



**HAL**  
open science

# DES BACTERIES ALIMENTAIRES ET/OU COMMENSALES AUX PATHOGENES

Jamila Anba-mondoloni

► **To cite this version:**

Jamila Anba-mondoloni. DES BACTERIES ALIMENTAIRES ET/OU COMMENSALES AUX PATHOGENES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Saclay, 2020. tel-04324030

**HAL Id: tel-04324030**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04324030v1>**

Submitted on 5 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## **RAPPORT POUR L'HABILITATION À DIRIGER LES RECHERCHES**

**JAMILA ANBA MONDOLONI**

**CHARGÉE DE RECHERCHE INRAE**

***DES BACTÉRIES ALIMENTAIRES ET/OU COMMENSALES AUX PATHOGENES***

SOUTENANCE LE 17 DECEMBRE 2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

<b>MME SARAH DUBRAC</b>	<b>CHARGÉE DE RECHERCHE, INSTITUT PASTEUR</b>	<b>RAPPORTEUR</b>
<b>MME CATHERINE SCHOULER</b>	<b>DIRECTRICE DE RECHERCHE, INRAE</b>	<b>RAPPORTEUR</b>
<b>MR MICHEL FONS</b>	<b>PROFESSEUR, UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE</b>	<b>RAPPORTEUR</b>
<b>MME ALEXANDRA GRUSS</b>	<b>DIRECTRICE DE RECHERCHE EMERITE, INRAE</b>	<b>EXAMINATEUR</b>
<b>MME OLGA SOUTOURINA</b>	<b>PROFESSEURE, UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY</b>	<b>EXAMINATEUR</b>

## **PLAN RAPPORT HDR**

I. Travaux en Thèse : exportation des protéines chez *Escherichia coli*

II. Post-Doc

II.1 *Pseudomonas aeruginosa*

II.2 *Corynebacterium glutamicum*

III. Travaux INRA

III.1 *Lactococcus lactis*

III.1 *Streptococcus thermophilus*

III.3 *Lactobacillus sakei*

III.4 Devenir des bactéries lactiques dans le tractus digestif

IV Travaux actuels

IV.1 Généralités sur *Staphylococcus aureus*

IV.2 Résistance aux antibiotiques

IV.3 La voie FASII

IV.4 Etude protéomique de la réponse aux anti-FASII de *S. aureus*

V Projet de recherches

V.1 Devenir du LTA

V.2 Analyses protéomiques

V.3 Impacts sur la fluidité membranaire

VI Conclusions et Perspectives

## TRAVAUX DE RECHERCHES

### Avant-propos

J'ai eu la chance de travailler sur divers systèmes biologiques, qui font le lien entre l'alimentation et l'hôte qui les consomme. J'ai démarré ma carrière à l'INRA en Octobre 1990 sur les performances des bactéries lactiques dans l'industrie laitière et carnée, j'ai poursuivi sur le devenir des bactéries alimentaires dans l'écosystème digestif. Depuis 2016, je me suis engagée dans l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques d'une espèce pathogène impactant la santé Humaine et vétérinaire. Dans ce mémoire, j'exposerai les différents aspects de ma recherche, depuis mon doctorat à ce jour, avec l'accent sur des études qui m'ont tenues à cœur, en m'efforçant d'exposer le fil conducteur qui m'a amené vers mon projet actuel, avec ses perspectives. J'ai donc choisi de présenter surtout les études marquantes de ma carrière.

### **I/ THESE : EXPORTATION DES PROTEINES CHEZ *ESCHERICHIA COLI*. (1984-1987)**

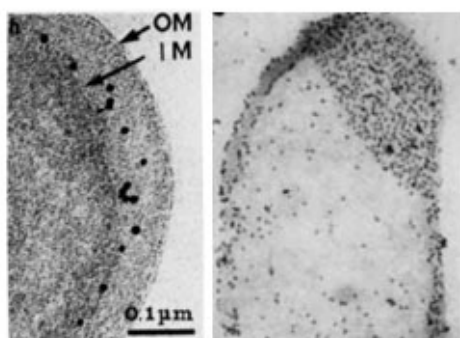
Mes premiers pas dans le monde de la recherche en microbiologie étaient en DEA avec un sujet non abordé au cours de mon cursus universitaire : La sécrétion des protéines. Le mécanisme de sécrétion des protéines dans les cellules eucaryotes était connu et publié (1,2). Mais dans le domaine bactérien tout était à découvrir, les premières protéines impliquées dans la sécrétion (celles de la voie Sec : SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, secG, SecY et la Leader peptidase) commençaient à être identifiées génétiquement ((3-5)). Mais le mécanisme restait à découvrir et c'était un sacré challenge. Toute protéine est synthétisée dans le cytoplasme, certaines fonctionnent en dehors du cytoplasme et pour cela tout un processus est mis en place par la bactérie pour les adresser à leur localisation finale. Chez *Escherichia coli*, bactérie à Gram-Négatif, le cytoplasme est entouré d'une première membrane dite membrane interne, une seconde membrane appelée membrane externe décorée de lipopolysaccharide (LPS). Ces deux membranes délimitent l'espace périplasmique. On parle d'exportation des protéines quand elles sont adressées aux membranes ou l'espace périplasmique, elles sont sécrétées quand elles sont dirigées à l'extérieur de la bactérie ((6). Les protéines extra-cytoplasmiques sont adressées à leur destination finale via les différents systèmes indépendants de la sécrétion (Sec-dépendant pour les protéines en structure primaire déroulée, TAT pour Twin Arginine Transfert concernant des protéines déjà repliées) (7),(8). Depuis, 9 systèmes de sécrétion sont décrits dans des bactéries essentiellement des pathogènes. Ces systèmes sont spécialisés dans l'interaction avec l'hôte, dans la conjugaison, dans la production de bactériocines et/ou l'injection d'ADN phagique ainsi que dans le transfert horizontal de gènes selon que les bactéries soient Gram négatives ou Gram positives (9,10).

Durant ma thèse, l'objectif était de mettre au point un système de production de protéines hétérologues solubles extra-cytoplasmiques chez *E. coli*. Le modèle d'étude était la protéine périplasmique affine pour le phosphate PhoS (PstS). Cette protéine appartient au système de transport du phosphate inorganique (Pi) à haute affinité regroupé sous le terme de régulon Pho. Ce régulon est composé d'un système à deux composants (TCS) PhoB-PhoR (régulateur PhoB et senseur PhoR) et le système Pst (Transport Spécifique de Pi). Les bactéries détectent et répondent aux variations en Pi en activant le régulon Pho. En carence de Pi, le régulon est activé, la porine PhoE dans la membrane externe capture le Pi qui est transmis à la protéine périplasmique PhoS. La phosphatase alcaline périplasmique PhoA appartient à ce régulon. En carence de phosphate, PhoS représente 80% des protéines périplasmiques (11). En plein boom des biotechnologies, cette surproduction a été adaptée à la production de protéines hétérologues, provenant de l'Homme, chez *E. coli*.

Nous avons montré que dans nos conditions, le facteur de libération de l'hormone de croissance Humaine (mh-GRF) exprimée à partir du promoteur de PhoS et fusionnée à elle, permettait l'obtention d'une protéine intacte. La purification de la protéine fusionnée puis digestion par du bromure de cyanogène a permis l'obtention de 1mg/l de culture pour la protéine mh-GRF active *in vivo* (12). Néanmoins l'exportation dans le périplasma était rapidement saturée et une partie de la protéine restait dans le cytoplasme. Ainsi la surproduction de protéines exportées restait limitée car les sites d'export étaient rapidement saturés. La surproduction de la signal peptidase ne permettait pas d'améliorer le processus (13).

**Figure 1 :** Ci-dessous (A) la visualisation de la protéine périplasmique PhoS marquée par l'anticorps (anti-PhoS) couplé à l'or colloïdal en microscopie électronique sur des coupes ultra-minces. (B) schéma de l'exportation des protéines via le système de type II Sec-dépendant chez *E. coli*

(A)



Immunogold labelling of PhoS

(B)

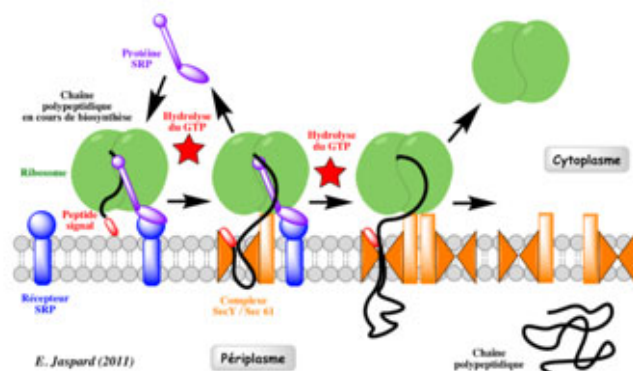


Schéma de sécrétion/export chez *E. coli*

Ces travaux ont fait l'objet de 8 articles et d'un brevet (cf Réf en annexe) et ont permis d'initier les thèses de deux doctorants (J.M. Bolla et V. Géli) sur l'exportation et/ou la sécrétion de protéines en

conditions de surproduction à des fins d'usage biotechnologique. Des années plus tard je mettrai à profit cette étude de thèse afin de comprendre la régulation de la sécrétion des protéines chez les pathogènes, en particulier *Staphylococcus aureus*, qui s'en servent pour tuer les cellules de l'hôte (14).

L'article et le brevet ci-après illustrent le travail effectué lors de ma thèse.

