Infection and Immunity*, 80(2), 575-584.
<https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>
- Islam, m. S., drasar, b. S., & sack, r. B. (1994). The Aquatic Flora and Fauna as Reservoirs of *Vibrio cholerae*: A Review. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 12(2), 87-96.
Consulté à l'adresse JSTOR.
- Jahid, I. K., Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2006). Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7043-7049.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00924-06>
- Jemielita, M., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2018). Quorum Sensing controls *Vibrio cholerae* multicellular aggregate formation. *eLife*, 7, e42057.
<https://doi.org/10.7554/eLife.42057>
- Jobichen, C., Chakraborty, S., Li, M., Zheng, J., Joseph, L., Mok, Y.-K., ... Sivaraman, J. (2010). Structural Basis for the Secretion of EvpC : A Key Type VI Secretion System Protein from *Edwardsiella tarda*. *PLoS ONE*, 5(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012910>
- Jobling, M. G., & Holmes, R. K. (1997). Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Molecular Microbiology*, 26(5), 1023-1034.
- Johnson, J. A., Salles, C. A., Panigrahi, P., Albert, M. J., Wright, A. C., Johnson, R. J., & Morris, J. G. (1994). *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal is closely related to *Vibrio*

- cholerae* El Tor but has important differences. *Infection and Immunity*, 62(5), 2108-2110.
- Johnson, T. L., Fong, J. C., Rule, C., Rogers, A., Yildiz, F. H., & Sandkvist, M. (2014). The Type II Secretion System Delivers Matrix Proteins for Biofilm Formation by *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 196(24), 4245-4252. <https://doi.org/10.1128/JB.01944-14>
- Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H., & Filloux, A. (2013). Subinhibitory Concentration of Kanamycin Induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI Secretion System. *PLoS ONE*, 8(11), e81132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081132>
- Joshi, A., Kostiuk, B., Rogers, A., Teschler, J., Pukatzki, S., & Yildiz, F. H. (2017). Rules of Engagement : The Type VI Secretion System in *V. cholerae*. *Trends in microbiology*, 25(4), 267-279. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003>
- Jude, B. A., Martinez, R. M., Skorupski, K., & Taylor, R. K. (2009). Levels of the Secreted *Vibrio cholerae* Attachment Factor GbpA Are Modulated by Quorum-Sensing-Induced Proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 191(22), 6911-6917. <https://doi.org/10.1128/JB.00747-09>
- Jude, B. A., & Taylor, R. K. (2011). The Physical Basis of Type 4 Pilus-Mediated Microcolony Formation by *Vibrio cholerae* O1. *Journal of structural biology*, 175(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.04.008>
- Jung, S. A., Chapman, C. A., & Ng, W.-L. (2015). Quadruple Quorum-Sensing Inputs Control *Vibrio cholerae* Virulence and Maintain System Robustness. *PLoS Pathogens*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004837>

- Kabir, S. (2014). Critical Analysis of Compositions and Protective Efficacies of Oral Killed Cholera Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 21(9), 1195-1205. <https://doi.org/10.1128/CVI.00378-14>
- Kamp, H. D., Patimalla-Dipali, B., Lazinski, D. W., Wallace-Gadsden, F., & Camilli, A. (2013). Gene Fitness Landscapes of *Vibrio cholerae* at Important Stages of Its Life Cycle. *PLOS Pathogens*, 9(12), e1003800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003800>
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., ... Farber, E. (2002). Cell death: Apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, 21(1), 165-170.
- Kaper, J. B., Morris, J. G., & Levine, M. M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 48-86.
- Kapitein, N., Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Seyffer, F., Hausser, I., Locker, J. K., & Mogk, A. (2013). ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Molecular Microbiology*, 87(5), 1013-1028. <https://doi.org/10.1111/mmi.12147>
- 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
- Karaolis, D. K. R., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B., & Reeves, P. R. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3134-3139.

- Karaolis, D. K., Somara, S., Maneval, D. R., Johnson, J. A., & Kaper, J. B. (1999). A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*, *399*(6734), 375-379. <https://doi.org/10.1038/20715>
- Kim, H.-J., Ryu, J.-O., Lee, S.-Y., Kim, E.-S., & Kim, H.-Y. (2015). Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3>
- Kirn, T. J., Jude, B. A., & Taylor, R. K. (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature*, *438*(7069), 863-866. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
- Kirn, T. J., Lafferty, M. J., Sandoe, C. M. P., & Taylor, R. K. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, *35*(4), 896-910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01764.x>
- Kitaoka, M., Miyata, S. T., Unterweger, D., & Pukatzki, S. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(4), 397-407. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023051-0>
- Kitaoka, Maya, Miyata, S. T., Brooks, T. M., Unterweger, D., & Pukatzki, S. (2011). VasH Is a Transcriptional Regulator of the Type VI Secretion System Functional in Endemic and Pandemic *Vibrio cholera*. *Journal of Bacteriology*, *193*(23), 6471-6482. <https://doi.org/10.1128/JB.05414-11>
- Klose, K. E. (2001). Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*. *International Journal of Medical Microbiology*, *291*(2), 81-88. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00104>

