

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE ARMAND-FRAPPIER SANTÉ BIOTECHNOLOGIE

**L'ENVELOPPE BACTÉRIENNE COMME FACTEUR D'ADAPTATION LA
RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET LA MISE EN PLACE DU
TROPISME BACTÉRIEN.**

Avec comme support d'étude Escherichia coli et le genre Neisseria

Par

Mathilde BROQUIERE

Mémoire pour l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En Sciences expérimentales de la Santé bidiplomation avec U. Clermont-Ferrand

Programme offert conjointement par l'INRS et l'Université Clermont Auvergne

Septembre 2021-août 2022

Ce mémoire intitulé

**L'ENVELOPPE BACTÉRIENNE COMME FACTEUR D'ADAPTATION
DANS LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET LA MISE EN PLACE
DU TROPISME BACTÉRIEN.**

Avec comme support d'étude *Escherichia coli* et le genre *Neisseria*

et présentée par

Mathilde BROQUIERE

a été évaluée par un jury composé de

M. Frédéric VEYRIER, directeur de recherche, INRS – Institut Armand Frappier (Laval, Québec)

Mme Mahchid BAMDAD, codirectrice Université Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand,
France)

M. Phillipe CONSTANT, examinateur interne INRS – Institut Armand Frappier (Laval, Québec)

M. Mathieu COUREUIL, examinatrice externe Institut Necker-Enfants malade (Paris, France)

ABSTRACT

The bacterial envelope is a widely studied subject, as it is the element that defines the boundary between the bacteria and its surroundings. This barrier is important for bacterial viability and integrity by protecting its contents and optimizing morphology to persist in its environment. Similarly, it has a central role in the establishment of virulence allowing the bacterium to induce infections and to secure itself in new living conditions.

The work presented in this thesis focused on the different functions of the envelope and how the different bacterial species have been able to evolve to best adapt to their hosts and to the selection pressure of their environment. In a first step, the research is focused on the study of the influence of the resistance gene: *mcr* on bacterial fitness with an analysis of the modifications of bacterial adhesion, resistance to human antimicrobial peptides and colonization of the intestinal tract in *Escherichia coli*, showing the diversity of implications of the bacterial wall. Other properties have been studied through the *Neisseriaceae* family by focusing on the role of the natural competence, the adaptation to the microbial flora of the host and also cell-wall in the establishment of morphology. Through the numerous techniques used and the diversity of the subjects of study used, the work presented in this thesis testifies to the multiplicity of the roles of the bacterial envelope, but also identifies the important elements that are composing it, and studied them to better fight against the emergence of multi-resistant pathogens.

Keywords: Outer membrane, *Escherichia coli*, *Neisseria*, bacterial fitness, tropism, morphology.

RÉSUMÉ

L'enveloppe bactérienne est un sujet largement étudié, car c'est l'élément qui définit la limite entre la bactérie et son environnement. Cette barrière est importante pour la viabilité et l'intégrité bactérienne en protégeant son contenu et en optimisant la morphologie pour perdurer dans un milieu hostile. De même, elle a un rôle central dans la mise en place de la virulence permettant à la bactérie d'induire des infections et de s'implanter au sein du microbiote.

Les travaux présentés dans ce mémoire se sont focalisés sur les différentes fonctions de la paroi bactérienne et comment les différentes espèces bactériennes ont pu évoluer pour s'adapter au mieux à leurs hôtes et à la pression de sélection de leur environnement. Dans un premier temps, les recherches se sont focalisées sur l'étude de l'influence du gène de résistance *mcr* sur le fitness bactérien avec une analyse des modifications de l'adhésion bactérienne, de la résistance aux peptides antimicrobiens humains et de la colonisation du tractus intestinal chez *Escherichia coli*, montrant la diversité des implications de la paroi bactérienne. D'autres propriétés liées à la l'enveloppe ont pu être étudiée au travers de la famille des *Neisseriaceae* en se focalisant sur le rôle de celle-ci dans le tropisme bactérien, et les mécanismes d'adaptations à la flore nasopharyngée. Au travers des nombreuses techniques utilisées et par la diversité des sujets d'étude utilisés, les travaux présentés dans ce mémoire témoignent de la multiplicité des rôles de la paroi bactérienne, mais aussi identifient les éléments importants qui la composent et qui nécessitent d'être étudié pour mieux lutter contre l'émergence des pathogènes multirésistants.

Mots-clés : Parois, *Escherichia coli*, *Neisseria*, fitness bactérien, tropisme, morphologie.

AVANT-PROPOS

La rédaction de ce mémoire s'inscrit dans la cadre de l'accord de bidiplomation entre la formation en sciences expérimentales de la santé de l'INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologies Québec et la formation d'ingénierie de la santé, parcours diagnostic biomédical de l'Université Clermont-Ferrand France. Les résultats présentés ci-après sont donc le fruit de trois mois de recherches, dirigées par Guillaume Dalmasso au sein de l'unité UMR U01771, M2ISH (Microbe, Intestine, Inflammation and Host Susceptibility) ainsi que dix mois de recherches au sein du laboratoire de Frédéric Veyrier à l'INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie.

La paroi bactérienne est une structure très complexe et possède de nombreuses propriétés vitales pour la bactérie. Étant absente chez les Eucaryotes, elle a rapidement attiré l'attention de la communauté scientifique dans la recherche de traitements dans la lutte contre les infections bactériennes (Few et Schulman 1953). Cependant après la découverte de traitements antibiotiques efficaces, l'usage abusif de ceux-ci a déclenché le développement de nombreux phénomènes de résistances aux antibiotiques et l'apparition *in fine* de bactéries « multirésistantes » (pouvant résister à plusieurs familles d'antibiotiques) (« Multiresistant organisms: bacteria and beyond : Current Opinion in Organ Transplantation » s. d.). L'apparition de tels organismes inquiète grandement l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plaçant la résistance aux antibiotiques comme une menace pour la santé publique mondiale.

C'est dans ce contexte que j'ai commencé à m'intéresser à la paroi bactérienne et à ses propriétés. En effet, j'ai pu réaliser un stage dans l'unité UMR U01771, M2ISH (Microbe, Intestine, Inflammation and Host Susceptibility) du Professeur Nicolas Barnich, sous la supervision du Professeur Guillaume Dalmasso lors de ma première année de maîtrise. Ce stage m'a permis de réaliser une étude des variations du fitness bactérien en présence de gènes de résistances aux antibiotiques chez *E. coli*, en me focalisant principalement sur les modifications du lipopolysaccharide bactérien en présence du gène de résistance à la colistine *mcr* et son influence sur le comportement bactérien.

Pour poursuivre mes recherches sur la paroi bactérienne, j'ai rejoint l'équipe *Évolution des symbiotes bactériens* du Professeur Frédéric Veyrier spécialisée dans l'étude de la famille des *Neisseriaceae*, et qui est particulièrement intéressée par le tropisme bactérien et l'adaptation de la famille à la flore du nasopharynx. Mes recherches au sein du laboratoire m'ont amené à

travailler sur la compétence naturelle des *Neisseria* commensales dans un contexte de modèle d'infection, mais aussi sur la régulation morphologique de cette famille.

Ce mémoire est séparé en deux sections, une première relatant de l'ensemble des résultats que j'ai pu récolter lors de mon stage de première année de maîtrise et la seconde sur mon projet de recherche de deuxième année de maîtrise.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'avancer de ma maîtrise et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

En premier lieu, je tiens à remercier le directeur du laboratoire, Monsieur Nicolas Barnich, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire M2ISH et de m'avoir aidé dans ma formation et les recherches sur mon sujet. Je souhaite remercier particulièrement Monsieur Guillaume Dalmaso, enseignant-chercheur à L'Université Clermont Auvergne pour le temps qu'il m'a consacré, et pour m'avoir guidé dans mon travail et ma réflexion.

De même je souhaiterais remercier le Professeur Frédéric Veyrier, directeur du laboratoire *Évolution des symbiotes bactériens* pour m'avoir permis de réaliser mon projet de recherche de deuxième année de maîtrise dans son équipe. Je le remercie pour l'ensemble des techniques et connaissances qu'il a pu me transmettre et pour son investissement dans la mise en place de mon projet professionnel. Je souhaiterais de la même manière remercier les doctorants Eve Bernet et Martin Chenal ainsi que toute l'équipe du laboratoire : Cécilia, Laxmie, Garrima, Fransisco pour m'avoir formé pendant cette année et apporté un soutien infailible. Je souhaite faire une mention spéciale à Adeline Paimboeuf une étudiante de maîtrise avec qui j'ai pu partager l'expérience d'être étudiants expatriés en maîtrise.