**Anba J, Baty D, Llobes R, Pages JM, Joseph-Liauzun E, Shire D, et al.** Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in *Escherichia coli*. **Gene**. 1987;53(2-3):219-26.

**Brevet** déposé le 12 Avril 1987 « Vecteur d'exportation de protéines chez *Escherichia coli*, bactéries transformées et procédé pour la préparation de protéines ».

N° et date de publication de la demande : FR2599380 - 1987-12-04 A1

N° et date de priorité : FR8607739 – 1986-05-29

Inventeurs : **JAMILA ANBA, ROLAND LLOUBES, DANIEL BATY, JEAN-MARIE PAGES ET CLAUDE LAZDUNSKI**

## II/ TRAVAUX EN POST-DOCTORAT :

### II.1 LE REGULON PHOSPHATE CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (1987-1989)

Après ma thèse, j'ai élargi l'étude du régulon phosphate chez *P. aeruginosa*. L'équipe avait construit une banque d'ADN génomique de la souche PAO1 et avait identifié sur un fragment de 16kb le régulateur *phoB*. Par test de complémentation d'une souche d'*E. coli* mutée dans son propre gène *phoB23*, le gène codant pour PhoB de la souche *P. aeruginosa* PAO1 a été isolé. J'ai sous-cloné et séquencé ce régulateur, et déterminé en partie l'organisation de l'opéron, qui depuis, a été complètement décortiqué (15). PhoB-PhoR est un système à deux composants régulant l'homéostasie du phosphate dans diverses niches écologiques.

Bien que tous les gènes du régulon Pho soient conservés dans les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, l'organisation des gènes sur le chromosome diffère. Chez *E. coli*, deux systèmes de transport du phosphate inorganique (Pi) sont décrits le premier étudié est l'ABC transport PstSCAB, le second transporteur PitA dépend de la force proton-motrice, ce dernier est exprimé en présence de phosphate et fortement induit en carence de Pi avec une activité optimale en environnement acide.

**Figure 2** : Ci-dessous photo des régulons Pho chez *Pseudomonas* et chez *S. aureus*.



Le régulon Pho de *Staphylococcus aureus* est constitué de l'ABC transporteur PstSCAB, du transporteur PitA et d'un 3<sup>ème</sup> système NptA qui appartient à la famille des transporteurs de  $\text{NA}^+/\text{Pi}$  encore peu caractérisé. Contrairement à PitA ce système est optimal en environnement basique.

SAUSA300\_1279 ... SAUSA300\_1283

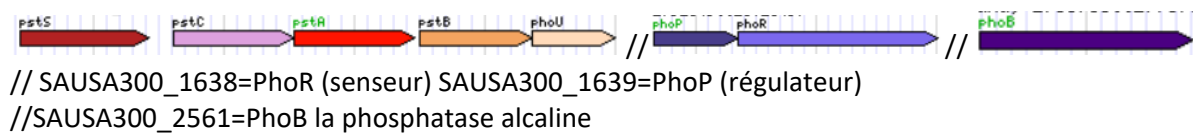
Phosphate transport system regulatory protein PhoU

Phosphate transporter ATP-binding protein PstB

Phosphate ABC transporter permease PstA

Phosphate ABC transporter permease PstC

Phosphate ABC transporter phosphate-binding protein PstS



Ces travaux ont fait l'objet d'un article. **Anba J**, Bidaud M, Vasil ML, Lazdunski A. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. J Bacteriol. 1990;172(8):4685-9.

Quel est l'impact de ce régulon phosphate chez le pathogène *S. aureus* ?

En carence de phosphate, *S. aureus* contourne cette carence grâce au régulon Pho et à une teichoicase GlpQ qui permet de recycler les atomes de phosphate inclus dans les structures teichoïques de son enveloppe. Selon la niche écologique où *S. aureus* se trouve, cette bactérie est capable de récupérer le phosphate à partir des autres espèces bactériennes qui partagent le même écosystème(16). De plus des travaux récents montrent un rôle de PhoP-R dans la pathogénie de cette bactérie (17).

## II.2/ POST-DOCTORAT N°2 : *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* (1989-1990)

Un contrat postdoctoral sur *Corynebacterium glutamicum* m'a été proposé dans le cadre d'un financement par ORGANIBIO sur le programme Couple-Hôte-Vecteur Performant ayant pour objectif la mise au point de vecteur pour un aspect biotechnologique ainsi que de méthode de transformation par électroporation.

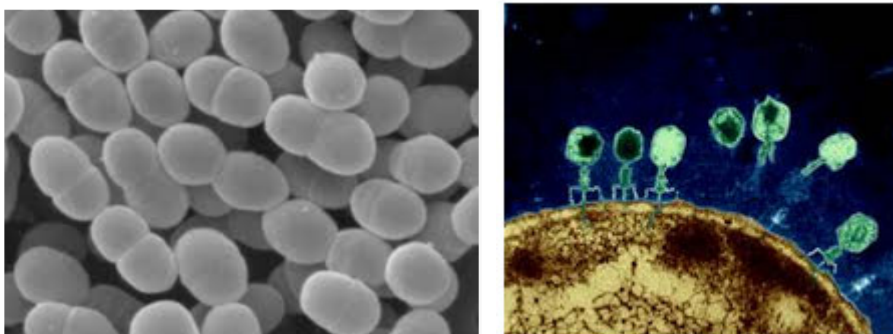
Ce projet « appliqué » a permis de fournir l'outil nécessaire pour établir des plasmides portant des gènes hétérologues chez *C. glutamicum*. Après plusieurs tâtonnements, nous avons réussi à introduire des plasmides porteurs de gènes codant pour la cellulase et l'endoglucanase de *Erwinia chrysanthemi*. Les tests phénotypiques ont montré que ces enzymes étaient actives chez *C. glutamicum*. Cette étude s'est poursuivie avec l'amélioration de la technique d'électroporation par un autre post-doc suite à mon recrutement à l'INRA.

Ces travaux ont été publiés sous forme de rapport scientifique restitué à Organibio. Rétrospectivement, nous aurions dû publier ces travaux dans le domaine public !

### III/ TRAVAUX A L'INRA : DES BACTERIES LACTIQUES ALIMENTAIRES, ET INTESTINALES AUX PATHOGENES HUMAIN ET VETERINAIRE. (DE 1990 A AUJOURD'HUI).

**Mon parcours à l'INRA :** J'ai été recrutée au 1<sup>er</sup> Octobre 1990 à l'INRA dans l'unité de Génétique microbienne dirigée par S.D. Ehrlich. Le laboratoire abordait des thèmes très fondamentaux jusqu'au projets très appliqués, ce qui m'a permis de profiter de différentes approches et de sujets scientifiques. Mes premiers sujets concernaient le fitness des bactéries lactiques (LAB) dans des conditions pertinentes à l'industrie laitière. Ces bactéries sont largement utilisées pour le goût, l'arôme et la texture des produits qu'elles fermentent. C'est pourquoi une partie des travaux était effectuée dans le cadre d'un contrat industriel. Ultérieurement, j'ai été impliquée dans l'étude d'une autre bactérie lactique ayant des propriétés de bio-préservation, utilisée dans l'environnement carné (Unité Flore Lactique et Ecosystème Carné). Avec l'évolution des outils d'analyse, j'ai pu effectuer une étude sur le comportement physiologique de ces bactéries alimentaires dans le tractus digestif (dans l'unité d'Ecologie et de Physiologie du système digestif). Ces dernières études m'ont sensibilisée à l'importance des bactéries présentes chez l'homme. En 2016, j'ai décidé de me consacrer aux bactéries pathogènes, qui occupent les mêmes milieux que les bactéries alimentaires, et qui sont apparentées génétiquement. J'ai ainsi rejoint l'équipe MicroAdapt dirigée par A. Gruss au sein de l'Institut MICALIS et depuis je travaille sur la physiologie du pathogène *Staphylococcus aureus*, à son adaptation aux antimicrobiens et à la recherche de stratégies innovantes pour bloquer sa propagation dans le domaine hospitalier et vétérinaire.

#### III.1/ LA RESISTANCE AUX BACTERIOPHAGES CHEZ *LACTOCOCCUS LACTIS*.



*L. lactis* est une bactérie lactique largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire. Les attaques phagiques causent encore d'énormes pertes à l'industrie laitière. Les bactéries possèdent différents



mécanismes leur permettant de résister aux attaques phagiques. Ces mécanismes peuvent être généralisés (système de restriction/modification) ou spécifiques (18). Mon projet de recherche concernait la caractérisation de système d'infection abortive des phages (Abi pour « abortive infection »). Un tel système, appelé AbiD1, présent sur un plasmide naturel, empêchait la propagation des phages virulents du type bIL170 (phage à tête icosaédrique) et des phages virulents à tête allongée ou prolate (bIL67)(19). Par contre, parmi les phages de la collection du laboratoire, le bIL66 a pu échapper à AbiD1, détecté par la formation des plages de lyse à haute fréquence ( $10^{-4}$ ). Après avoir déterminé la séquence complète du plasmide, j'ai identifié le gène responsable de cette infection abortive. En collaboration avec E. Bidnenko en post-doc, la cible d'AbiD1 a pu être identifiée dans le génome du phage résistant du type bIL66. Nos études transcriptomiques et protéomiques ont permis d'identifier les conditions d'expression d'*abiD1* et de caractériser la cible d'AbiD1 sur le génome des phages AbiD1-sensibles. La cible d'AbiD1 a été localisée au niveau de l'ORF1 dans la région moyenne du phage sensible bIL170. Le clonage de cet ORF1 dans la souche portant le plasmide pIL105 a permis d'amplifier l'action d'AbiD1, aboutissant à l'absence d'apparition de phages résistants à AbiD1 (20) :

#### **Trois publications relatent ces travaux**

**Anba J**, Bidnenko E, Hillier A, Ehrlich D, Chopin MC. Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. J Bacteriol. 1995;177(13):3818-23.