- Koch, R. (1884). An Address on Cholera and its *Bacillus*. *British Medical Journal*, 2(1235), 403-407.
- Kojima, S., Yamamoto, K., Kawagishi, I., & Homma, M. (1999). The Polar Flagellar Motor of *Vibrio cholerae* Is Driven by an Na⁺ Motive Force. *Journal of Bacteriology*, 181(6), 1927-1930.
- Korotkov, K. V., Gonen, T., & Hol, W. G. J. (2011). Secretins : Dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends in biochemical sciences*, 36(8), 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.04.002>
- Kovacikova, G., & Skorupski, K. (1999). A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the tcpPH promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *Journal of Bacteriology*, 181(14), 4250-4256.
- Kovacikova, Gabriela, & Skorupski, K. (2002). Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by Quorum Sensing : HapR functions at the *aphA* promoter. *Molecular Microbiology*, 46(4), 1135-1147.
- Krachler, A. M., Ham, H., & Orth, K. (2011). Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11614-11619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102360108>
- Krasteva, P. V., Fong, J. C. N., Shikuma, N. J., Beyhan, S., Navarro, M. V. A. S., Yildiz, F. H., & Sondermann, H. (2010). *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5967), 866-868. <https://doi.org/10.1126/science.1181185>

- Kudryashev, M., Wang, R. Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., ... Basler, M. (2015). Structure of the Type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, *160*(5), 952-962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.037>
- Kwon, O., Georgellis, D., Lynch, A. S., Boyd, D., & Lin, E. C. (2000). The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* : Genetic exploration of the transmembrane region. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2960-2966. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2960-2966.2000>
- Larsson, D. G. J. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 108-112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>
- Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M., & Potempa, J. (2017). The Type IX Secretion System (T9SS) : Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00215>
- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E., & Klose, K. E. (2004). The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, *186*(15), 4864-4874. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4864-4874.2004>
- Lee, M., Jun, S.-Y., Yoon, B.-Y., Song, S., Lee, K., & Ha, N.-C. (2012). Membrane Fusion Proteins of Type I Secretion System and Tripartite Efflux Pumps Share a Binding Motif for TolC in Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE*, *7*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040460>
- Lee, S. H., Hava, D. L., Waldor, M. K., & Camilli, A. (1999). Regulation and Temporal Expression Patterns of *Vibrio cholerae* Virulence Genes during Infection. *Cell*, *99*(6), 625-634. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81551-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81551-2)

- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., ... Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4154-4159. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106>
- Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2004). The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell*, *118*(1), 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.009>
- Létoffé, S., Delepelaire, P., & Wandersman, C. (1996). Protein secretion in gram-negative bacteria : Assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *The EMBO Journal*, *15*(21), 5804-5811.
- Leung, D. T., Chowdhury, F., Calderwood, S. B., Qadri, F., & Ryan, E. T. (2012). Immune responses to cholera in children. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *10*(4), 435-444. <https://doi.org/10.1586/eri.12.23>
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E., & Henderson, I. R. (2012). From self sufficiency to dependence : Mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, *10*(3), 213-225. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2733>
- Liang, W., Pascual-Montano, A., Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2007). The cyclic AMP receptor protein modulates Quorum Sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. *Microbiology (Reading, England)*, *153*(Pt 9), 2964-2975. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006668-0>

- Lipp, E. K., Huq, A., & Colwell, R. R. (2002). Effects of Global Climate on Infectious Disease: The Cholera Model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 757-770. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.757-770.2002>
- Liu, L., Ye, M., Li, X., Li, J., Deng, Z., Yao, Y.-F., & Ou, H.-Y. (2017). Identification and Characterization of an Antibacterial Type VI Secretion System in the Carbapenem-Resistant Strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00442>
- Liu, Z., Miyashiro, T., Tsou, A., Hsiao, A., Goulian, M., & Zhu, J. (2008). Mucosal penetration primes *Vibrio cholerae* for host colonization by repressing Quorum Sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9769-9774. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802241105>
- Lo Scudato, M., & Blokesch, M. (2013). A transcriptional regulator linking Quorum Sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3644-3658. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt041>
- Lo Scudato, M., Borgeaud, S., & Blokesch, M. (2014). Regulatory elements involved in the expression of competence genes in naturally transformable *Vibrio cholerae*. *BMC Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0327-y>
- Lohner, K. (2009). New strategies for novel antibiotics: Peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics*, 28(2), 105-116.
- Louis, P., & O'Byrne, C. P. (2010, mars). Life in the gut : Microbial responses to stress in the gastrointestinal tract [Text]. <https://doi.org/info:doi/10.3184/003685009X12605525292307>

- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Lundberg, J. M., & Alving, K. (1994). Intra-gastric nitric oxide production in humans : Measurements in expelled air. *Gut*, 35(11), 1543-1546.
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- M, B., BT, H., & JJ, M. (2013). Tit-for-tat : Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152(4), 884-894.
- M, M., G, C., P, M., & P, R. (1997). Ciliate-*Vibrio cholerae* interactions within a microbial loop: An experimental study. *Aquatic Microbial Ecology*, 13(3), 257-266. <https://doi.org/10.3354/ame013257>
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., & Mekalanos, J. J. (2009). Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell host & microbe*, 5(3), 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
- Ma, A. T., & Mekalanos, J. J. (2010). In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4365-4370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915156107>
- MacIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M., & Pukatzki, S. (2010). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19520-19524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012931107>
- Madec, S., Pichereau, V., Jacq, A., Paillard, M., Boisset, C., Guérard, F., ... Nicolas, J.-L. (2014). Characterization of the Secretomes of Two *Vibrios* Pathogenic to Mollusks. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113097>

- Martin, J. H., & Michael Gordon, R. (1988). Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 35(2), 177-196. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(88\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0198-0149(88)90035-0)
- Mathur, J., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2007). Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 63(3), 848-858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05544.x>
- Matson, J. S., Withey, J. H., & DiRita, V. J. (2007). Regulatory Networks Controlling *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression. *Infection and Immunity*, 75(12), 5542-5549. <https://doi.org/10.1128/IAI.01094-07>
- Matson, J. S., Yoo, H. J., Hakansson, K., & DiRita, V. J. (2010a). Polymyxin B Resistance in El Tor *Vibrio cholerae* Requires Lipid Acylation Catalyzed by MsbB. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2044-2052. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
- Matson, J. S., Yoo, H. J., Hakansson, K., & DiRita, V. J. (2010b). Polymyxin B Resistance in El Tor *Vibrio cholerae* Requires Lipid Acylation Catalyzed by MsbB. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2044-2052. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
- Matz, C., & Kjelleberg, S. (2005). Off the hook—How bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13(7), 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265-278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Mehra, T., Köberle, M., Braunsdorf, C., Mailänder-Sanchez, D., Borelli, C., & Schaller, M. (2012). Alternative approaches to antifungal therapies. *Experimental dermatology*, 21(10), 778-782. <https://doi.org/10.1111/exd.12004>

- Meibom, K. L. (2005). Chitin Induces Natural Competence in *Vibrio cholerae*. *Science*, 310(5755), 1824-1827. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>
- Meibom, Karin L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C.-Y., Roseman, S., & Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2524-2529. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Mekalanos, J. J. (1983). Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 35(1), 253-263. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90228-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90228-3)
- Merrell, D. S., Butler, S. M., Qadri, F., Dolganov, N. A., Alam, A., Cohen, M. B., ... Camilli, A. (2002). Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 417(6889), 642-645. <https://doi.org/10.1038/nature00778>
- Merrell, D. S., & Camilli, A. (1999). The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Molecular Microbiology*, 34(4), 836-849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01650.x>
- Merrell, D. S., & Camilli, A. (2000). Regulation of *Vibrio cholerae* Genes Required for Acid Tolerance by a Member of the “ToxR-Like” Family of Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5342-5350.
- Merrell, D. S., Hava, D. L., & Camilli, A. (2002). Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1471-1491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02857.x>
- Merrell, D. S., Tischler, A. D., Lee, S. H., & Camilli, A. (2000). *Vibrio cholerae* Requires *rpoS* for Efficient Intestinal Colonization. *Infection and Immunity*, 68(12), 6691-6696.

- Metzger, L. C., Stutzmann, S., Scignari, T., Van der Henst, C., Matthey, N., & Blokesch, M. (2016). Independent Regulation of Type VI Secretion in *Vibrio cholerae* by TfoX and TfoY. *Cell Reports*, *15*(5), 951-958. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.092>
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M. W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Pütsep, K., & Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut*, *57*(6), 764-771. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.141481>
- Midani, F. S., Weil, A. A., Chowdhury, F., Begum, Y. A., Khan, A. I., Debela, M. D., ... LaRocque, R. C. (2018). Human Gut Microbiota Predicts Susceptibility to *Vibrio cholerae* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *218*(4), 645-653. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy192>
- Miller, C. J., Drasar, B. S., & Feachem, R. G. (1984). Response of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 to physico-chemical stresses in aquatic environments. *The Journal of Hygiene*, *93*(3), 475-495.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *55*, 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Miller, Melissa B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., & Bassler, B. L. (2002). Parallel Quorum Sensing Systems Converge to Regulate Virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, *110*(3), 303-314. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00829-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00829-2)
- Millet, Y. A., Alvarez, D., Ringgaard, S., Andrian, U. H. von, Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2014). Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *PLOS Pathogens*, *10*(10), e1004405. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004405>

- Mishra, A., Taneja, N., & Sharma, M. (2012). Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(5), 945-953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05255.x>
- Miyata, S. T., Kitaoka, M., Brooks, T. M., McAuley, S. B., & Pukatzki, S. (2011). *Vibrio cholerae* Requires the Type VI Secretion System Virulence Factor VasX To Kill *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity*, *79*(7), 2941-2949. <https://doi.org/10.1128/IAI.01266-10>
- Miyata, S. T., Unterweger, D., Rudko, S. P., & Pukatzki, S. (2013). Dual Expression Profile of Type VI Secretion System Immunity Genes Protects Pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathogens*, *9*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>
- Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1999). Bacteriocins : Mechanism of membrane insertion and pore formation. In W. N. Konings, O. P. Kuipers, & J. H. J. H. In 't Veld (Éd.), *Lactic Acid Bacteria : Genetics, Metabolism and Applications* (p. 185-198). https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_8
- Moorthy, S., & Watnick, P. I. (2005). Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Molecular microbiology*, *57*(6), 1623-1635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04797.x>
- Moss, J., & Vaughan, M. (1977). Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(7), 2455-2457.