Je remercie ma famille pour m'avoir épaulé lors de mon cursus de maîtrise et je suis reconnaissante pour tous le soutien apporté par mes amis : Romane, Gabrielle, Kenny, Jeanne et Valentine.

Finalement je remercie la région Auvergne-Rhône-Alpes pour le soutien financier qui m'a été accordé dans le cadre de ma mobilité internationale.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	12
Liste des équations :	14
Liste des abréviations et des sigles	15
Partie I : Les gènes de la famille des <i>mcr</i> conférant la résistance à la colistine influencent-ils le fitness des bactéries ?	17
INTRODUCTION	17
I. L'émergence des résistances aux antibiotiques.....	17
II. <i>Mcr-1</i> le gène de résistance à la colistine.....	19
III. Propriétés et composition du LPS.....	21
IV. <i>Mcr-1</i> apporterait aux bactéries d'autres propriétés que la simple résistance à la colistine	
22	
V. Objectifs du projet de recherche.....	23
MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
I. Culture cellulaire.....	24
II. Culture bactérienne.....	24
III. Infection des cellules et quantification du nombre de bactéries adhérentes.....	24
IV. Résistance des bactéries aux peptides antimicrobiens.....	25
V. Dosage de l'IL-8.....	25
VI. Purification du LPS.....	25
VII. Analyses statistiques.....	26
RÉSULTATS	27
I. MCR-3 et MCR-9 augmentent la capacité d'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales.....	27
II. MCR-3 et MCR-9 diminuent le pouvoir pro-inflammatoire du LPS.....	28
III. Contrairement à MCR-3, MCR-9 ne protège pas les bactéries des peptides antimicrobiens	
30	
DISCUSSION	32

CONCLUSION	35
Partie II : ÉTUDE du tropisme des <i>Neisseria</i> humaines par la mise en place d'un modèle <i>in vivo</i> chez la souris.	36
INTRODUCTION.....	36
I. La famille des <i>Neisseriaceae</i>	36
II. Le genre des <i>Neisseria</i>	38
a. Tropisme des <i>Neisseria</i>	38
b. <i>Interactions hôtes pathogènes et mécanisme de virulence</i>	40
i. Adhésion colonisation et dissémination	40
c. Santé publique et résistances aux antibiotiques	43
III. Spécificités du génome des <i>Neisseria</i> : les stratégies induisant de l'hypervariabilité ...	51
IV. Les différents modèles d'étude de la colonisation pour les <i>Neisseria</i> : De l'humain au modèle <i>in vivo</i>	54
a. Modèle d'infections par le genre <i>Neisseria</i>	54
b. Modèles animaux mis en place au sein du laboratoire	56
c. Modèles pour le suivi de la colonisation des <i>Neisseria</i>	58
V. Objectifs du projet de recherche	58
MATÉRIELS ET MÉTHODES	60
I. Élaboration des souches luminescentes	60
a. Souches bactériennes et conditions de cultures	60
b. Construction des plasmides avec la méthode d'intégration des régions homologues <i>Neisseria</i> spécifiques	61
c. Transformation dans les espèces de <i>Neisseria</i>	67
II. Microscopie confocale.....	68
III. Microscopie électronique à transmission	68
IV. Séquençage	69
V. Mise en place de la colonie souris	69
a. Changement de fond génétique par rétrocroisement.....	69
b. Génotypage des souris	71

- c. Infection des souris par *N.meningitidis* pour étudier le changement de fond génétique
72

RÉSULTATS :	73
I. Souches de <i>Neisseria</i> commensales luminescentes.....	73
II. Rétrocroisement des souris	79
DISCUSSION :	86
CONCLUSION	90
CONCLUSION GÉNÉRALE :	90
BIBLIOGRAPHIE	91
Annexe 1 : Tableau des amorces	99
Annexe 2 : Projet annexe : effets du gène <i>MreB</i> sur la morphologie de <i>Neisseria muscoli</i> : étude préliminaire	100

LISTE DES TABLEAUX

tableau 1 : quantité de bactéries e. coli cft073 après une nuit de culture en bouillon luria	27
tableau 2 : tableau récapitulatif des infections attribuées aux espèces de neisseria commensales	49
tableau 3 : les résistances aux antibiotiques chez les neisseria commensales.....	50
tableau 6 : avantages et inconvénients des différents modèles d'étude des neisseria.....	55
tableau 7 : tableau récapitulatif des souche utilisées, pour les expériences de clonage et d'infection dans les neisseriaceae.....	61
tableau 8 : résultats des essais de transformations chez les neisseria commensales pour l'obtention de souches luminescentes.....	78
tableau 9 : tableau récapitulatif des cas cliniques relevés du 26 mai 2021 au 15 juillet 2022.	79
tableau 10 : tableau récapitulatif des cycles de reproductions du rétrocroisement.....	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Composition membranaire des bactéries Gram + et Gram -	18
Figure 2 : Structure de la colistine.....	19
Figure 3 : Transferts horizontaux favorisant la transmission des gènes de résistances.	19
Figure 4 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane externe des bactéries Gram -	20
Figure 5 : Structure du lipopolysaccharide (LPS)..	21
Figure 6 : Résumé obtenu par le laboratoire M2ISH concernant l'étude de mcr-1.....	24
Figure 7 : MCR-3 et MCR-9 augmentent l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales.....	28
Figure 8 : MCR-3 et MCR-9 diminuent le pouvoir pro-inflammatoire du LPS.....	29
Figure 9 : Contrairement à MCR-3, MCR-9 n'augmente pas la résistance des bactéries au LL-37.	31
Figure 10 : Arbre phylogénétique des <i>Neisseriaceae</i>	36
Figure 11 : Le nasopharynx, un carrefour d'entrée dans l'organisme.....	38
Figure 12 : Systèmes d'antagonismes chez les <i>Neisseria</i>	39
Figure 13 : Récapitulatif des éléments nécessaires aux mécanismes d'adhésions et de colonisation.	41
Figure 14 : Infection par <i>Neisseria</i> . Exemple avec le pathogène <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43
Figure 15 : Les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques retrouvé chez <i>N. Gonorrhoeae</i>	45
Figure 16 : Distribution mondiale des sérogroupes de <i>N. Meningitidis</i> majeurs et des principales épidémies du séro-groupe B	47
Figure 17 : Représentation schématique des deux mécanismes spécifiques des <i>Neisseria</i> induisant une hypervariabilité dans le génome.....	52
Figure 18 : Les espèces de <i>Neisseria</i> humaines possèdent des DUS spécifiques d'espèces.....	52
Figure 19 : Modèle FVB pour l'infection des souris par souche lumineuse : exemple d'infection par <i>Neisseria meningitidis</i> sauvage, <i>Neisseria musculi</i> sauvage et <i>Neisseria musculi</i> Knock out.	57
Figure 20 : Plasmides pour l'insertion d'un gène de résistance : exemple de <i>N. Lactamica</i>	62
Figure 21 : Plasmides pour l'insertion de la cassette de la luciférase et de son gène de résistance associé : exemple de <i>N. Lactamica</i>	64
Figure 22 : La création de souches lumineuses par le processus de « unmarked lumineuse strain »....	66
Figure 23 : Plasmides pour l'insertion du gène <i>mreb</i> provenant de plusieurs espèces dans <i>N. Musculi</i>	67
Figure 24 : Méthode de rétrocroisement pour changement de fond génétique utilisé lors de cette étude.....	71
Figure 25 : Produits de PCR pour la création des régions spécifiques 5'3' pour <i>N.lactamica</i> , <i>N.polysacchareae</i> , <i>N. Cinerhea</i> ..	73
Figure 26 : Digestions, vérifications des plasmides <i>pjet5'3'poly</i> , <i>pjet5'3'lacta</i> et <i>pjet5'3'cine</i> .	
Figure 28 : Obtention des plasmides lumineux kanamycine résistante dans <i>Escherichia coli</i> DH5α	76

Figure 29 : Résultats de PCR colony pour les transformations de pjet5'3'poly ::ery dans *N.polysacchareae* et pjet5'3'cine ::ery dans *N.cinerea*..... 77

Figure 30 : Obtention des plasmides luminescents érythromycine résistante dans *Escherichia coli* DH5α..... 77