Crutz-Le Coq AM, Cesselin B, Commissaire J, **Anba J**. Microbiology. 2002 Apr;148(Pt 4):985-1001. doi: 10.1099/00221287-148-4-985. Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages.

Bidnenko E, Chopin MC, Ehrlich SD, **Anba J**. *Lactococcus lactis* AbiD1 abortive infection efficiency is drastically increased by a phage protein. FEMS Microbiol Lett. 2002 Sep 10;214(2):283-7

### **III.2/ TRAVAUX SUR *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*.**

Des nouvelles bactéries lactiques faisaient l'objet d'étude dans notre unité en 1998, un objectif primordial était d'avoir des outils génétiques afin de pouvoir les manipuler génétiquement. *Streptococcus thermophilus* est une bactérie majeure nécessaire pour la production du yaourt (avec *Lactobacillus bulgaricus*). Comme suggéré par son nom, *Streptococcus thermophilus* est apparenté aux streptocoques pathogènes, mais ne semble pas posséder des facteurs de virulence. J'ai rejoint l'équipe *S. thermophilus*, avec l'objectif de mettre en place un système génétique adéquat. Ainsi, j'ai mis au point les principales étapes : une méthode d'électroporation, construction d'un vecteur avec le gène codant pour la luciférase provenant de *Photobacterium luminescens* comme gène rapporteur, et l'application d'un plasmide thermosensible permettant d'effectuer des « mutants propres ». Ces

travaux ont été appliqués par tous les collègues de la communauté *S. thermophilus* le vecteur construit sert encore aujourd'hui (21).

J'ai pu transformer *S. thermophilus* à des efficacités de  $10^6$  transformants par  $\mu\text{g}$  d'ADN, cette méthode a permis d'introduire divers plasmides dans *S. thermophilus* et de suivre l'expression de gènes dans les milieux de laboratoire et dans le tractus digestif de rongeurs.

Drouault S, Anba J, Corthier G. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. Appl Environ Microbiol. 2002 Feb;68(2):938-41.

### III.2.1 Synthèses des exopolysaccharides chez *Streptococcus thermophilus*

*S. thermophilus* confère les propriétés texturantes des yaourts, grâce à la production des exopolysaccharides. Ayant obtenu un contrat de recherches (TYBRA) avec Danone, et avec la participation de deux post-docs, nous avons caractérisé génétiquement et phénotypiquement les opérons permettant la production des EPS dans 26 souches industrielles. Ces opérons contenant une quinzaine de gènes ont été séquencés sur les 26 souches (Rallu F. non publié), les différences sont essentiellement localisées en amont du premier gène *epsA* dans la région promotrice (Fig .3). *EpsA* code pour le régulateur de l'opéron constitué des gènes codant pour l'export et la polymérisation des sous-unités saccharidiques et des gènes codant pour les glycosyltransférases. Les structures des EPS n'ont pas été établies mais des différences de rendement ont été observées. Par modification du pool des métabolites carbonés impliqués dans la glycolyse et par inactivation du gène *pgmA* codant pour l' $\alpha$ -Phospho-glucomutase (Fig.4), on a pu augmenter la production d'EPS de 15%. En effet, en réorientant cette chaîne enzymatique vers la production du précurseur des EPS l'UDP-Glucose la production s'est avérée significativement augmentée (résultat breveté). Nos résultats ont permis de potentiellement améliorer les propriétés de texture de *S. thermophilus* par des rajouts « naturels » au milieu. Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale, de deux posters et du brevet suivant :

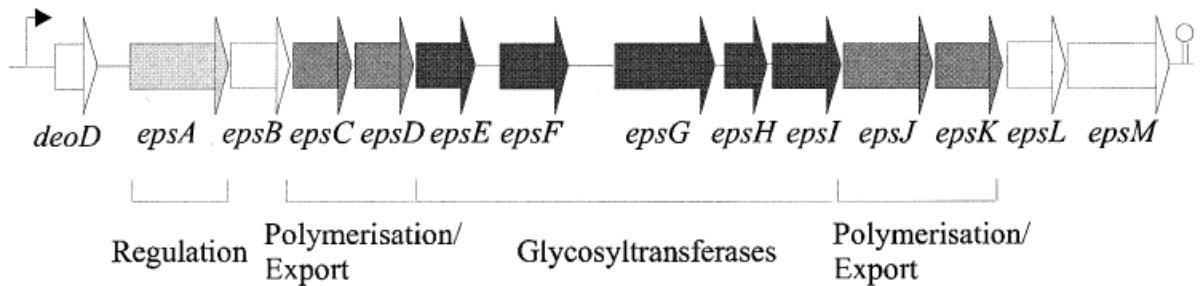
Brevet déposé sur « des mutants de bactéries lactiques surproducteurs exopolysaccharides » : La présente invention a pour objet des mutants de bactéries lactiques surproducteurs d'exopolysaccharides à la suite d'une mutation dans le gène codant l'alpha-Phospho-glucomutase. Ces mutants sont utilisables notamment pour la préparation de produits fermentés ou la production d'exopolysaccharides.

N° FR2807764 - 2001-10-19 (BOPI 2001-42) Type A1.

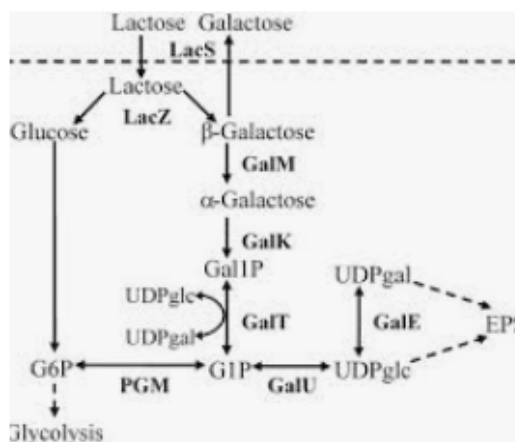
N° et date de priorité : FR0004971 - 2000-04-18

Inventeur(s) : **ANBA-MONDOLONI JAMILA** - HAGEGE JULIETTE - CHAILLOU STEPHANE - BESANCON YOSHPE IRIS - FREMAUX CHRISTOPHE - MENGAUD JEROME - RENAULT PIERRE

**Figure 3** : Exemple de l'opéron codant pour les EPS d'après L. De Vuyst, B. Degeest / FEMS Microbiology Reviews 23 (1999) 153-177



**Figure 4** : Représentation schématique du catabolisme du lactose et de la biosynthèse des exopolysaccharides dans les bactéries lactiques, PGM, Phospho-glucomutase=enzyme inactivée dans cette étude.



Par inactivation de *pgmA*, le glucose-1-P est pris en charge par GalU pour donner l'UDP-Glucose précurseur des EPS.

### III.2.2 BIOSYNTHESE DE L'UREASE CHEZ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

L'acidification rapide par les bactéries lactiques est un gros challenge dans l'industrie laitière (cf schéma). Pour produire les yaourts, deux souches synergiques sont utilisées : *S. thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Fig.). Parfois, l'acidification est ralentie par la production d'uréase par *S. thermophilus*. Chez les industriels laitiers, cette activité enzymatique peut engendrer de lourdes pertes

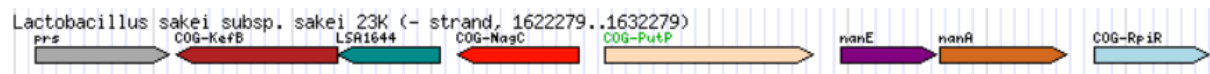
économiques. J'ai donc entrepris la caractérisation des gènes codant pour l'uréase et construit des mutants uréase-négatif. Ce mutant en monoculture sur lait ne permettait l'acidification qu'en présence de bases puriques. Le séquençage du chromosome aurait permis de voir si d'autres mutations s'étaient produites, les séquences génomiques des streptocoques n'étant pas disponible à l'époque, il m'était difficile de proposer un mécanisme. Depuis, il a été montré que l'alcalinisation modérée par *S. thermophilus* boostait la production d'acide lactique par *L. bulgaricus* (22). Ce travail n'a pas été publié car des travaux similaires ont été publiés par le laboratoire de Diégo Mora (23).