- Müller, M. (2005). Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 156(2), 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.016>
- Musk, D. J., & Hergenrother, P. J. (2006). Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: Effective compounds and promising targets. *Current Medicinal Chemistry*, 13(18), 2163-2177.
- Nair, G. B., Faruque, S. M., Bhuiyan, N. A., Kamruzzaman, M., Siddique, A. K., & Sack, D. A. (2002). New Variants of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotype from Hospitalized Patients with Acute Diarrhea in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3296-3299. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
- Navaneethan, U., & Giannella, R. A. (2008). Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 5(11), 637-647. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1264>
- Nazarov, S., Schneider, J. P., Brackmann, M., Goldie, K. N., Stahlberg, H., & Basler, M. (2018). Cryo-EM reconstruction of Type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *The EMBO Journal*, 37(4), e97103. <https://doi.org/10.15252/embj.201797103>
- Neoh, S. H., & Rowley, D. (1970). The Antigens of *Vibrio cholerae* Involved in the Vibriocidal Action of Antibody and Complement. *The Journal of Infectious Diseases*, 121(5), 505-513.
- Nesper, J., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Kapfhammer, D., Kraiß, A., & Reidl, J. (2001). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* Mutants: Influence on

- Lipopolysaccharide Structure, Colonization, and Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 69(1), 435-445. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.435-445.2001>
- Nesper, J., Schild, S., Lauriano, C. M., Kraiss, A., Klose, K. E., & Reidl, J. (2002). Role of *Vibrio cholerae* O139 Surface Polysaccharides in Intestinal Colonization. *Infection and Immunity*, 70(11), 5990-5996. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.5990-5996.2002>
- Nielsen, Alex T., Dolganov, N. A., Rasmussen, T., Otto, G., Miller, M. C., Felt, S. A., ... Schoolnik, G. K. (2010). A bistable switch and anatomical site control *Vibrio cholerae* virulence gene expression in the intestine. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001102. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001102>
- Nielsen, Alex Toftgaard, Dolganov, N. A., Otto, G., Miller, M. C., Wu, C. Y., & Schoolnik, G. K. (2006). RpoS Controls the *Vibrio cholerae* Mucosal Escape Response. *PLOS Pathogens*, 2(10), e109. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020109>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Ottemann, K. M., & Miller, J. F. (1997). Roles for motility in bacterial–host interactions. *Molecular Microbiology*, 24(6), 1109-1117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4281787.x>
- Palmer, K. L., & Gilmore, M. S. (2010). Multidrug-Resistant Enterococci Lack CRISPR-cas. *mBio*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00227-10>
- Papanikou, E., Karamanou, S., & Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(11), 839-851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1771>

- Pardío Sedas, V. T. (2007). Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment : A climate link. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 1(03), 224-241. <https://doi.org/10.3855/jidc.359>
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60(4), 575-608.
- Pearson, G. D., Woods, A., Chiang, S. L., & Mekalanos, J. J. (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3750-3754. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3750>
- Pérez, M. E. M., Macek, M., & Galván, M. T. C. (2004). Do Protozoa Control the Elimination of *Vibrio cholerae* in Brackish Water? *International Review of Hydrobiology*, 89(2), 215-227. <https://doi.org/10.1002/iroh.200310644>
- Pestonjamas, V. K., Huttner, K. H., & Gallo, R. L. (2001). Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. *Peptides*, 22(10), 1643-1650. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00499-5](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00499-5)
- Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Baxter, M. A., Harrington, A. T., Blocker, A., & Picking, W. D. (2005). IpaD of *Shigella flexneri* Is Independently Required for Regulation of Ipa Protein Secretion and Efficient Insertion of IpaB and IpaC into Host Membranes. *Infection and Immunity*, 73(3), 1432-1440. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1432-1440.2005>
- Piskunova, J., Maisonneuve, E., Germain, E., Gerdes, K., & Severinov, K. (2017). Peptide-nucleotide antibiotic Microcin C is a potent inducer of stringent response and

- persistence in both sensitive and producing cells. *Molecular Microbiology*, 104(3), 463-471. <https://doi.org/10.1111/mmi.13640>
- Plecha, S. C., & Withey, J. H. (2015). Mechanism for Inhibition of *Vibrio cholerae* ToxT Activity by the Unsaturated Fatty Acid Components of Bile. *Journal of Bacteriology*, 197(10), 1716-1725. <https://doi.org/10.1128/JB.02409-14>
- Pollitzer, R. (1954). Cholera studies. *Bulletin of the World Health Organization*, 10(3), 421-461.
- Pratt, J. T., Ismail, A. M., & Camilli, A. (2010). PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 77(6), 1595-1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07310.x>
- Pratt, J. T., McDonough, E., & Camilli, A. (2009). PhoB Regulates Motility, Biofilms, and Cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6632-6642. <https://doi.org/10.1128/JB.00708-09>
- Preiss, J., & Romeo, T. (1994). Molecular Biology and Regulatory Aspects of Glycogen Biosynthesis in Bacteria 11A glossary for this chapter appears on pp. 326–327. In W. E. Cohn & K. Moldave (Éd.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 47, p. 299-329). [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60255-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60255-X)
- Provenzano, D., & Klose, K. E. (2000). Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10220-10224. <https://doi.org/10.1073/pnas.170219997>