Figure 31 : Détermination des souriceaux Hceacam par PCR colonie.. 80

Figure 32 : Infection des souris FVB/hceacam et Balb-c/hceacam par des souches luminescentes de *Neisseria meningitidis*. 83

Figure 33 : Infection des souris Balb-c/hceacam du premier et second croisement par des souches luminescentes de *Neisseria meningitidis*.85

Figure 34 : : Transformation du plasmide pucmrebsm-Nmusc::Ery dans *N.musculi* lux..... 101

Figure 35 : Comparaison morphologique des clones, *Neisseria musculi* mrebsimongfp et *Neisseria musculi* sauvage.. 102

Figure 36 : : Comparaison morphologique des clones, *Neisseria musculi* mrebsimonøgfp et *Neisseria musculi* sauvage.. 103

Figure 37 : Séquençage Sanger des plasmides pucmrebsm-Nmusc::Ery et pucmrebsmøgfp-Mmusc::Ery. . 104

Figure 38 : La construction pucmrebgfpnmusc::Ery possède aussi un phénotype de coque..... 106

LISTE DES ÉQUATIONS :

Équation 1 : Calcul pour déterminer l'UFC ou l'unité formant colonie par puits..... 25

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

Balb-C:	Bagg and Albino
CAST:	Castaneous
CIPA:	Comité de protection des animaux
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
DMEM:	Dulbecco's modified eagle's medium
DUS:	DNA Uptake Sequence
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ery :	Érythromycine
FVB:	Friend leukemia virus B
GCB :	Gonococcal broth
GFP :	Green fluorescent protein
Km :	Kanamycine
LB:	Luria Bertani
LNBE:	Laboratoire national de biologie expérimentale
LOS :	Lipooligosaccharide
LPS:	Lipopolysaccharide
MCR:	Mobilized colistin resistance
MOI :	Multiplicity of infection
MulDi :	Multicellular Longitudinally Dividing
<i>N. flavescens</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>N. cinerea</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>N. elongata</i>	<i>Neisseria elonga</i>

N. lactamica *Neisseria lactamica*

N. meningitidis *Neisseria meningitidis*

N. muscili *Neisseria muscili*

N. sicca *Neisseria sicca*

N. subflava *Neisseria subflava*

NLRP : Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing

NOD Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAM : Peptide antimicrobien

PBS : Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldéhyde

PGBPS: Peptidoglycan-binding proteins

PRRs : Pattern recognition receptors

PTA : Acide phosphotungstique

RA : Résistance antibiotique

RPLK : Ribosomal Proteins L11

S.muelleri *Simonsiella muelleri*

SSM: Slipped-Strand Mismatching

SVF : sérum de veau fœtal

UFC : Unité formant colonie

PARTIE I : LES GÈNES DE LA FAMILLE DES *MCR* CONFÉRANT LA RÉSISTANCE À LA COLISTINE INFLUENCENT-ILS LE FITNESS DES BACTÉRIES ?

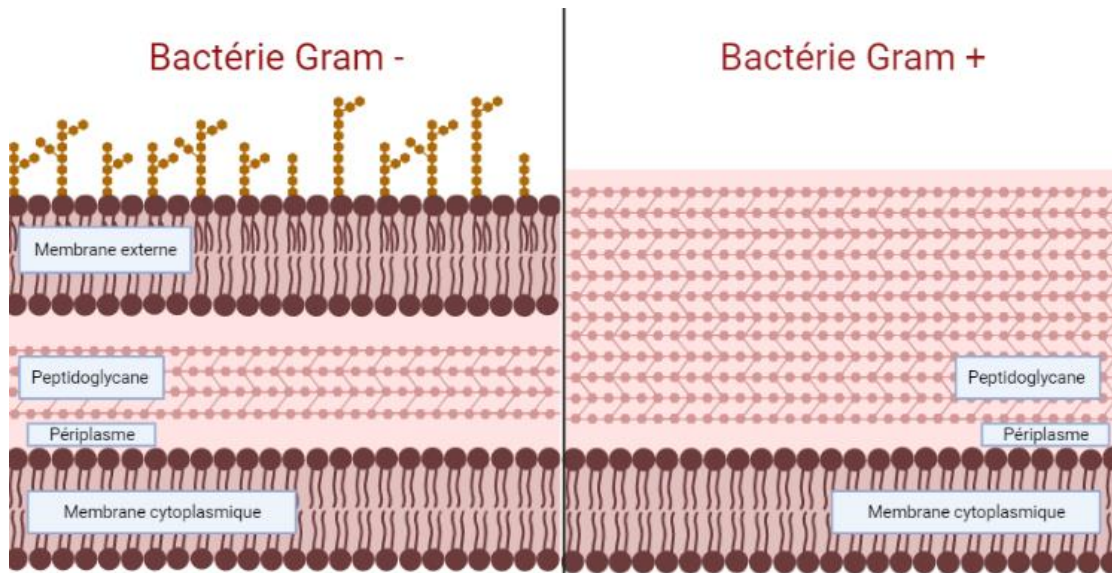
INTRODUCTION

I. L'émergence des résistances aux antibiotiques

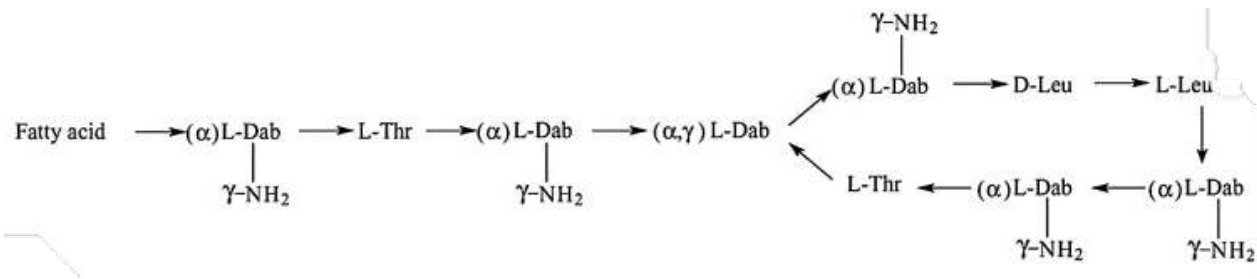
La résistance aux antibiotiques (RA) est un problème majeur de santé publique. En effet l'usage excessif et inapproprié des antibiotiques a permis à de nombreuses bactéries de développer des mécanismes de résistance qui s'avèrent délétères dans le traitement de nombreuses pathologies (Millan 2018). De plus on détecte un nombre croissant de bactéries dites multirésistantes, c'est-à-dire capables de résister à plusieurs antibiotiques. Un exemple serait la famille des *Neisseria* avec particulièrement la bactérie *Neisseria gonorrhoeae* dont le catalogue de résistance ne fait qu'augmenter les années 80 et qui a touché 82,4 millions de personnes en 2020. (« Gonorrhée multirésistante » s. d.) On estime à 700 000 le nombre de décès par an dans le monde liés à des résistances aux antibiotiques et une étude prédictive annonce même pour les années 2050, 10 millions de morts par an dus à la RA soit plus que le nombre de décès liés aux cancers (O'Neill 2016).

Dans ce contexte, il est indispensable de conserver des antibiotiques toujours actifs contre les bactéries. Il faut pour cela utiliser de manière raisonnée les antibiotiques afin de limiter l'émergence de la RA et utiliser en dernier recours les antibiotiques encore à ce jour efficaces contre les bactéries multirésistantes. Les antibiotiques ciblent de nombreuses bactéries qui peuvent être classées en deux grandes familles en fonction de leur composition membranaire. Les bactéries dites à Gram positif qui possèdent au-dessus de leur bicouche lipidique une épaisse paroi faite de peptidoglycane et les bactéries dites à Gram négatif qui possèdent au-dessus de leur bicouche lipidique une fine paroi de peptidoglycane surmontée d'une deuxième bicouche lipidique (Figure 1). La colistine est un antibiotique de dernier recours (figure 4). Cette molécule fait partie de la famille des polymyxines, des agents cationiques constitués d'un peptide cyclique

et d'une queue hydrophobe (Figure 2), utilisés contre les bactéries à Gram négatif dont la famille des *Neisseria*.