### III.3/ TRAVAUX SUR *LACTOBACILLUS SAKEI* BACTERIE LACTIQUE PRESENTE DANS L'ENVIRONNEMENT CARNE

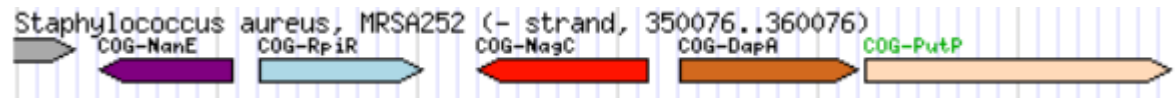
*Lactobacillus sakei* est l'une des plus importantes espèces bactériennes impliquées dans la conservation et la fermentation de la viande. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont porté sur cette espèce en raison de son rôle important dans la microbiologie alimentaire, en particulier dans la bio-préservation (24). Les développements d'outils génétiques, la génétique moléculaire et le séquençage du génome ont mis en évidence de nouvelles fonctions. Parmi ces fonctions le catabolisme de l'acide sialique ou N-Acétyl-Neuraminique (NANA) étaient inattendues. Cette bactérie alimentaire est capable d'utiliser ce composé richement présent dans les mucines qui tapissent les tractus digestifs lui conférant un « fitness » et/ou avantage au sein du microbiote ainsi que sur la matrice carnée. J'ai contribué à la caractérisation des protéines impliquées dans ce métabolisme. Grâce à cet opéron Nan la souche de *L. sakei* 23K était capable de croître en milieu de laboratoire en utilisant le NANA comme seule source de carbone. La capacité d'utiliser l'acide N-acétyl-Neuraminique comme source de carbone pourrait fournir un avantage concurrentiel pour la croissance sur la viande dans laquelle ce sucre aminé est présent. La construction de différents mutants dans *L. sakei* 23K,  $\Delta nanT$  et  $\Delta nanK$  et le mutant double *L. sakei* 23K  $\Delta (nanA-nanE)$  a permis de montrer que tous étaient affectés pour la croissance sur NANA. En outre, deux gènes situés en aval de *nanK*, *Isa1644* et *Isa1645*, sont impliqués dans le catabolisme de l'acide sialique chez *L. sakei* 23K, car un mutant de *L. sakei* 23K  $\Delta isa1645$  n'était plus capable de se développer sur NANA comme seule source de carbone (25). Tous ces résultats démontrent que le groupe de gènes *nanTEARK-Isa1644-Isa1645* est effectivement impliqué dans l'utilisation de NANA comme source d'énergie par *L. sakei*. Cette capacité à utiliser le NANA richement présent dans le mucus digestif peut s'avérer être un avantage sélectif au sein du microbiote. Cette propriété est retrouvée également chez *S. aureus*, on y retrouve les gènes impliqués dans ce métabolisme (26) (Fig.5). Chez *S. aureus* en plus du transporteur de l'acide sialique NanT (COG-PutP) un autre transporteur SiaT est décrit (27)

**Figure 5 : Structures des opérons Nan**

Régulon Nan *L. sakei*

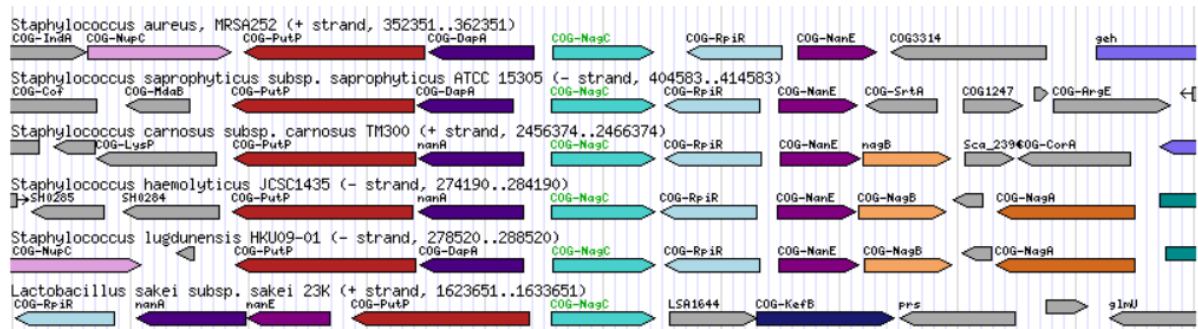


Régulon Nan *S. aureus*



Ces travaux ont été publiés : **Anba-Mondoloni J, Chaillou S, Zagorec M, Champomier-Vergès MC.** Catabolism of N-acetyl Neuraminic Acid, a fitness function of the food-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*, involves two newly characterized proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Mar;79(6):2012-8.

Comparaison des structures génétiques entre *Staphylococcus* et *L. sakei*



**III.4/ Devenir des bactéries lactiques dans le tractus digestif de rongeurs**

Après avoir étudié les bactéries lactiques en milieu de laboratoire, je me suis intéressée au comportement de celles-ci durant leur ingestion dans le tractus digestif de rongeurs. Ce travail a été réalisé dans l'unité UEPDS (d'Ecologie, physiologie du système digestif). J'ai établi que malgré l'hostilité du tube digestif les bactéries lactiques étaient capables d'exprimer certaines fonctions visualisées par fusion transcriptionnelles avec le gène rapporteur de la luciférase à l'aide du plasmide que j'ai construit plus haut. Après passage dans le bol alimentaire, les conditions de pH acide gastrique une forte proportion de bactéries meurt, mais celles qui atteignent les intestins sont capables de proliférer en utilisant les nutriments disponibles. Dans le cas de l'intolérance au lactose, la présence de bactéries capables d'exprimer la  $\beta$ -Galactosidase, permet d'atténuer cette intolérance (chez *L. lactis* et chez *S.*

*thermophilus*). Par des fusions transcriptionnelles on a montré que la synthèse protéique bactérienne était fonctionnelle au sein de tractus digestif de rongeurs (chez *Lactobacillus casei*). Cela a été décrit dans les publications suivantes pour *L. lactis*, *L. casei* et *S. thermophilus*.

Sophie Drouault, **Jamila Anba**, Gérard Corthier *Streptococcus thermophilus* Is Able To Produce a  $\beta$ -Galactosidase Active during Its Transit in the Digestive Tract of Germ-Free Mice. Appl Environ Microbiol. 2002 Feb; 68(2): 938–941.

R. Oozeer, N. Goupil-Feuillerat, C. A. Alpert, M. van de Guchte, **J. Anba**, J. Mengaud, G. Corthier. *Lactobacillus casei* Is Able To Survive and Initiate Protein Synthesis during Its Transit in the Digestive Tract of Human Flora-Associated Mice. Appl Environ Microbiol. 2002 Jul; 68(7): 3570–3574.

Roy K, **Anba J**, Corthier G, Rigottier-Gois L, Monnet V, Mistou MY. Metabolic adaptation of *Lactococcus lactis* in the digestive tract: the example of response to lactose. J Mol Microbiol Biotechnol. 2008;14(1-3):137-44.

Pour renforcer ces observations sur les activités métaboliques des LAB, j'ai réalisé le transcriptome de *L. lactis* IL2661 dans le tube digestif de rats axéniques. Cette souche est capable de métaboliser le lactose. Les rats axéniques étaientensemencés par gavage oral avec cette souche de *L. lactis*, et suivis pendant 6 semaines par numération bactérienne fécale. Pour avoir des niveaux de population bactérienne adéquates, du lactose était rajouté dans l'eau de boisson des rats ( $10^9$  cfu/g de ceacum). Après 6 semaines, les animaux étaient sacrifiés et la totalité du ceacum était récupérée pour en isoler les bactéries. L'extraction des ARN totaux était rapidement réalisée et congelée dans l'azote liquide. Les analyses ont permis de montrer l'activation des gènes de la glycolyse parallèle à une extinction des voies procurant de l'ATP. Ces travaux avaient été financés par Syndifrais, ce qui m'a permis d'acheter les puces à ADN. Ces travaux ont été publiés sous forme de rapport confidentiel. En parallèle une étude protéomique a été réalisée sur des souris axéniques avec la même souche IL2661 confirmant le résultat obtenu avec les rats (28). Les bactéries lactiques consommées par l'homme sont donc capables d'exprimer des fonctions telle que la lactase souvent absente chez les personnes du bassin méditerranéen.

#### **IV/ TRAVAUX ACTUELS : STAPHYLOCOCCUS AUREUS ANTIBIORESISTANCE : VERS DE NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES**

**Avant-propos :** L'ensemble de mon parcours à l'INRA m'avait sensibilisé à l'importance des bactéries d'alimentation pour le bien-être de l'hôte. Le revers concernait des bactéries pathogènes, dont de nombreuses établissent des réservoirs chez l'hôte (dans le tractus digestif, sur la peau, dans cavités...) sans séquelle, mais qui peuvent être la cause des infections, surtout chez des individus

affaiblis. J'avais voulu mettre mon expérience sur la génétique, la protéomique et la biochimie, à l'étude de l'adaptation des bactéries pathogènes à leur environnement, et depuis 2016, je travaille sur le sujet exposé ci-dessous.

#### **IV.1 GENERALITES SUR *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une bactérie non-sporulante à Gram positif à la fois commensale et pathogène. Environ 20 à 30 % de la population est porteuse de cette bactérie symbiotique sans poser de problème de santé. Elle est devenue la cause la plus répandue des infections d'origine alimentaire dans le monde (29). En étant à l'origine d'intoxication alimentaire, cette bactérie peut conduire à des infections suppuratives, résistantes aux médicaments et causer d'autres problèmes médicaux. Outre ces infections alimentaires, *S. aureus* est responsable d'infection graves pluri-localisées : dermatites, endocardites, ostéomyélites, néphrologiques et pulmonaires allant parfois jusqu'au décès des patients par faute de thérapie efficace. La résistance aux antibiotiques est acquise de manière relativement rapide (ex : en moins d'un an pour les méthicillines). Le problème majeur est que l'antibiorésistance a atteint une majorité d'espèces pathogènes dont les staphylocoques. Ainsi, *S. aureus* est devenu un problème de santé publique {Oteo, 2015 #723}. Les bactéries deviennent antibiorésistantes leur permettant de survivre, selon les diverses niches écologiques, sur les concurrents sensibles {Hofer, 2019 #756}. Les bactéries deviennent antibiorésistantes leur permettant de survivre, selon les diverses niches écologiques, sur les concurrents sensibles (30). Les nouvelles initiatives thérapeutiques font appel à des combinaisons synergiques d'antibiotiques pour éviter l'apparition de mutations rendant les bactéries résistantes.