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(39), 15508-15513. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706532104>
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ... Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1528-1533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
- Qadri, F, Bhuiyan, T. R., Dutta, K. K., Raqib, R., Alam, M. S., Alam, N. H., ... Mathan, M. M. (2004). Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut*, *53*(1), 62-69.
- Qadri, Firdausi, Raqib, R., Ahmed, F., Rahman, T., Wenneras, C., Kumar Das, S., ... Svennerholm, A.-M. (2002). Increased Levels of Inflammatory Mediators in Children and Adults Infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *9*(2), 221-229. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.2.221-229.2002>
- Qadri, Firdausi, Wierzba, T. F., Ali, M., Chowdhury, F., Khan, A. I., Saha, A., ... Clemens, J. D. (2016). Efficacy of a Single-Dose, Inactivated Oral Cholera Vaccine in Bangladesh. *New England Journal of Medicine*, *374*(18), 1723-1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510330>

- Rabbani, G. H., Islam, S., Chowdhury, A. K., Mitra, A. K., Miller, M. J., & Fuchs, G. (2001). Increased nitrite and nitrate concentrations in sera and urine of patients with cholera or shigellosis. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(2), 467-472. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03528.x>
- Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Shimada, T., ... Takeda, Y. (1993). Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *The Lancet*, *341*(8846), 703-704. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90480-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90480-5)
- Reguera, G., & Kolter, R. (2005). Virulence and the environment: A novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *Journal of Bacteriology*, *187*(10), 3551-3555. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005>
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G. J., & Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(10), 1226-1232. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1910>
- Rhine, J. A., & Taylor, R. K. (1994). TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, *13*(6), 1013-1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00492.x>
- Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., & Michalski, J.-C. (2004). Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal*, *384*(Pt 2), 307-316. <https://doi.org/10.1042/BJ20040605>
- Robinson, C., & Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1694*(1-3), 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.010>

- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chemical Reviews*, *111*(9), 5492-5505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>
- Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Åhlund, M., Lundmark, R., ... Wai, S. N. (2015). Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PloS One*, *10*(7), e0134098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134098>
- Rosales-Reyes, R., Saldias, M. S., Aubert, D. F., El-Halfawy, O. M., & Valvano, M. A. (2012). The *suhB* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for protein secretion, biofilm formation, motility and polymyxin B resistance. *Microbiology*, *158*(Pt_9), 2315-2324. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060988-0>
- Rotem, S., & Mor, A. (2009). Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1788*(8), 1582-1592. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.020>
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, *36*(2), 146-167. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Rutherford, S. T., van Kessel, J. C., Shao, Y., & Bassler, B. L. (2011). AphA and LuxR/HapR reciprocally control Quorum Sensing in *Vibrios*. *Genes & Development*, *25*(4), 397-408. <https://doi.org/10.1101/gad.2015011>
- Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B., & Siddique, A. K. (2004). Cholera. *The Lancet*, *363*(9404), 223-233. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15328-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15328-7)

- Sakib, S. N., Reddi, G., & Almagro-Moreno, S. (2018). Environmental Role of Pathogenic Traits in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 200(15).
<https://doi.org/10.1128/JB.00795-17>
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Laboratory, C. S. H. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd. ed). Consulté à l'adresse
<https://trove.nla.gov.au/version/45739910>
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers : Biosynthesis of a novel Quorum Sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41(2), 463-476. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x>
- Schifano, J. M., Edifor, R., Sharp, J. D., Ouyang, M., Konkimalla, A., Husson, R. N., & Woychik, N. A. (2013). Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8501-8506.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1222031110>
- Schild, S., Tamayo, R., Nelson, E. J., Qadri, F., Calderwood, S. B., & Camilli, A. (2007). Genes Induced Late in Infection Increase Fitness of *Vibrio cholerae* after Release into the Environment. *Cell Host & Microbe*, 2(4), 264-277.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.004>
- Schuhmacher, D. A., & Klose, K. E. (1999). Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1508-1514.
- Seed, K. D., Bodi, K. L., Kropinski, A. M., Ackermann, H.-W., Calderwood, S. B., Qadri, F., & Camilli, A. (2011). Evidence of a Dominant Lineage of *Vibrio cholerae*-Specific