La colistine a été utilisée jusque dans les années 1970-1980, mais sa forte néphrotoxicité a participé à son remplacement vers la fin du XXe siècle par d'autres antibiotiques mieux tolérés (Abd El-Baky et al. 2020). Les impasses thérapeutiques rencontrées en clinique lors d'infections par des bactéries Gram négatif multirésistantes ont obligé à reconsidérer l'usage de la colistine qui fait maintenant partie de la lutte contre ces infections. Cependant, en 2015, il a été rapporté en Chine des patients porteurs de souches résistantes à la colistine rendant de ce fait le traitement inefficace (Y.-Y. Liu et al. 2016).



II. *Mcr-1* le gène de résistance à la colistine

Il existe de nombreux mécanismes de résistances aux antibiotiques qui peuvent être obtenus par des mutations chromosomiques, mais aussi par l'acquisition d'éléments extrachromosomiques chez les bactéries. Cette acquisition se fait principalement par des transferts horizontaux de matériel génétique (Figure 3) (Aleksun et Levy 2007), des éléments génétiques comme les plasmides peuvent être des vecteurs de résistances.

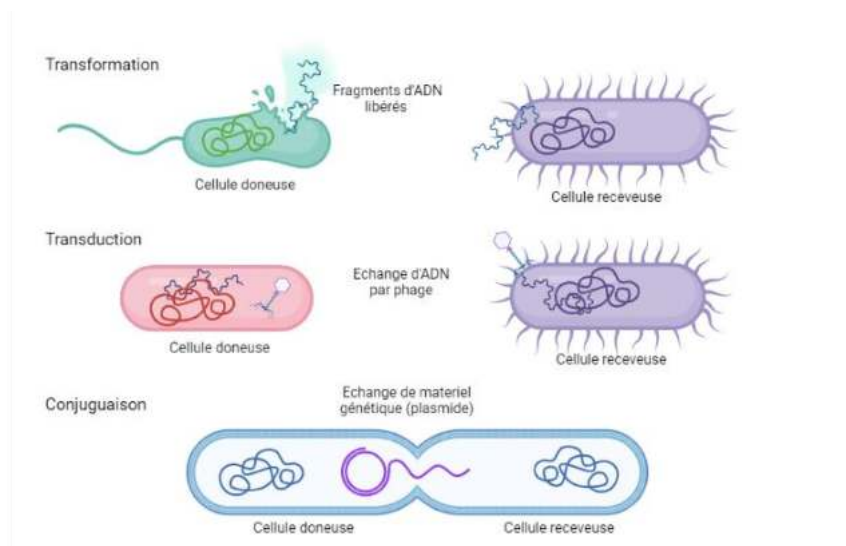


Figure 3 : **Transferts horizontaux favorisant la transmission des gènes de résistances.** Il existe plusieurs mécanismes de transferts horizontaux permettant l'échange de matériel génétique, dont les gènes de résistances.

Dans le cadre de la colistine, un plasmide contenant le gène *mcr-1* a été récemment identifié comme source de la résistance à cet antibiotique chez les Entérobactériales, et plus précisément dans l'espèce *E. coli* (Y.-Y. Liu et al. 2016). Le fait que la résistance soit portée par un plasmide

inquiète la communauté scientifique et médicale, car ces éléments génétiques diffusent facilement entre les souches bactériennes facilitant grandement la transmission de *mcr-1*. En effet, quelques années seulement après sa découverte, *mcr-1* a été retrouvé hébergé dans des bactéries colonisant aussi bien les *humains* que les animaux domestiques ou sauvages (Y.-Y. Liu et al. 2016). *Mcr-1* code pour la protéine MCR-1, une phosphoethanolamine transférase qui va modifier un phosphate du lipide A du lipopolysaccharide (LPS), site d'action de la colistine (Bialvaei et Samadi Kafil 2015) par l'ajout d'un groupement phosphoethanolamine. Ceci a pour conséquence la neutralisation de la charge du LPS empêchant la fixation de la colistine sur ce dernier abolissant ainsi son effet bactéricide (Abd El-Baky et al. 2020) (Figure 4).

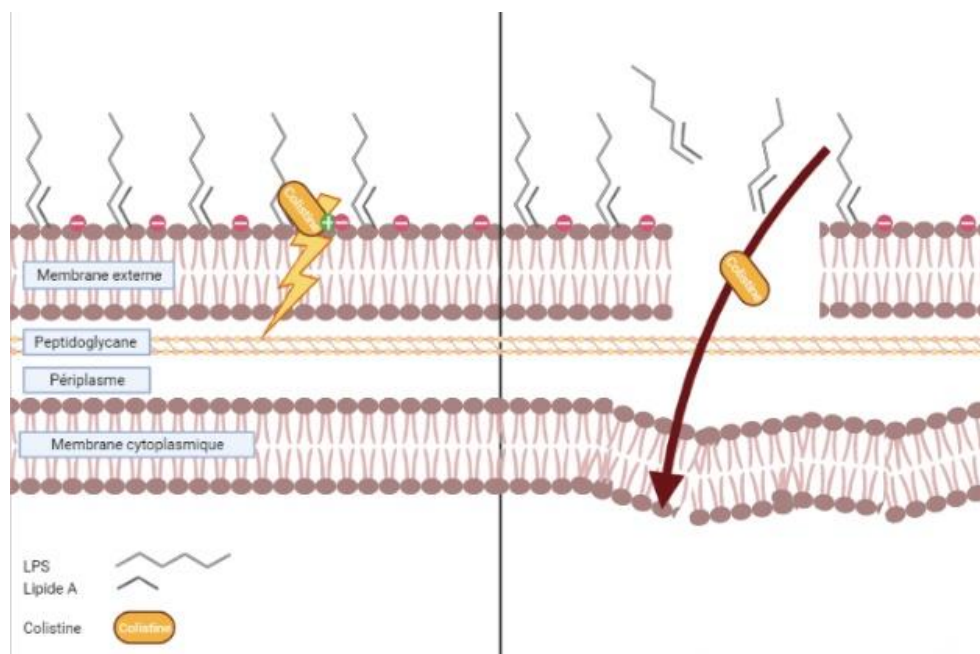


Figure 4 : **Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane externe des bactéries Gram -.** Le lipide A du LPS est chargé négativement. La colistine, qui est une molécule chargée positivement, vient se fixer au niveau du lipide A, entraînant une déstabilisation de la membrane, la création de pores et donc la mort de la bactérie. (Bialvaei et Samadi Kafil 2015)

III. Propriétés et composition du LPS

Les lipopolysaccharides sont des molécules retrouvées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les LPS sont constitués d'un lipide, le lipide A, liée à une longue chaîne polysaccharidique et un antigène O (Oliveira et Reygaert 2021) (Figure 5).

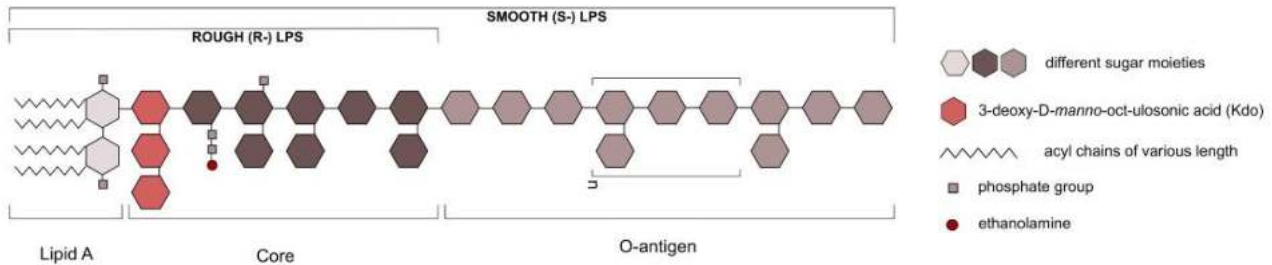


Figure 5 : **Structure du lipopolysaccharide (LPS)**. Le LPS est composé de trois parties : un lipide A attaché à la membrane, une chaîne polysaccharidique et un antigène O. Les carrés gris représentent les groupements phosphates du lipide A (Steimle, Autenrieth, et Frick 2016).