La poly-antibiothérapie n'est pas une approche nouvelle. Cette approche déjà éprouvée pour le bacille de Koch contre lequel une trithérapie est appliquée pour éradiquer la tuberculose (31). Les dernières générations d'antibiotiques développés agissent sur la synthèse des lipides (32). Les lipides sont essentiels à la croissance des cellules et à la production des membranes cellulaires. Le blocage de la voie de synthèse des acides gras semble être judicieuse d'autant que certaines enzymes sont spécifiques de *S. aureus*. Au-delà de la résistance aux antibiotiques *S. aureus* possède une multitude de moyens pour échapper et déjouer le système immunitaire de l'hôte, pour endommager les tissus. Ainsi en réponse aux défenses immunitaires des hôtes *S. aureus* produit plus de 18 toxines {Bennett, 2020 #5956} dont les entérotoxines dans les intoxications alimentaires, plusieurs toxines impliquées dans la formation de pores dans les membranes de nombreux types cellulaires, l'alpha-toxine, l'hémolysine, lipase, hyaluronidase et la leucocidine qui lyse les neutrophiles.

Notre équipe est intéressée par les acides gras qui constituent la barrière formée par la membrane et l'enveloppe bactérienne. En choisissant de bloquer la synthèse des acides gras on pouvait espérer empêcher la prolifération de ce pathogène.

**IV.2 Histoire d'antibiotique :** Depuis l'identification du premier antibiotique en 1929 (la pénicilline) la recherche a permis pendant une cinquantaine d'années l'isolement ou la synthèse chimique de molécules antibactériennes. Les antibiotiques peuvent avoir une action bactéricide et/ou bactériostatique (détruit ou bloque la croissance bactérienne). Les connaissances accumulées en bactériologie ont permis d'identifier de nouvelles cibles potentielles d'antibiotiques. Parmi ces cibles, on citera les enveloppes bactériennes, la réplication de l'ADN/ARN, la synthèse protéique et plus récemment la synthèse lipidique affectant les composants membranaires.

Cibles utilisées actuellement :

- La synthèse et la polymérisation des acides nucléiques (ADN polymérase ou ARN polymérase ex : Rifampicine)
- La synthèse des protéines (tétracycline, chloramphénicol)
- La synthèse des acides gras (Triclosan, AFN 1252)
- La synthèse de la paroi bactérienne (les ampicilines et leur famille)
- Destructeur membranaire : Brilacidin (PMX-30063). En phase 2 d'essai clinique.

Pour toutes les drogues destinées à bloquer ces divers procédés vitaux très rapidement des résistances ont émergé rendant inefficace ces traitements ! Le déclin dans la découverte de nouveaux antibiotiques et l'évolution des bactéries multirésistantes par transfert horizontal des mécanismes de résistance, a créé une crise de santé publique qui nécessite l'identification de nouvelles molécules inhibitrices robustes pour lesquelles on n'observe de résistance. L'augmentation du nombre de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (MDR) souligne le besoin urgent de nouveaux systèmes antimicrobiens efficaces.

Bien qu'encore efficaces, le détournement de l'utilisation des antibiotiques a engendré l'émergence de divers mécanismes de résistance. De manière dramatique, les pathogènes multirésistants ont accumulé plusieurs systèmes de défense rendant les antibiotiques inefficaces. Parmi eux, des mécanismes d'efflux des drogues, l'acquisition de gènes de résistance par HGT (transfert horizontal des gènes), duplication de la cible, dégradation enzymatique de l'antibiotique, ou par mutations des gènes ciblés, sont les plus connus. Les échecs thérapeutiques augmentant de manière alarmante, il y a urgence à développer de nouvelles stratégies de lutte antibactériennes. D'autant que la recherche



sur de nouveaux antibiotiques a décliné dès les années 1970, l'arsenal thérapeutique de l'époque permettait alors de traiter efficacement la plupart des infections bactériennes (33).

### IV.3 La voie FASII

Une cible particulièrement intéressante est la voie de synthèse des acides gras, appelé FASII pour « fatty acid synthesis Type II ». L'initiation démarre avec une molécule d'acétyl-CoA issue de la glycolyse, elle est acétylée par les protéines AccBCDA produisant le Malonyl-CoA sur lequel l'ACP va se lier en libérant le CoASH donnant le Malonyl-ACP *via* FabD. Il rentre dans le cycle FASII jusqu'à la production de l'acyl-ACP avec l'addition de deux carbones à chaque cycle. La synthèse des acides gras est énergivore ainsi pour la synthèse du palmitate (acide gras en C16), 7 molécules d'ATP et 14 molécules de NADPH sont consommées. Pour synthétiser ses acides gras la bactérie utilise 4 enzymes nécessaires (FabF, FabG, FabI and FabZ), la synthèse des phospholipides utilise l'acyl-ACP issu de FASII et implique les enzymes PlsC ou PlsXY (Fig.6).

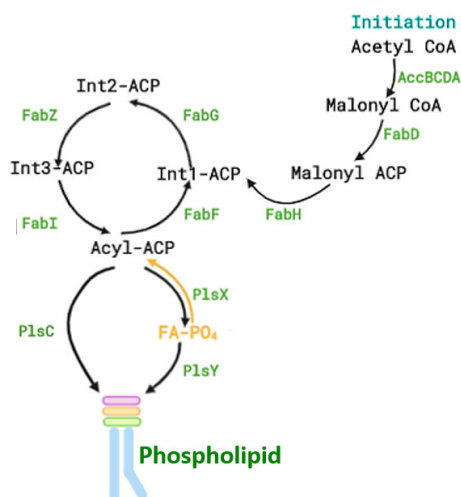


Figure 6 : Biosynthèse des phospholipides

#### IV.3.a Les antibiotiques bloquant FASII

L'idée de bloquer la voie de synthèse des AG est judicieuse pour stopper la prolifération de *S. aureus* (Fig. 7). Le choix d'inhiber FabI était brillant dans le sens où cet enzyme n'existe pas chez l'hôte ni dans la plupart des bactéries du microbiote intestinal (34). Ainsi plus d'une dizaine de molécules dirigées contre FabI (enoyl-ACP réductase), enzyme intégrale de la voie FASII et absente chez l'hôte ont été développées (35) (34) (36). La survie des bactéries challengées avec les antibiotiques ciblant la synthèse des lipides est notre modèle de travail. On observe chez différentes bactéries à Gram-Positif, que les acides gras présents dans le milieu de culture sont facilement assimilés par les bactéries, et se trouvent incorporés dans les phospholipides membranaires (37). De ce fait, cette classe d'antibiotiques

bloquant la voie FASII s'avère inefficace, car la bactérie substitue le manque de biosynthèse avec les acides gras disponibles dans le milieu et finit par se multiplier (38). Les composants de l'hôte animal sont particulièrement riches en acides gras d'où l'inefficacité des inhibiteurs de la voie FASII (39). Ces inhibiteurs ne peuvent pas assurer l'élimination de la bactérie qui finit par contourner la voie FASII en récupérant les acides gras de son environnement (40,41). Parmi ces molécules développées pour éliminer *S. aureus* et d'autres bactéries, l'AFN1252 ciblant spécifiquement le FabI de *S. aureus* (34), notre antibiotique de choix, ne montrant pas de toxicité chez l'hôte et ayant un spectre d'hôte restreint est au stade d'essais cliniques. Néanmoins même si cet antibiotique atteint sa cible FabI, il n'empêche pas la prolifération des bactéries cultivées en présence d'acides gras exogènes (modèle ci-dessous).