- Lytic Bacteriophages Shed by Cholera Patients over a 10-Year Period in Dhaka, Bangladesh. *MBio*, 2(1), e00334-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00334-10>
- Seed, K. D., Faruque, S. M., Mekalanos, J. J., Calderwood, S. B., Qadri, F., & Camilli, A. (2012). Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002917. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002917>
- Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology*, 6(6), 551-557. <https://doi.org/10.1038/ni1206>
- Semenova, E., Yuzenkova, Y., Peduzzi, J., Rebuffat, S., & Severinov, K. (2005). Structure-Activity Analysis of Microcin J25 : Distinct Parts of the Threaded Lasso Molecule Are Responsible for Interaction with Bacterial RNA Polymerase. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3859-3863. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3859-3863.2005>
- Senderovich, Y., Izhaki, I., & Halpern, M. (2010). Fish as Reservoirs and Vectors of *Vibrio cholerae*. *PLOS ONE*, 5(1), e8607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008607>
- Seper, A., Fengler, V. H. I., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Bishop, A. L., ... Schild, S. (2011). Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 82(4), 1015-1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07867.x>
- Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., Kazakov, T., & Gelfand, M. S. (2007). Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology*, 65(6), 1380-1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05874.x>

- Shao, Y., & Bassler, B. L. (2014). Quorum regulatory small RNAs repress type VI secretion in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 92(5), 921-930.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12599>
- Shaw, C. E., & Taylor, R. K. (1990). *Vibrio cholerae* O395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. *Infection and Immunity*, 58(9), 3042-3049.
- Shikuma, N. J., Fong, J. C. N., Odell, L. S., Perchuk, B. S., Laub, M. T., & Yildiz, F. H. (2009). Overexpression of VpsS, a Hybrid Sensor Kinase, Enhances Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 191(16), 5147-5158.
<https://doi.org/10.1128/JB.00401-09>
- Shikuma, N. J., & Hadfield, M. G. (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling*, 26(1), 39-46.
<https://doi.org/10.1080/08927010903282814>
- Shikuma, N. J., & Yildiz, F. H. (2009). Identification and characterization of OscR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4082-4096. <https://doi.org/10.1128/JB.01540-08>
- Shin, O. S., Uddin, T., Citorik, R., Wang, J. P., Della Pelle, P., Kradin, R. L., ... Harris, J. B. (2011). LPLUNC1 Modulates Innate Immune Responses to *Vibrio cholerae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(9), 1349-1357.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir544>
- Shirin, T., Rahman, A., Danielsson, Å., Uddin, T., Bhuyian, T. R., Sheikh, A., ... Hammarström, M.-L. (2011). Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or

- enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*, 13(12-13), 1111-1120. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.014>
- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 500(7462), 350-353. <https://doi.org/10.1038/nature12453>
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Silva, A. J., Pham, K., & Benitez, J. A. (2003). Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 7), 1883-1891. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26086-0>
- Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., ... Mougous, J. D. (2013). Haemolysin Co-regulated Protein is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates. *Molecular cell*, 51(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.025>
- Skorupski, K., & Taylor, R. K. (1999). A new level in the *Vibrio cholerae* ToxR virulence cascade: AphA is required for transcriptional activation of the *tcpPH* operon. *Molecular Microbiology*, 31(3), 763-771.
- Smith, D. R., Maestre-Reyna, M., Lee, G., Gerard, H., Wang, A. H.-J., & Watnick, P. I. (2015). In situ proteolysis of the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA promotes biofilm recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10491-10496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512424112>

- Snow, J. (1856). On the Mode of Communication of Cholera. *Edinburgh Medical Journal*, 1(7), 668-670.
- Son, M. S., Megli, C. J., Kovacicova, G., Qadri, F., & Taylor, R. K. (2011). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Variant Clinical Isolates from Bangladesh and Haiti, Including a Molecular Genetic Analysis of Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3739-3749. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
- Srivastava, D., Harris, R. C., & Waters, C. M. (2011). Integration of cyclic di-GMP and Quorum Sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6331-6341. <https://doi.org/10.1128/JB.05167-11>
- Steinstraesser, L., Kraneburg, U., Jacobsen, F., & Al-Benna, S. (2011). Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 216(3), 322-333. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.07.003>
- Sun, S., Kjelleberg, S., & McDougald, D. (2013). Relative Contributions of *Vibrio* Polysaccharide and Quorum Sensing to the Resistance of *Vibrio cholerae* to Predation by Heterotrophic Protists. *PLOS ONE*, 8(2), e56338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056338>
- Swenson, G. J., Stochastic, J., Bolander, F. F., & Long, R. A. (2012). Acid stress response in environmental and clinical strains of enteric bacteria. *Frontiers in Biology*, 7(6), 495-505. <https://doi.org/10.1007/s11515-012-1191-5>
- Syed, K. A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., ... Klose, K. E. (2009). The *Vibrio cholerae* Flagellar Regulatory Hierarchy Controls Expression of Virulence Factors. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6555-6570. <https://doi.org/10.1128/JB.00949-09>

- Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 7173-7178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900693106>
- Szabady, R. L., Yanta, J. H., Halladin, D. K., Schofield, M. J., & Welch, R. A. (2011). TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins. *Microbiology*, *157*(Pt 2), 516-525. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044529-0>
- Tam, V. C., Serruto, D., Dziejman, M., Briher, W., & Mekalanos, J. J. (2007). A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host & Microbe*, *1*(2), 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.005>
- Tamayo, R., Patimalla, B., & Camilli, A. (2010). Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, *78*(8), 3560-3569. <https://doi.org/10.1128/IAI.00048-10>
- Taylor, D. L., Bina, X. R., & Bina, J. E. (2012). *Vibrio cholerae* *vexH* Encodes a Multiple Drug Efflux Pump That Contributes to the Production of Cholera Toxin and the Toxin Co-Regulated Pilus. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038208>
- Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B., & Mekalanos, J. J. (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(9), 2833-2837.