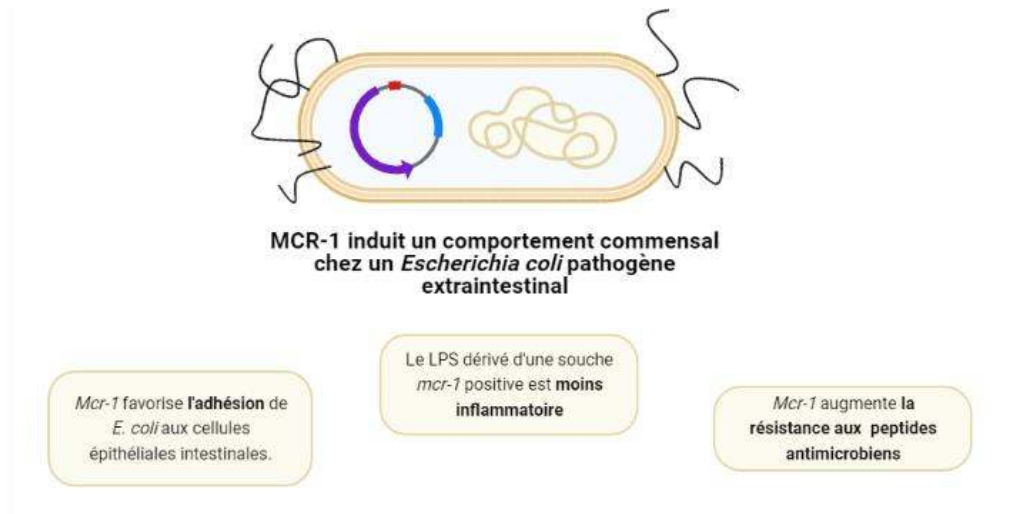
Le LPS est une molécule qui possède de nombreuses propriétés, dont celle d'être endotoxique (fonction portée par le lipide A) (Trent 2013), c'est-à-dire capable d'induire une forte réponse inflammatoire après avoir été reconnue par le récepteur TLR4 (Toll-like receptor) de l'immunité innée. Dans le cadre de la résistance à la colistine, les modifications du lipide A le rendent moins anionique empêchant la colistine, molécule à charge positive, de bouleverser l'équilibre des charges et de déstabiliser la membrane (Abd El-Baky et al. 2020) (Figure 5). L'étude du lipide A paraît donc capitale pour mieux comprendre la problématique de la résistance à la colistine.

IV. Mcr-1 apporterait aux bactéries d'autres propriétés que la simple résistance à la colistine

Étant donné l'importance notamment du point de vue clinique de *mcr-1*, des travaux ont été entrepris afin de mieux comprendre la régulation de l'expression de *mcr-1*. Il a été constaté qu'il est toujours porté par des plasmides qui ont la particularité d'être présents en faibles copies dans les bactéries (J. Yang et al. 2021). Parallèlement, les bactéries résistantes à la colistine présentent de faibles CMI (la CMI étant la concentration minimale inhibant toute croissance visible des bactéries) et des taux de transcrits codant *mcr-1* en faibles quantités (Q. E. Yang et al. 2020). Ces observations suggèrent une régulation fine de l'expression de *mcr-1*. Afin de mieux comprendre l'importance pour les bactéries de contrôler la traduction de MCR-1, le gène a été cloné dans un vecteur d'expression possédant un promoteur inducible par l'arabinose. Il a été constaté que plus la concentration d'arabinose était élevée, plus la survie bactérienne était impactée (Q. E. Yang et al. 2020). L'hypothèse avancée est que MCR-1, en s'enchâssant dans la membrane bactérienne, finit par la déstabiliser en tuant ainsi la bactérie.

Des résultats préliminaires obtenus par le laboratoire M2ISH suggèrent que MCR-1 joue un rôle qui pourrait aller au-delà de la résistance à la colistine, la protéine pourrait influencer le fitness bactérien, c'est-à-dire, la capacité de la bactérie à s'adapter aux conditions de son environnement. Pour aller plus loin, *mcr-1* a été cloné dans le vecteur d'expression pBK-CMV (Non publié). Ce plasmide a ensuite été électroporé dans la souche *E. coli* CFT073, une souche de référence responsable d'infection urinaire dont le réservoir naturel est le tractus digestif. Cette souche a aussi été rapportée comme pouvant induire chez la souris une inflammation lors d'une infection par gavage (Rosadini et Kagan 2017). La souche *E. coli* CFT073 possédant le plasmide pBK-CMV-*mcr-1*, arbore une CMI pour la colistine comparable à celle observée pour les souches d'origines hospitalières possédant *mcr-1*, alors que la souche *E. coli* CFT073 possédant le plasmide pBK-CMV vide est sensible à cet antibiotique. *In vitro*, le laboratoire a observé que MCR-1 permet à la bactérie de mieux adhérer aux cellules épithéliales intestinales. Parallèlement, les bactéries qui traduisent MCR-1 exhibent une plus grande résistance aux peptides antimicrobiens (PAM) aussi bien d'origine bactérienne qu'humains, et possèdent un LPS aux capacités inflammatoires amoindries. Toutes ces modifications se traduisent *in vivo* par une plus grande capacité des bactéries à coloniser le tractus digestif des souris tout en inhibant la réponse inflammatoire.

Figure 6 : **Résumé des résultats obtenus par le laboratoire M2ISH concernant l'étude de *mcr-1*.**(Dalmasso et al., s. d.) L'expression de *mcr-1* modifie le fitness bactérien.



V. Objectifs du projet de recherche

À ce jour, 10 membres de la famille *mcr* ont été rapportés dans la littérature. Nous nous sommes alors demandé lors de mon stage si la modification du fitness bactérien était unique à MCR-1 ou bien si c'était une caractéristique commune aux protéines de cette famille. Le laboratoire disposant de souches possédant les gènes *mcr-3* et *mcr-9*, ces derniers ont été clonés dans le plasmide pBK-CMV qui a ensuite été introduit dans la souche *E. coli* CFT073. L'expression de MCR-3 et -9 a été validée par une augmentation de la CMI en présence de colistine.

Le fitness bactérien est un terme qui peut regrouper beaucoup de comportements et d'actions des bactéries. Durant ce stage, l'étude de l'impact de MCR-3 et -9 a été orienté sur trois paramètres : l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales, le pouvoir inflammatoire du LPS et la résistance aux PAM.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales intestinales humaines HT-29 (ATCC) ont été cultivées à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Cambrex), 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de L-glutamine, 1% de vitamines, 200 U/L de pénicilline, 50 mg/L de streptomycine et 0,25 mg/L d'amphotéricine B (Invitrogen). Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours et les cellules ont été repiquées à l'aide d'une solution de 10% de trypsine lorsqu'elles étaient à ~80% de confluence. La veille de l'infection, les cellules HT-29 ont étéensemencées en plaque 24 puits à une densité de 5.10⁵ cellules par puits dans un milieu dépourvu d'antibiotique.

II. Culture bactérienne

Les bactéries ont été cultivées en milieu LB (Lysogeny Broth) à 37°C sous agitation. Nous avons utilisé la souche uropathogène de référence *E. coli* CFT073 hébergeant le plasmide pBK-CMV vide (Agilent Technologies) ou hébergeant le plasmide pBK-CMV contenant le gène *mcr-3* ou *mcr-9*. De manière à ce que les bactéries conservent le plasmide pBK-CMV lors de leur croissance, de la kanamycine (50 µg/mL) a été ajoutée au milieu de culture. Après une nuit de culture, la quantité de bactéries a été déterminée par une mesure de la densité optique (DO) à 600 nm et des dilutions étalées sur géloses nutritives afin de pouvoir établir une relation entre la DO et le nombre d'UFC (unité formant colonie).

III. Infection des cellules et quantification du nombre de bactéries adhérentes

À partir de suspensions bactériennesensemencées la veille, les cellules ont été infectées pendant 3h à une multiplicité d'infection de 100 bactéries par cellule (MOI = 100). Après 3h d'infection, les cellules ont été lavées 4 fois avec du PBS et lysées dans 500 µL de Triton 1X. Les lysats ont ensuite été dilués dans de l'eau physiologique (0,9% NaCl) et étalés sur des

géloses Luria Bertani. Après 24h d'incubation à 37°C, les bactéries ont été dénombrées et les résultats exprimés en UFC/puits (unité formant colonie) (Équation 1).

Équation 1 : Calcul pour déterminer l'UFC ou l'Unité formant colonie par puits.

$$\frac{\text{Nombre de colonies} \times \text{facteur de dilution}}{\text{Volume de culture}}$$

IV. Résistance des bactéries aux peptides antimicrobiens

Les bactéries ont étéensemencées la veille et cultivées comme décrit précédemment. Le jour de l'expérience, les bactéries ont été lavées dans du tampon phosphate (5,15 mM NaH₂PO₄ + 13,8 mM Na₂HPO₄, pH = 7,2) puis des suspensions bactériennes calibrées à la densité optique de 0,5 McFarland ont été réalisées grâce à un spectromètre portatif (Densichek plus) et aliquotées (100 µL) dans des tubes de 1,5 mL. Le peptide LL-37 (PeptaNova) a ensuite été incubé avec les bactéries à 37°C sous agitation. Après dilutions et étalements sur géloses LB, les UFC ont été dénombrés et les résultats ont été exprimés en pourcentage de survie (%).