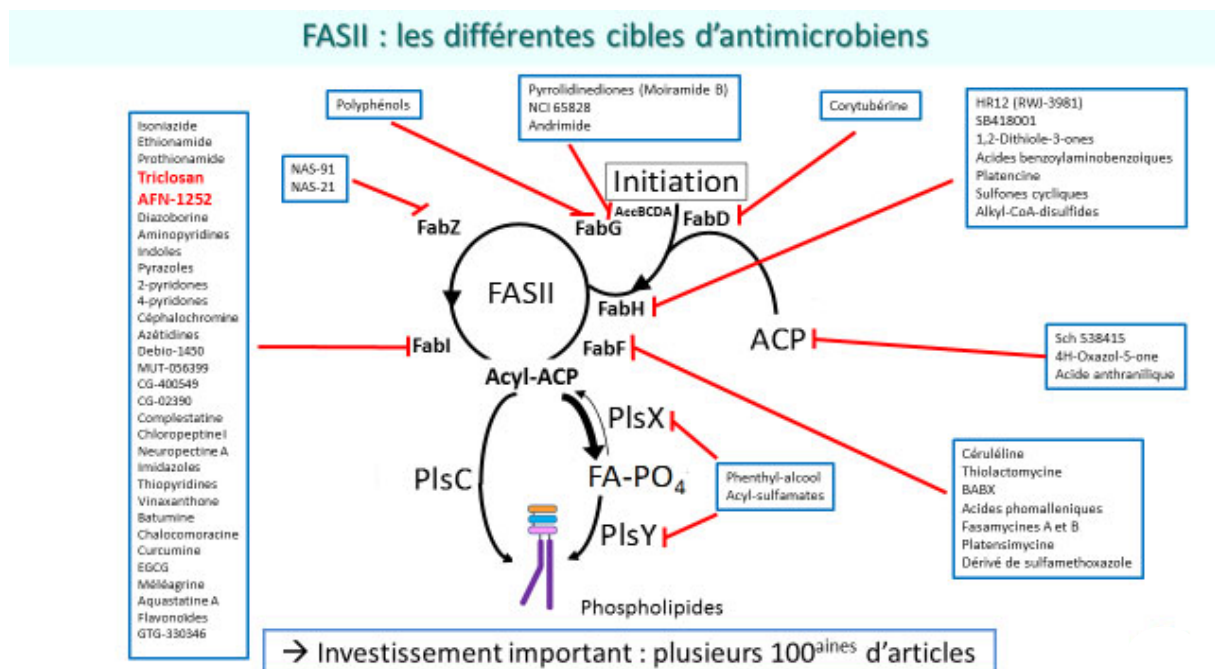
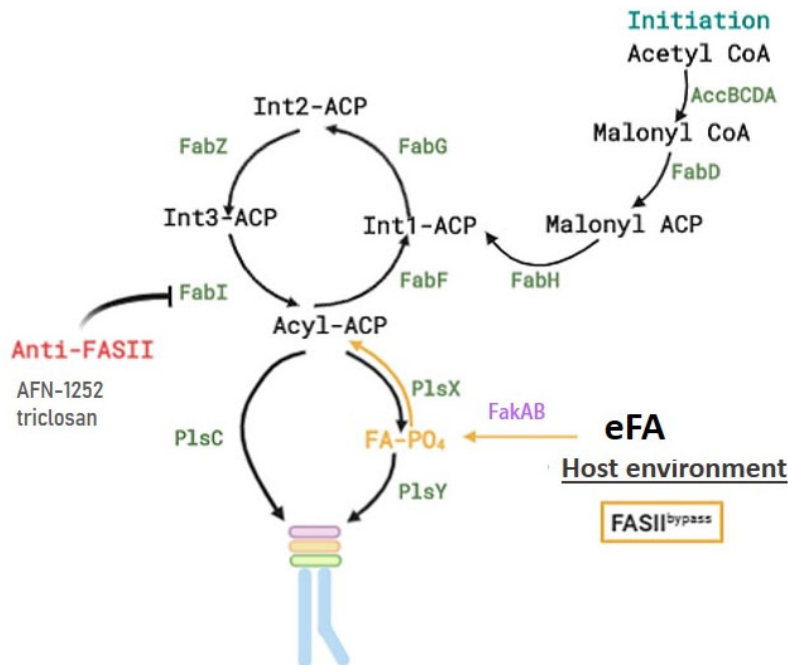


Figure 7 : Les différentes cibles d'antibiotiques développés contre la synthèse des lipides (d'après ...)

### IV.3.B Contournement de l'anti-FASII

Après initiation, FASII implique 4 enzymes FabG, FabF, FabZ and FabI. Cette réaction en chaîne permet l'addition de deux carbones par cycle. On a observé que *S. aureus* peut utiliser les acides gras de son



environnement. De ce fait, l'antibiotique (AFN-1252 ou triclosan) est contourné et n'est plus effectif. Les profils d'acides gras incorporés dans les phospholipides membranaires sont complètement constitués d'acides gras exogènes, preuve que FabI est bien inhibé et que la voie de biosynthèse FASII est bloquée.

Figure 8 : Protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des acides gras (FASII) et mécanisme

de contournement des anti-FabI en présence de sérum et d'acides gras exogènes :

Comme indiqué ci-dessus, nos travaux ont permis de mettre en lumière la faille du système (40) (41). Bien que l'antibiotique soit actif et inhibe la voie FASII, ce processus d'adaptation permet à la bactérie d'émerger de manière exponentielle après une période de latence de 6 à 8h. Les bactéries adaptées, en présence de l'inhibiteur de FabI, utilisent exclusivement des acides gras exogènes pour la synthèse de leurs membranes (Fig. 8). Le séquençage du génome des bactéries adaptées ne présente aucune mutation en lien avec FASII. La modification de la structure membranaire par remplacement des acides gras néo-synthétisés doit avoir des conséquences sur toutes les structures de l'enveloppe en lien avec les lipides (Lipoprotéines, adhésines, fibrinogène-like et protéines de surface). La période de latence qui précède l'adaptation et la croissance de *S. aureus* en présence des inhibiteurs de FASII est étudiée par l'équipe. L'étude moléculaire de cette phase de latence devrait permettre de trouver un moyen de bloquer les bactéries à ce stade évitant ainsi le redémarrage de la croissance tardive. Nous avons fait l'hypothèse que la bactérie en latence pourrait être en situation de carence, car de nombreux processus dépendent de la membrane. En effet, nos résultats récents indiquent que la bactérie induit, transitoirement une réponse stringente, qui coïncide avec la période de latence (PATHANIA, BIORxiv). L'inhibition de la synthèse des acides gras par l'anti-FASII provoque une carence qui va induire

l'alarmone bactérienne pp(p)Gpp. Cette molécule a été décrite, essentiellement chez *E. coli*, il y a plus de cinquante ans pour les carences en acides aminés (42). Cet alarmone considérée comme un messager secondaire clé est impliquée dans la régulation des processus biochimiques et physiologiques connectant la perception de l'environnement et la croissance bactérienne (43). Cette alarmone va bloquer la réplication du chromosome bloquant ainsi la division cellulaire et la transcription (Fig). Depuis le pp(p)Gpp a été isolé dans la quasi-totalité des bactéries jusqu'aux plantes en réponse aux carences environnementales {Manav, 2018 #5576;Manav, 2018 #5576} . Chez *S. aureus*, la réponse stringente passe par la production du pp(p)Gpp induisant une reprogrammation globale des processus physiologiques. Le pp(p)Gpp est produit par 3 enzymes « RelA-SpoT Homologue » ou RSH Rel (qui sense la carence en acides aminés), RelP et RelQ (Pathania et al., manuscrit soumis). Les travaux réalisés dans notre équipe montrent une induction du pp(p)Gpp en parallèle avec une chute de production du malonyl-CoA pendant la phase de latence en présence d'anti-FASII. Le malonyl-CoA et/ou le malonyl-ACP est impliqué dans la répression du régulon FapR qui dirige l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. En présence du malonyl-CoA ou malonyl-ACP, FapR ne réprime plus le régulon FapR (44). Dès la reprise de la croissance le taux de pp(p)Gpp chute et on observe une augmentation du malonyl-CoA ou malonyl-ACP (Pathania et al., manuscrit soumis). Est-ce que le pp(p)Gpp joue un rôle dans la croissance de *S. aureus* en présence d'anti-FASII ? Cette question reste posée. Nous avons procédé à l'étude globale de l'expression des protéines durant la croissance en présence d'anti-FASII.

#### **V.4 Etude protéomique de la réponse de *S. aureus* aux anti-FASII**

Par l'approche protéomique, il apparait que la bactérie répond à ces conditions de stress par la perception d'autres stress dont le stress osmotique (induction des transporteurs de Glycine-Bétaïne BetA, BetB) et le stress oxydatif (Ohr, katA et SodA). Dans nos conditions en milieu riche, nous ne provoquons pas de stress autre que le blocage de la synthèse des acides gras mais la bactérie réagit comme si elle se retrouvait dans un milieu hyperosmotique, hyper-oxydant ou à haute température. Notre objectif étant de comprendre l'anti-biorésistance, nous mimons les conditions dans lesquelles la bactérie serait *in vivo* dans l'hôte (37°C, sérum, acides gras, oxygène limitant). La réponse de la bactérie est de manière inattendue identique à des conditions de multiples stress.

Pour avancer, nous nous orientons vers la recherche de fonctions indispensables à la sortie de dormance que nous identifions par l'analyse protéomique comparative entre présence et absence d'anti-FASII. En identifiant de telles fonctions, il est possible de trouver des molécules inhibitrices pré-existantes, qui lorsqu'elles seront utilisées en synergie avec l'anti-FASII pourraient empêcher la reprise de croissance observée tardivement. Nous disposons d'une collection de mutants par transposon

(NARSA). Si ces fonctions sont mutées dans cette collection, nous allons les tester en présence de l'anti-FASII pour établir leur niveau de sensibilité. En cas d'absence de mutants disponibles, j'ai les compétences requises pour les construire.

## V/ PROJET DE RECHERCHE

### Devenir du LTA

Comme je l'ai dit précédemment, en présence des anti-FASII d'acides gras exogènes et de sérum nous observons un épaissement de l'enveloppe bactérienne durant la phase de latence. La première idée a été de quantifier les constituants de l'enveloppe. Avant mon arrivée au laboratoire le peptidoglycane a été analysé. Aucune différence n'a été relevée entre bactéries bloquées ou non pour leur croissance. J'ai donc étudié une autre molécule majeure de l'enveloppe qui est l'acide lipotéïchoïque (LTA). Le LTA est lié à la membrane de manière covalente *via* le glycolipide (diacyl glycérol) {Neuhaus, 2003 #5551}. La synthèse de cette macromolécule nécessite 3 protéines, UgtP, LtaA et LtaS {Percy, 2014 #5556}. Pour cela, j'ai réalisé des analyses en immuno-blot à l'aide de l'anticorps anti-LTA durant toute la période de culture en présence et en absence d'anti-FASII. A ma grande surprise le LTA était détecté jusqu'à 9h de culture c'est-à-dire durant la période de latence. Dès que les bactéries reprennent une activité exponentielle de croissance, il y a disparition du LTA. Malgré plusieurs passages en milieu restrictif, il n'y a pas de synthèse *de novo* du LTA en présence d'anti-FASII. Cette molécule sensée jouer un rôle prépondérant durant la division cellulaire et la morphologie, il était paradoxal de ne plus la détecter pendant cette reprise de croissance d'autant que la morphologie en microscopie électronique retournait à la normale. Plusieurs hypothèses expliquant la disparition de cette molécule sont envisagées. Soit cette molécule se trouve libérée dans le milieu extracellulaire (nos premiers résultats infirment cette voie). Soit la molécule n'est plus reconnue par l'anticorps monoclonal du fait d'un changement conformationnel. Les analyses protéomiques vont dans le sens d'une absence de synthèse *de novo* puisque UgtP, enzyme clé de la synthèse du LTA, n'est plus détecté en présence de l'anti-FASII ni au cours du redémarrage de croissance. Encore une fois nous ne détectons pas dans nos conditions de mutation impactant la synthèse du LTA. Le rôle du LTA, impliqué dans le maintien de la morphologie bactérienne, et dans la division cellulaire et impliquée dans l'interaction avec les cellules de l'hôte en induisant les cytokines {van Langevelde, 1999 #5559} (AAC,1998,Vol42,p3073-3078 P. van LANGEVELDE & al.) ne me permet pas de conclure sur ces observations. J'ai analysé la production de LTA au cours de la croissance en présence de l'anti-FASII. Ce qui est surprenant c'est que nous observons l'absence de production du LTA qui survient lors de la reprise de croissance. Le rôle joué par le LTA dans la division cellulaire semble être remis en question par ces observations. Il est possible que la molécule LTA soit sécrétée dans le milieu extérieur comme