- Thelin, K. H., & Taylor, R. K. (1996). Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infection and Immunity*, *64*(7), 2853-2856.
- Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The Type 1 secretion pathway—The hemolysin system and beyond. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1843*(8), 1629-1641. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.017>
- Toska, J., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2018). Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(31), 7997-8002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808469115>
- Towner, K. J., Pearson, N. J., Mhalu, F. S., & O'Grady, F. (1980). Resistance to antimicrobial agents of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during the fourth cholera epidemic in the United Republic of Tanzania. *Bulletin of the World Health Organization*, *58*(5), 747-751.
- Townsley, L., Sison Mangus, M. P., Mehic, S., & Yildiz, F. H. (2016). Response of *Vibrio cholerae* to Low-Temperature Shifts : CspV Regulation of Type VI Secretion, Biofilm Formation, and Association with Zooplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(14), 4441-4452. <https://doi.org/10.1128/AEM.00807-16>
- Townsley, L., & Yildiz, F. H. (2015). Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology*, *17*(11), 4290-4305. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12799>
- Troisfontaines, P., & Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion : More systems than you think. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *20*, 326-339. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2005>

- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y. K., & Kaper, J. B. (1998). The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14464-14469.
- Tsou, A. M., Cai, T., Liu, Z., Zhu, J., & Kulkarni, R. V. (2009). Regulatory targets of Quorum Sensing in *Vibrio cholerae*: Evidence for two distinct HapR-binding motifs. *Nucleic Acids Research*, 37(8), 2747-2756. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp121>
- Unterweger, D., Kostiuk, B., & Pukatzki, S. (2017). Adaptor Proteins of Type VI Secretion System Effectors. *Trends in Microbiology*, 25(1), 8-10. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.10.003>
- Unterweger, D., Miyata, S. T., Bachmann, V., Brooks, T. M., Mullins, T., Kostiuk, B., ... Pukatzki, S. (2014). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
- Utada, A. S., Bennett, R. R., Fong, J. C. N., Gibiansky, M. L., Yildiz, F. H., Golestanian, R., & Wong, G. C. L. (2014). *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nature communications*, 5, 4913. <https://doi.org/10.1038/ncomms5913>
- Van Loon, F. P. L., Clemens, J. D., Shahrier, M., Sack, D. A., Stefhensen, C. B., Khan, M. R., ... Banik, A. K. (1990). Low gastric acid as a rise factor for cholera transmission: Application of a new non-invasive gastric acid field test. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43(12), 1361-1367. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(90\)90103-V](https://doi.org/10.1016/0895-4356(90)90103-V)

- van Ulsen, P., Rahman, S. ur, Jong, W. S. P., Daleke-Schermerhorn, M. H., & Luirink, J. (2014). Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(8), 1592-1611. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.006>
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Moreno, M., Fabiano, M., Pane, L., Pruzzo, C., & The *Vibrio* Sea Consortium. (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. And pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microbial Ecology*, 58(4), 808-818. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9542-8>
- Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: Focus on invertebrates. *Trends in pharmacological sciences*, 23(11), 494-496. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02105-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02105-3)
- von Krüger, W. M. A., Lery, L. M. S., Soares, M. R., de Neves-Manta, F. S., Batista e Silva, C. M., Neves-Ferreira, A. G. da C., ... Bisch, P. M. (2006). The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: Disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*, 6(5), 1495-1511. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500238>
- Vora, G. J., Meador, C. E., Bird, M. M., Bopp, C. A., Andreadis, J. D., & Stenger, D. A. (2005). Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19109-19114. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505033102>
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., & Yoshida, S. I. (1998). *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony

- morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3648-3655.
- Waldor, M K, Colwell, R., & Mekalanos, J. J. (1994). The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11388-11392.
- Waldor, Matthew K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*, 272(5270), 1910-1914. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
- Wang, H., Ayala, J. C., Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2012). Interaction of the histone-like nucleoid structuring protein and the general stress response regulator RpoS at *Vibrio cholerae* promoters that regulate motility and hemagglutinin/protease expression. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1205-1215. <https://doi.org/10.1128/JB.05900-11>
- Wang, H., Ayala, J. C., Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2012). The Histone-Like Nucleoid Structuring Protein (H-NS) Is a Repressor of *Vibrio cholerae* Exopolysaccharide Biosynthesis (*vps*) Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2482-2488. <https://doi.org/10.1128/AEM.07629-11>
- Watnick, P. I., Fullner, K. J., & Kolter, R. (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal of Bacteriology*, 181(11), 3606-3609.
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L., & Kolter, R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, 39(2), 223-235.