V. Dosage de l'IL-8

Les milieux de cultures des cellules HT-29 ont été récupérés, centrifugés 5 minutes à 5000g et conservés à -20°C. Le dosage de l'interleukine-8 a été effectué en utilisant le « Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit » (R&D Systems) en suivant les recommandations du fabricant.

VI. Purification du LPS

Les bactéries ont été cultivées dans 50 mL de LB toute une nuit comme décrit précédemment puis centrifugées 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le culot a été lavé dans du PBS et centrifugé comme précédemment. Le culot a été repris dans 5 mL de PBS, puis soniqué (Amplification à 30%, 20 fois 30 secondes avec 30 secondes de pause entre chaque sonification). Le lysat bactérien a ensuite été incubé 1h à 56°C avec de la protéinase K (200µg /mL). Enfin, du MgSO₄ (1M), du chloroforme (1M), de la RNase (10mM) et de DNase (10mM) ont été ajoutés et les tubes mis à 37°C pendant 24h. Le jour suivant du phénol à 90% a été ajouté (vol/vol) et les tubes ont été mis à incuber 15 minutes à 68°C. Les tubes ont été refroidis dans la glace 15 minutes, puis centrifugés 15 minutes à 11000 rpm à 4°C. Après avoir récupéré la phase supérieure contenant le LPS, 300µL d'eau distillée ont été ajoutés pour extraire de nouveau

la phase phénolique. La phase d'extraction du LPS a été réalisée deux fois pour être sûre de bien avoir récupéré toute la phase supérieure dans les tubes d'extractions. Le LPS purifié a été lyophilisé puis repris dans du PBS stérile (stock à 1 mg/mL) et stocké à -20°C.

VII. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir d'Excel ainsi que du Logiciel GraphPad Version 8. Pour chaque comparaison un test de Shapiro Wilk a été effectué pour tester la normalité, puis en fonction du résultat un test paramétrique (Test de Student) ou un test non paramétrique (Test de Mann-Whitney) a été appliqué pour comparer les différentes conditions.

RÉSULTATS

I. MCR-3 et MCR-9 augmentent la capacité d'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales

Les travaux du laboratoire menés sur *mcr-1* montrent que les *E. coli* CFT073 possédant ce gène sur le plasmide pBK-CMV adhèrent mieux aux cellules épithéliales intestinales HT-29 que les *E. coli* possédant le plasmide pBK-CMV vide. (Dalmasso et al., s. d.) Nous nous sommes alors intéressés à l'impact de *mcr-3* et *mcr-9* sur l'adhésion bactérienne.

Dans un premier temps et afin de vérifier si la présence des gènes *mcr-3* et *mcr-9* n'impactait pas la croissance des bactéries (ce qui pourrait fausser nos conclusions sur les expériences d'adhésion), nous avons dénombré les bactéries en culture dans du bouillon Luria comme présenté dans le Tableau 1 aucune différence significative dans la pousse des bactéries n'a été observée.

Tableau 1 : **Quantité de bactéries *E. coli* CFT073 après une nuit de culture en bouillon Luria**
Des *E. coli* CFT073 transformés avec le plasmide pBK-cmv vide (CFT073 + vide) ou transformée avec le plasmide pBK-cmv contenant soit le gène *mcr-3* (CFT073 + *mcr-3*) soit le gène *mcr-9* (CFT073 + *mcr-9*) ont été cultivées une nuit dans du bouillon Luria. Après une nuit de culture, la densité optique (DO) à 600 nm a été mesurée et des dilutions étalées sur géloses nutritives. Après 24h, les unités formant colonie ont été dénombrées et mises en rapport avec la DO et le volume étalé.

	Quantité de bactéries (CFU/mL/unité de DO)
CFT073 + <i>mcr-9</i>	2,34.10 ⁸
CFT073 + <i>mcr-3</i>	3,8.10 ⁸
CFT073 + vide	3,6.10 ⁸

Les résultats des expériences d'adhésions sont présentés dans la Figure 7. Nous pouvons observer une augmentation significative de l'adhésion bactérienne lorsque les cellules sont infectées par la souche exprimant MCR-3 par rapport à la souche témoin (*E. coli* contenant le plasmide vide) (Figure 7a). Cette augmentation significative du nombre de bactéries adhérentes est également retrouvée lorsque les bactéries expriment MCR-9 (Figure 7b).

Ces résultats montrent que tout comme MCR-1, MCR-3 et MCR-9 induisent une forte augmentation du pouvoir adhérent des *E. coli*.

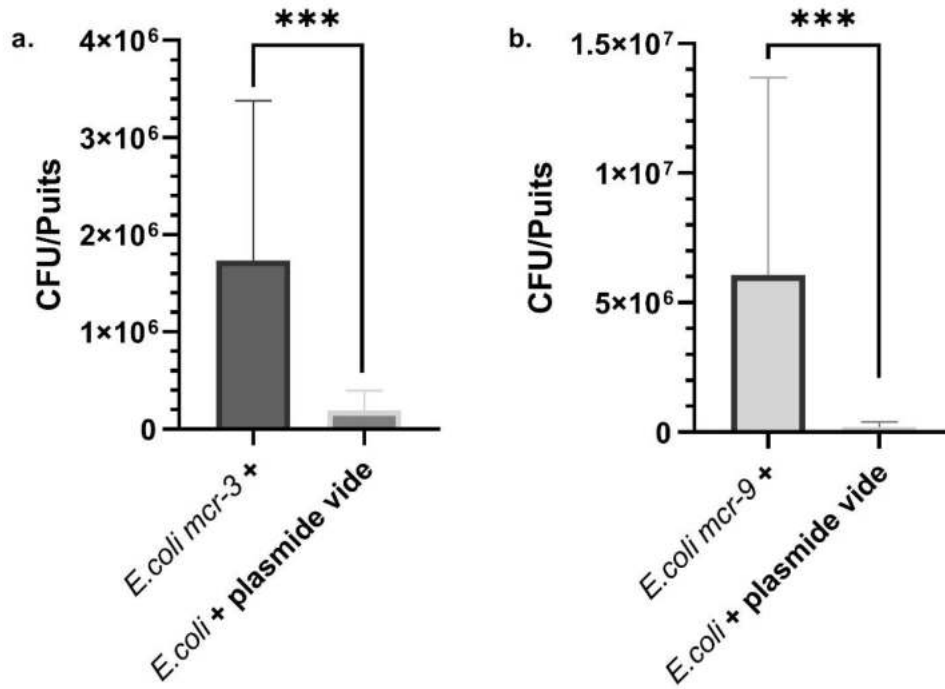


Figure 7 : **MCR-3 et MCR-9 augmentent l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales.** Des cellules HT-29 ont été infectées pendant 3h avec une souche d'*E. coli* CFT073 possédant le plasmide pBK-cmv vide ou possédant le plasmide pBK-cmv permettant l'expression de MCR-3 (*E. coli mcr-3+*) (a) ou MCR-9 (*E. coli mcr-9+*) (b). Après plusieurs lavages en PBS afin d'éliminer les bactéries non adhérentes, les cellules ont été lysées et des dilutions sérielles ont été étalées sur des géloses nutritives. Les résultats sont exprimés en UFC/puits \pm l'écart type. Les résultats sont la représentation de 8 expériences cumulées sur une manipulation. *** $p < 0,001$

II. MCR-3 et MCR-9 diminuent le pouvoir pro-inflammatoire du LPS

Le LPS est une molécule d'origine bactérienne, détectée par le système immunitaire inné et responsable d'une inflammation. Les cellules épithéliales intestinales sont la première ligne de défense contre les agressions microbiennes et lorsqu'elles détectent des motifs microbiens elles

secrètent principalement de l'IL-8. Cette chimiokine a pour rôle de recruter le système immunitaire au lieu d'infection (Bickel 1993). Les travaux précédents menés au laboratoire ayant

montré que le LPS dérivé de la bactérie *E. coli* CFT073 transformée par le plasmide pBK-CMV permettant l'expression de MCR-1 possédait un LPS moins inflammatoire que celui dérivé de la bactérie *E. coli* CFT073 possédant le plasmide pBK-CMV vide (non publié), nous avons alors testé les capacités inflammatoires du LPS dérivé de la bactérie *E. coli* CFT073 transformée par le plasmide pBK-CMV permettant l'expression de MCR-3 ou de MCR-9.