cela a été rapporté (45). Pendant la phase de latence la microscopie électronique a permis de visualiser un épaissement important de l'enveloppe avec un blocage de la division cellulaire. Il a été montré que l'absence de LTA pouvait être compensée par la production d'une autre molécule de l'enveloppe bactérienne le Wall Teichoique Acid (ou WTA). Nous envisageons de purifier et de comparer les quantités de WTA dans nos conditions de culture. Par ailleurs plusieurs drogues bloquant la synthèse du WTA sont disponibles commercialement. Nous allons les tester en combinaison avec notre anti-FASII. Chez *Bacillus subtilis*, l'inactivation simultanée du LTA et du WTA est létale (46) (Schirner et al., 2009). En bloquant ces deux molécules de manière synergique (LTA et WTA) on peut éviter le contournement de l'anti-FASII et ainsi obtenir l'éradication des bactéries (cet aspect est inclus dans le sujet de thèse proposé cette année).

Actuellement, nous recherchons d'autres drogues permettant d'avoir une action synergique avec l'anti-FabI au cas où on observe un nouveau contournement avec l'anti-WTA. Pour identifier de telles cibles, nous avons réalisé le protéome d'une souche de *S. aureus* MRSA isolée chez l'homme en présence et en absence d'anti-FASII. Cette étude a été réalisée sur des bactéries cultivées dans différents milieux avec et sans anti-FASII, afin de comparer les profils d'expression protéique. La présence de l'antibiotique provoque une phase de latence de 6 à 8 heures, au-delà de cette période les bactéries reprennent une croissance exponentielle. Les résultats montrent que la bactérie modifie son métabolisme en présence de l'anti-FabI en activant plusieurs protéines induites aux stress environnementaux. L'analyse des profils protéiques va nous permettre d'identifier de nouvelles cibles à bloquer lors de la reprise d'activité. Par analyse du protéome, on note que la protéine UgtP est totalement inhibée par l'anti-FASII. On n'a pas le profil protéomique pour LtaA, en sachant que les 2 gènes codant pour ces protéines sont organisés en opéron. On sait qu'en absence de l'une ou l'autre protéine le LTA est produit avec un taux de polymérisation plus important que dans la souche sauvage. L'absence d'immuno-détection de LTA en présence d'anti-FASII suggère qu'aucune des deux protéines n'est synthétisée. Pour cela, j'envisage d'analyser le protéome de la membrane et de l'enveloppe pour pouvoir conclure.

### **Analyse du protéome cytosoluble**

Afin de savoir ce qui se passe pendant cette étape nous avons réalisé l'analyse du protéome cytosoluble. En collaboration avec Céline Henry de la plateforme PAPSO nous avons pu identifier les variations d'expression des protéines solubles selon que les bactéries étaient cultivées en présence ou en absence d'antibiotique (=anti-FASII), avec ou sans sérum et, avec et sans acides gras exogènes en nous suivons 6 conditions. D'après nos analyses statistiques il apparaît que la bactérie réagit à la présence d'anti-FASII en induisant plusieurs protéines reliées au stress oxydant (induction

d'antioxydant tel que la staphyloxanthine), stress pH (uréase induite) et stress oxydatif (induction des superoxyde-dismutases SodA, SodM et de la catalase KatA pendant l'adaptation en présence d'anti-FASII). Mon projet de recherche sera focalisé sur les analyses de la membrane qui ressent et répond à ces stress. Sur les 2650 protéines potentielles de la souche JE2, nous avons détecté 630 protéines solubles dont le profil d'expression variait selon les conditions de culture testées. Parmi ces 630 protéines 150 protéines ont été classées dans 3 types de profil d'expression distincts :

**Classe 1** Protéines plus exprimées pendant la phase d'adaptation par rapport à sans antibiotique.

On citera pour exemple les protéines destinées à la synthèse de l'enveloppe bactérienne dont les autolysines, celles impliquées dans la division cellulaire ou à la réponse aux stress.

**Classe 2** Protéines réprimées par l'antibiotique quelle que soit la phase de croissance.

Exemple : certaines protéines de surface avec un motif LPxTG dont les adhésines, les protéines impliquées dans la synthèse de l'acide lipoteichoïque, ainsi que les ABC et acides aminés transporteurs.

**Classe 3** Protéines réprimées dans toutes les conditions sauf lors de la sortie de latence (10h). Ces protéines sont particulièrement intéressantes.

Exemple : SodA, SodM et KatA.

L'analyse protéomique du matériel soluble montre l'induction de protéines associées à l'enveloppe comme la protéine membranaire de stress osmotique (BetA) ou extra-cellulaires telle que celles du stress oxydatif (SodA, SodM) fortement exprimées en présence de l'anti-FASII. Ces résultats indiquent que les extraits solubles contiennent des éléments de l'enveloppe fragilisée par les conditions de culture et/ou de préparation des échantillons. La bactérie ressent l'action de l'anti-FASII comme un stress d'hyper osmolarité. Les observations en microscopie électronique confirment le stress osmotique pendant la phase de latence. On note un épaissement de l'enveloppe cellulaire et/ou un rétrécissement du compartiment cytoplasmique. Pourquoi l'enveloppe présente cette épaissement? On sait que les bactéries ont la capacité de modifier leurs membranes par variation de la fluidité afin de survivre et se multiplier dans des environnements hostiles. Cette question reste d'actualité bien que d'autres publications relatent cette perturbation de la membrane et l'enveloppe en présence d'antibiotique (47){Bessa, 2018 #47}{Bessa, 2018 #46} {Sakoulas, 2008 #56}

### **Quel est l'impact des acides gras exogènes sur la rigidité membranaire ?**

Plusieurs publications rapportent une augmentation de la fluidité membranaire selon la composition des acides gras constituant ses phospholipides. Dans notre étude, le blocage de FASII par l'anti-FabI résulte dans l'absence de synthèse des acides gras dans la cellule. En fournissant des acides gras (2

saturés et 1 insaturé) pendant la croissance avec l'anti-FabI, la bactérie survit par l'incorporation de ces AG. Sachant que *S. aureus* est incapable de synthétiser des AG insaturés, le fait d'en incorporer dans ces membranes suggèrent une augmentation de la fluidité membranaire ce qui peut expliquer le gonflement de son enveloppe dans nos conditions d'étude {Mostofian, 2019 #52}. L'analyse de la fluidité membranaire sera réalisée prochainement par spectroscopie à fluorescence et microscopie à l'aide du Laurdan. Pour cela, on devra mettre au point le système avec l'aide de deux collègues de l'équipe.

## VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les pathogènes de l'Homme ont toujours été un sujet passionnant pour moi. En fin de carrière, je m'y suis complètement plongée. La recherche de nouvelles stratégies de lutte contre l'antibiorésistance est un sujet vaste et très compétitif. Les financements de tels projets de recherche devraient être plus clairement soutenus. Il est vrai qu'à l'INRAe les recherches sont plus ciblées sur l'animal et les plantes. Depuis peu, on assiste à un virement vers la santé Humaine, qui est quoiqu'on en dise l'affaire d'autres instituts orientés médecine. Les recherches sur le pathogène *Staphylococcus aureus* datent depuis le début du siècle dernier mais malgré les nombreuses études, la recherche de drogue inhibant sa prolifération est un échec car cette bactérie est capable de développer des systèmes de résistance en s'adaptant à son environnement. L'approche que je propose n'est pas nouvelle quoique le blocage de la synthèse des lipides est novateur.

Sans être une fin en soi, cette habilitation à diriger des recherches validera mes capacités à encadrer et animer un projet de recherche et surtout me permettra d'encadrer officiellement l'étudiant en thèse.