- Watve, S. S., Thomas, J., & Hammer, B. K. (2015). CytR Is a Global Positive Regulator of Competence, Type VI Secretion, and Chitinases in *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138834>
- Weil, A. A., Arifuzzaman, M., Bhuiyan, T. R., LaRocque, R. C., Harris, A. M., Kendall, E. A., ... Calderwood, S. B. (2009). Memory T-Cell Responses to *Vibrio cholerae* O1 Infection. *Infection and Immunity*, *77*(11), 5090-5096. <https://doi.org/10.1128/IAI.00793-09>
- WHO | Ending Cholera. (s. d.). Consulté 26 avril 2019, à l'adresse WHO website: <http://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap/en/>
- Wong, H. C., & Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(2), 359-366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x>
- Wong, M. J. Q., Liang, X., Smart, M., Tang, L., Moore, R., Ingalls, B., & Dong, T. G. (2016). Microbial Herd Protection Mediated by Antagonistic Interaction in Polymicrobial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, *82*(23), 6881-6888. <https://doi.org/10.1128/AEM.02210-16>
- Worden, A. Z., Seidel, M., Smriga, S., Wick, A., Malfatti, F., Bartlett, D., & Azam, F. (2005). Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology*, *9*.
- Wyckoff, E. E., Mey, A. R., & Payne, S. M. (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *BioMetals*, *20*(3-4), 405-416. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9073-4>

- Wyckoff, E. E., Valle, A.-M., Smith, S. L., & Payne, S. M. (1999). A Multifunctional ATP-Binding Cassette Transporter System from *Vibrio cholerae* Transports Vibriobactin and Enterobactin. *Journal of Bacteriology*, *181*(24), 7588-7596.
- Yamai, S., Okitsu, T., Shimada, T., & Katsube, Y. (1997). Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, *71*(10), 1037-1045.
- Yamamoto, T., & Yokota, T. (1988). Electron microscopic study of *Vibrio cholerae* O1 adherence to the mucus coat and villus surface in the human small intestine. *Infection and Immunity*, *56*(10), 2753-2759.
- Yang, L., Liu, Y., Markussen, T., Høiby, N., Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2011). Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *62*(3), 339-347. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00820.x>
- Yang, M., Frey, E. M., Liu, Z., Bishar, R., & Zhu, J. (2010). The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. *Infection and Immunity*, *78*(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00429-09>
- Yildiz, F. H., Dolganov, N. A., & Schoolnik, G. K. (2001). VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of *vps* Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Journal of Bacteriology*, *183*(5), 1716-1726. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001>

- Yildiz, F. H., & Schoolnik, G. K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor : Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 4028-4033. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
- Yildiz, Fitnat H., & Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms : So much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Yim, G., Huimi Wang, H., & Davies FRS, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1195-1200. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2044>
- Ymele-Leki, P., Houot, L., & Watnick, P. I. (2013). Mannitol and the Mannitol-Specific Enzyme IIB Subunit Activate *Vibrio cholerae* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(15), 4675-4683. <https://doi.org/10.1128/AEM.01184-13>
- Zamorano-Sánchez, D., Fong, J. C. N., Kilic, S., Erill, I., & Yildiz, F. H. (2015). Identification and characterization of VpsR and VpsT binding sites in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 197(7), 1221-1235. <https://doi.org/10.1128/JB.02439-14>
- Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., & Nation, R. L. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens : A critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1206-1215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm357>
- Zhang, L., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14-R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>

- Zheng, J., Ho, B., & Mekalanos, J. J. (2011). Genetic Analysis of Anti-Amoebae and Anti-Bacterial Activities of the Type VI Secretion System in *Vibrio cholerae*. *PLOS ONE*, 6(8), e23876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023876>
- Zheng, J., Shin, O. S., Cameron, D. E., & Mekalanos, J. J. (2010). Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21128-21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014998107>
- Zhu, J., & Mekalanos, J. J. (2003). Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell*, 5(4), 647-656. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00295-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00295-8)
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., & Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3129-3134. <https://doi.org/10.1073/pnas.052694299>
- Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y. R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., ... Cascales, E. (2016). Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature*, 531(7592), 59-63. <https://doi.org/10.1038/nature17182>

Annexe

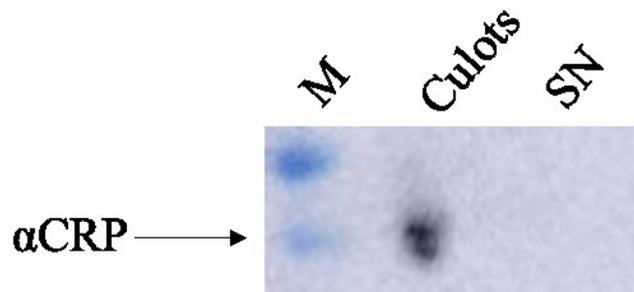


Figure 26. Western blot dirigé contre la protéine CRP, protéine exclusivement cytoplasmique, sur les échantillons de culots bactériens et de surnageants de culture de la souche A1552 de *Vibrio cholerae*, rendant compte qu'aucune protéine cytoplasmique ne contamine les surnageants.

M représente le marqueur de taille de protéines.