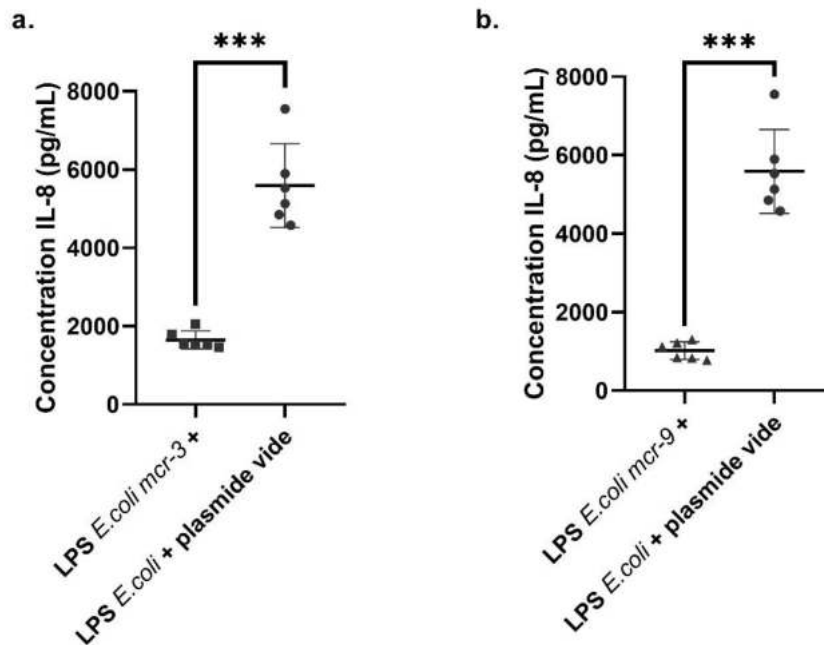


Figure 8 : **MCR-3 et MCR-9 diminuent le pouvoir pro-inflammatoire du LPS.** Les cellules HT-29 ont été stimulées pendant 3h avec du LPS (0,1 µg/ml) purifié à partir de la souche d'*E. coli* CFT073 possédant le plasmide pBK-cmv vide ou possédant le plasmide pBK-cmv permettant l'expression de MCR-3 (*E. coli mcr-3+*) (a) ou MCR-9 (*E. coli mcr-9+*) (b). La concentration en IL-8 présente dans les surnageants de culture a été dosée par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/mL ± l'écart type. Chaque point correspond à un réplica. *** p<0,001.

Comme présenté dans la Figure 8a, le LPS dérivé de la bactérie exprimant MCR-3 est significativement moins inflammatoire que celui dérivé de la bactérie transformée par le plasmide vide. Les mêmes résultats sont obtenus avec le LPS dérivé de la souche *E. coli* CFT073 exprimant MCR-9 (Figure 8b).

Ces résultats montrent que tout comme MCR-1, MCR-3 et MCR-9 diminuent les propriétés inflammatoires du LPS des *E. coli*.

III. Contrairement à MCR-3, MCR-9 ne protège pas les bactéries des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des peptides aux propriétés antibiotiques produits lors de la réponse immunitaire innée (Annunziato et Costantino 2020). Les PAM cationique, comme la cathélicidine ou LL-37, hBD-2 (human beta-defensin-2) et HD-5 (human alpha-defensin-5), ont des propriétés électrostatiques importantes (Ernst, Guina, et Miller 1999) qui leur permettent de se fixer par affinité de charges à la membrane externe des bactéries Gram négatif et de les tuer en y créant des pores (G. Wang et al. 2019). Les modifications du LPS, et plus précisément du lipide A par ajout d'un groupement arabinose ou phosphoéthalamine, conduisent à la modification de sa charge électrique (vers la neutralité) empêchant ainsi la fixation des PAM cationiques et donc entraînant l'acquisition d'une résistance à ces derniers (Shah, Hancock, et Fernandez 2014).

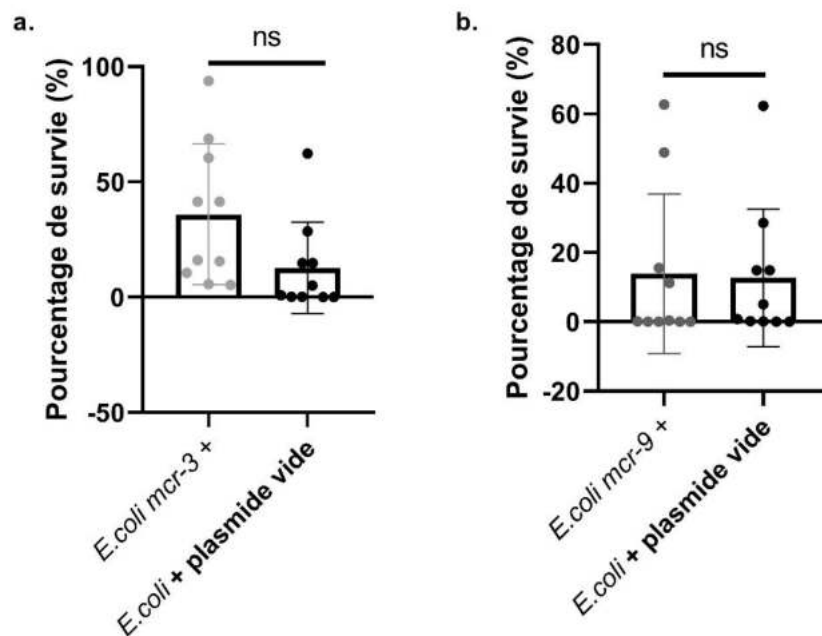


Figure 9 : **Contrairement à MCR-3, MCR-9 n'augmente pas la résistance des bactéries au LL-37.** Les *E. coli* CFT073 transformés par le plasmide pBK-CMV vide, ou par le plasmide permettant l'expression de MCR-3 (*E. coli mcr-3+*) (a) ou l'expression de MCR-9 (*E. coli mcr-9+*) (b) ont été incubés ou non pendant 3h avec 20 μ g de LL-37. Des dilutions sérielles ont ensuite été étalées sur des géloses nutritives. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie \pm l'écart type (la condition sans peptide étant le 100% de survie). NS, non significatif.

Les travaux menés au laboratoire M2ISH montrent que MCR-1 permet une augmentation de la résistance aux PAM LL-37, hBD-2 et HD-5. Nous avons testé la résistance au LL-37 de la bactérie *E. coli* CFT073 exprimant MCR-3 ou MCR-9. Pour cela, des inocula équivalents de bactéries *E. coli* CFT073 transformés avec le plasmide pBK-CMV permettant l'expression de MCR-3 ou de MCR-9 ainsi que des *E. coli* CFT073 transformés avec le plasmide vide ont été incubées ou non avec le LL-37. Comme présenté dans la Figure 9a, la présence de MCR-3 a une tendance à augmenter la résistance de la bactérie au LL-37. En revanche, cet effet n'est pas observé lorsque la bactérie exprime MCR-9 (Figure 9b).

Nos résultats montrent donc que la présence de MCR-3 ou de MCR-9 ne semble pas se traduire par un effet similaire sur la résistance des *E. coli* au LL-37. Alors que MCR-3 se rapproche de l'action déjà observée par le laboratoire pour MCR-1, MCR-9 ne protège pas les bactéries du LL-37.

DISCUSSION

Les bactéries portant des gènes de la famille *mcr* représentent un danger croissant au niveau mondial du fait de leur capacité à résister à un antibiotique de dernier recours, la colistine. Ces gènes sont retrouvés préférentiellement chez *E. coli* (91%). De manière à mieux comprendre leur impact sur les bactéries les hébergeant, le laboratoire M2ISH a cloné le gène *mcr-1* (le premier gène de la famille décrit et le plus répandu au niveau mondial) dans un vecteur d'expression et transformé la bactérie *E. coli* CFT073 avec cette construction. Le choix s'est porté sur cette souche qui est une souche de référence d'*E. coli* uropathogène, car son réservoir naturel est le tractus digestif et fait partie des rares *E. coli* possédant des propriétés inflammatoires chez la souris, un modèle que souhaiterait utiliser le laboratoire pour tester l'effet de MCR-1 sur la réponse inflammatoire. Les travaux ont montré notamment que MCR-1 permettait une meilleure colonisation bactérienne du tractus digestif des souris en i) favorisant l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, ii) augmentant la résistance aux PAM, iii) diminuant les propriétés inflammatoires du LPS.