Certaines protéines induites pendant ce stress apparaissent induites pendant la période de latence. Si on arrive à trouver des inhibiteurs spécifiques de ces protéines exprimées lors de l'adaptation on peut envisager une poly-antibiothérapie avec l'anti-FASII. En bloquant cette reprise d'activité tardive, il est possible d'éviter le contournement de l'anti-FASII afin d'empêcher la prolifération bactérienne de *S. aureus*. Notre recherche-future se fera en collaboration avec L. Tuchscher à l'université de Jena en



Allemagne. Cette équipe est spécialisée dans les modèles intracellulaires de *S. aureus*. Nous testerons l'impact des acides gras de l'environnement sur les structures des membranes des cellules eucaryotes et sur la survie intracellulaire de la bactérie. J'aimerais tester sur des souris conventionnelles, en collaboration avec A. Fouet à l'hôpital Cochin dans l'unité INSERM, l'impact de bactéries adaptées comparées à des non-adaptées. Cela permettra d'étudier les incidences sur l'hôte de la restriction de synthèse d'acides gras bactériens couplée aux nouvelles drogues. La réponse de l'hôte sera prise en compte pour de possibles essais thérapeutiques futurs.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**, 835-851
2. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**, 852-862
3. Baker, K., Mackman, N., Jackson, M., and Holland, I. B. (1987) Role of SecA and SecY in protein export as revealed by studies of TonA assembly into the outer membrane of Escherichia coli. *J Mol Biol* **198**, 693-703
4. Rollo, E. E., and Oliver, D. B. (1988) Regulation of the Escherichia coli secA gene by protein secretion defects: analysis of secA, secB, secD, and secY mutants. *J Bacteriol* **170**, 3281-3282
5. Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6545-6549
6. Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108
7. Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**, 260-274
8. Berks, B. C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**, 174-181
9. Pages, J. M., Anba, J., and Lazdunski, C. (1985) Protein export in Escherichia coli. *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)* **136A**, 105-110
10. Vaziri, F., and Brosch, R. (2019) ESX/Type VII Secretion Systems-An Important Way Out for Mycobacterial Proteins. *Microbiol Spectr* **7**
11. Pages, J. M., Anba, J., Bernadac, A., Shinagawa, H., Nakata, A., and Lazdunski, C. (1984) Normal precursors of periplasmic proteins accumulated in the cytoplasm are not exported post-translationally in Escherichia coli. *Eur J Biochem* **143**, 499-505
12. Anba, J., Baty, D., Llobes, R., Pages, J. M., Joseph-Liauzun, E., Shire, D., Roskam, W., and Lazdunski, C. (1987) Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in Escherichia coli. *Gene* **53**, 219-226
13. Anba, J., Lazdunski, C., and Pages, J. M. (1986) Lack of effect of leader peptidase overproduction on the processing in vivo of exported proteins in Escherichia coli. *J Gen Microbiol* **132**, 689-696
14. David, M. Z., and Daum, R. S. (2010) Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* **23**, 616-687
15. Peng, Y. C., Lu, C., Li, G., Eichenbaum, Z., and Lu, C. D. (2017) Induction of the pho regulon and polyphosphate synthesis against spermine stress in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **104**, 1037-1051
16. Jorge, A. M., Schneider, J., Unsleber, S., Xia, G., Mayer, C., and Peschel, A. (2018) Staphylococcus aureus counters phosphate limitation by scavenging wall teichoic acids from other staphylococci via the teichoicase GlpQ. *J Biol Chem* **293**, 14916-14924
17. Kelliher, J. L., Radin, J. N., and Kehl-Fie, T. E. (2018) PhoPR Contributes to Staphylococcus aureus Growth during Phosphate Starvation and Pathogenesis in an Environment-Specific Manner. *Infect Immun* **86**
18. Forde, A., and Fitzgerald, G. F. (1999) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 89-113

19. Anba, J., Bidnenko, E., Hillier, A., Ehrlich, D., and Chopin, M. C. (1995) Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. *J Bacteriol* **177**, 3818-3823
20. Bidnenko, E., Chopin, M. C., Ehrlich, S. D., and Anba, J. (2002) Lactococcus lactis *AbiD1* abortive infection efficiency is drastically increased by a phage protein. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 283-287
21. Drouault, S., Anba, J., and Corthier, G. (2002) Streptococcus thermophilus is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl Environ Microbiol* **68**, 938-941
22. Arioli, S., Della Scala, G., Remagni, M. C., Stuknyte, M., Colombo, S., Guglielmetti, S., De Noni, I., Ragg, E., and Mora, D. (2017) Streptococcus thermophilus urease activity boosts Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus homolactic fermentation. *Int J Food Microbiol* **247**, 55-64
23. Mora, D., Maguin, E., Masiero, M., Parini, C., Ricci, G., Manachini, P. L., and Daffonchio, D. (2004) Characterization of urease genes cluster of Streptococcus thermophilus. *J Appl Microbiol* **96**, 209-219
24. Zagorec, M., and Champomier-Verges, M. C. (2017) Lactobacillus sakei: A Starter for Sausage Fermentation, a Protective Culture for Meat Products. *Microorganisms* **5**
25. Anba-Mondoloni, J., Chaillou, S., Zagorec, M., and Champomier-Verges, M. C. (2013) Catabolism of N-acetylneuraminic acid, a fitness function of the food-borne lactic acid bacterium Lactobacillus sakei, involves two newly characterized proteins. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2012-2018
26. Olson, M. E., King, J. M., Yahr, T. L., and Horswill, A. R. (2013) Sialic acid catabolism in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* **195**, 1779-1788
27. North, R. A., Wahlgren, W. Y., Remus, D. M., Scalise, M., Kessans, S. A., Dunevall, E., Claesson, E., Soares da Costa, T. P., Perugini, M. A., Ramaswamy, S., Allison, J. R., Indiveri, C., Friemann, R., and Dobson, R. C. J. (2018) The Sodium Sialic Acid Symporter From Staphylococcus aureus Has Altered Substrate Specificity. *Front Chem* **6**, 233
28. Roy, K., Anba, J., Corthier, G., Rigottier-Gois, L., Monnet, V., and Mistou, M. Y. (2008) Metabolic adaptation of Lactococcus lactis in the digestive tract: the example of response to lactose. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**, 137-144
29. Sergelidis, D., and Angelidis, A. S. (2017) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a controversial food-borne pathogen. *Lett Appl Microbiol* **64**, 409-418
30. Oteo, J., and Belen Aracil, M. (2015) [Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance Staphylococcus aureus, extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **33 Suppl 2**, 27-33
31. Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., and Martini, M. (2017) The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg* **58**, E9-E12
32. Wang, Y., and Ma, S. (2013) Recent advances in inhibitors of bacterial fatty acid synthesis type II (FASII) system enzymes as potential antibacterial agents. *ChemMedChem* **8**, 1589-1608
33. Hofer, U. (2019) The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* **17**, 3
34. Karlowsky, J. A., Kaplan, N., Hafkin, B., Hoban, D. J., and Zhanel, G. G. (2009) AFN-1252, a FabI inhibitor, demonstrates a Staphylococcus-specific spectrum of activity. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3544-3548
35. Zhang, Y. M., and Rock, C. O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 222-233
36. Tsuji, B. T., Harigaya, Y., Lesse, A. J., Forrest, A., and Ngo, D. (2013) Activity of AFN-1252, a novel FabI inhibitor, against Staphylococcus aureus in an in vitro pharmacodynamic model simulating human pharmacokinetics. *J Chemother* **25**, 32-35
37. Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., and Poyart, C. (2009) Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* **458**, 83-86

38. Kenanian, G., Morvan, C., Weckel, A., Pathania, A., Anba-Mondoloni, J., Halpern, D., Gaillard, M., Solgadi, A., Dupont, L., Henry, C., Poyart, C., Fouet, A., Lamberet, G., Gloux, K., and Gruss, A. (2019) Permissive Fatty Acid Incorporation Promotes Staphylococcal Adaptation to FASII Antibiotics in Host Environments. *Cell Rep* **29**, 3974-3982 e3974
39. Delekta, P. C., Shook, J. C., Lydic, T. A., Mulks, M. H., and Hammer, N. D. (2018) Staphylococcus aureus Utilizes Host-Derived Lipoprotein Particles as Sources of Fatty Acids. *J Bacteriol* **200**
40. Morvan, C., Halpern, D., Kenanian, G., Pathania, A., Anba-Mondoloni, J., Lamberet, G., Gruss, A., and Gloux, K. (2017) The Staphylococcus aureus FASII bypass escape route from FASII inhibitors. *Biochimie* **141**, 40-46
41. Morvan, C., Halpern, D., Kenanian, G., Hays, C., Anba-Mondoloni, J., Brinster, S., Kennedy, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Lamberet, G., Gloux, K., and Gruss, A. (2016) Environmental fatty acids enable emergence of infectious Staphylococcus aureus resistant to FASII-targeted antimicrobials. *Nat Commun* **7**, 12944
42. Lazzarini, R. A., and Dahlberg, A. E. (1971) The control of ribonucleic acid synthesis during amino acid deprivation in Escherichia coli. *J Biol Chem* **246**, 420-429
43. Nazir, A., and Harinarayanan, R. (2016) (p)ppGpp and the bacterial cell cycle. *J Biosci* **41**, 277-282
44. Schujman, G. E., Paoletti, L., Grossman, A. D., and de Mendoza, D. (2003) FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev Cell* **4**, 663-672
45. van Langevelde, P., van Dissel, J. T., Ravensbergen, E., Appelmelk, B. J., Schrijver, I. A., and Groeneveld, P. H. (1998) Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from Staphylococcus aureus: quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3073-3078
46. Schirner, K., Marles-Wright, J., Lewis, R. J., and Errington, J. (2009) Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in Bacillus subtilis. *EMBO J* **28**, 830-842
47. Tran, T. T., Munita, J. M., and Arias, C. A. (2015) Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann N Y Acad Sci* **1354**, 32-53
48. Bobrovskyy, M., Willing, S. E., Schneewind, O., and Missiakas, D. (2018) EssH Peptidoglycan Hydrolase Enables Staphylococcus aureus Type VII Secretion across the Bacterial Cell Wall Envelope. *J Bacteriol* **200**