Le laboratoire s'est ensuite posé la question de savoir si les résultats trouvés avec MCR-1 étaient extrapolables à d'autres membres de la famille MCR. De manière à répondre à cette question, *mcr-3* et *-9*, retrouvés dans des souches que possédait le laboratoire, ont été clonés à leur tour. Les résultats obtenus lors de ce projet semblent confirmer que MCR-3 et MCR-9 vont, tout comme MCR-1, permettre une meilleure adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales. De plus, les LPS produites par les bactéries exprimant MCR-3 et MCR-9 sont moins inflammatoires que les LPS produits par des *E. coli* n'exprimant pas de protéine MCR. Ces données, pourraient faire penser que la présence chez *E. coli* d'un gène *mcr* « faciliterait » le pouvoir colonisateur de cette dernière et donc son implantation digestive. En effet, le microbiote intestinal étant un environnement hautement compétitif, mieux adhérer aux cellules de l'hôte et atténuer la réponse immunitaire innée pourrait permettre de coloniser des niches écologiques auxquelles d'autres bactéries auraient difficilement accès. Cette hypothèse s'avère d'autant plus intéressante que MCR-3 (tout comme MCR-1) semble augmenter la résistance au peptide antimicrobien LL-37. Là encore, une meilleure résistance aux PAM permettrait l'accès à de nouvelles niches écologiques. À ce stade, les résultats obtenus sur les PAM avec la bactérie exprimant MCR-3 ne sont pas significatifs et seulement une tendance est observée (due notamment à une grande hétérogénéité des résultats). La variabilité de nos résultats pourrait s'expliquer par le fait que le peptide LL-37 utilisé dans cette étude avait déjà subi de nombreux cycles de congélation/décongélation,

ce qui aurait pu altérer son efficacité. En effet, nous avons commencé à tester la résistance des souches exprimant différents MCR aux peptides hBD-2 et HD-5 qui eux n'avaient jamais été décongelés, et les résultats semblaient beaucoup plus homogènes. Nous n'avons pu seulement effectuer deux essais, mais il semblerait que les résultats soient similaires à ceux obtenus avec le LL-37. Il est à noter toutefois que MCR-9, contrairement à MCR-1 et -3 ne semble pas protéger les bactéries du LL-37. Ce résultat est différent de ce que nous aurions pu attendre au regard des données obtenues en ce qui concerne l'adhésion et le pouvoir inflammatoire du LPS des souches exprimant MCR-9. Nous n'avons pas d'explication à ce stade. Le plasmide pBK-CMV possède un promoteur inducible à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Cependant, la répression n'est pas totale et lorsque *mcr-1*, et *mcr-3* sont clonés dans ce plasmide, nous observons, sans ajout d'IPTG, des CMI de 4 mg/L (une entérobactérie est résistante à la colistine lorsque la CMI est supérieure ou égale à 4 mg/L), ce qui est comparable aux CMI des souches cliniques. En revanche, les souches cliniques possédant le gène *mcr-9* collectées par le CNR du laboratoire de Bactériologie du CHU de Clermont-Ferrand ne sont jamais résistantes à la colistine et le clonage de *mcr-9* dans le plasmide pBK-CMV donne toujours des CMI compris entre 0,25 et 0,5 mg/L. Les résultats avec les différents *mcr* clonés donnant les mêmes CMI que les souches cliniques, nous avons décidé de ne jamais utiliser d'IPTG. Cependant, il serait intéressant de refaire les expériences en utilisant de l'IPTG de manière à tester si une transcription plus importante du gène *mcr-9* se traduit par une résistance aux PAM. Il a en effet été montré récemment que le clonage de *mcr-9* induit une résistance à la colistine que lorsqu'il est cloné dans un vecteur inducible et que l'on ajoute l'inducteur (Ling et al. 2020). Nous pouvons imaginer que la « fuite » du promoteur se trouvant dans le plasmide pBK-CMV suffit pour induire une transcription basale conduisant aux effets observés (adhésion, pouvoir inflammatoire du LPS), mais que la quantité de protéine MCR-9 reste insuffisante pour induire la résistance à la colistine ainsi que la résistance aux PAM.

Nos résultats ont tous été obtenus *in vitro* et semblent suggérer que l'expression de MCR-3 et, dans une moindre mesure MCR-9, pourrait faciliter l'implantation digestive à l'image de MCR-1. Il serait donc intéressant d'envisager des expériences *in vivo* en infectant par gavage des souris avec la souche *E. coli* CFT073 exprimant ou non une protéine MCR et de suivre sa présence dans les fèces au cours du temps. Nous pourrions utiliser des souris gnotobiotiques comme le modèle de flore contrôlée OMM-12 (oligo-mouse microbiota). Les souris OMM-12 possèdent un microbiote intestinal composé uniquement de 12 souches bactériennes qui sont représentatives des 5 phyla bactériens les plus abondants dans le tractus digestif des souris (Brugiroux et al. 2016). Elles présentent l'avantage de mimer de manière simplifiée le microbiote intestinal tout en

laissant l'accès à des niches écologiques à d'autres bactéries, facilitant ainsi leur implantation, ce qui est bien souvent extrêmement difficile sans avoir recours à des antibiotiques dans des souris possédant une flore complexe (Brugiroux et al. 2016). Ce modèle permettrait de répondre à la question concernant l'avantage que constituerait la présence d'un gène *mcr* dans l'implantation digestive des souches.

Enfin, des souris déficientes pour l'homologue murin du gène LL-37 (LL37^{-/-}) sont disponibles au laboratoire M2ISH, et dans le cas où la plupart des protéines MCR confèrent une résistance accrue à ce peptide, nous pourrions envisager de gaver ces souris afin de comparer la persistance des bactéries dans le tractus digestif des souris LL37^{-/-} avec des souris sauvages.

Les données obtenues lors de ce stage confirment certains résultats obtenus avec *mcr-1*. Cependant, des divergences sont apparues en ce qui concerne la résistance aux PAM. Il serait donc intéressant d'augmenter la collection de gènes *mcr* étudiés pour pouvoir généraliser ou non nos conclusions. L'étude du gène *mcr-2* avait été envisagée au cours de ce stage, car très proche génétiquement de *mcr-1* avec 81,3% d'identité (Ling et al. 2020). Cependant, et ce malgré plusieurs essais (dont certains effectués lors de mon stage), son clonage dans le plasmide pBK-CMV n'a pas pu être réalisé. En nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons essayé de formuler une hypothèse expliquant notre incapacité à obtenir une souche qui héberge le plasmide pBK-CMV-*mcr-2*. Des travaux précédents ont montré que l'expression de MCR-1 était finement régulée (Liu *et al.*). En effet, *mcr-1* est toujours retrouvé hébergé sur des plasmides présents en faibles copies et les niveaux de transcrits sont également très faibles. Ces auteurs ont également montré à l'aide d'un promoteur inductible contrôlant la transcription de *mcr-1*, que la protéine MCR-1 présente en trop grande quantité entraîne la mort des bactéries. Les auteurs expliquent cet effet par une déstabilisation de la membrane plasmique des bactéries du fait d'une trop grande accumulation de MCR-1 dans la membrane. Nous pouvons tout à fait envisager que la protéine MCR-2 exerce elle aussi une action toxique dans la membrane bactérienne. Comme expliqué précédemment, le promoteur du plasmide utilisé, bien qu'inductible, ne présente pas une répression totale. Il n'est pas exclu que les souches ayant été transformées par le plasmide recombinant soient tuées à cause d'une production basale de MCR-2 atteignant des seuils toxiques pour la bactérie.

CONCLUSION

Bien que très préliminaires, nos résultats semblent confirmer, du moins *in vitro*, que les protéines de la famille MCR confèrent aux bactéries un avantage compétitif. En effet, ces protéines sont capables de modifier profondément la physiologie des bactéries se traduisant par une meilleure capacité d'adhésion aux cellules hôtes, un pouvoir inflammatoire amoindri ainsi que pour certains MCR, une meilleure résistance aux PAM. Ainsi, des bactéries possédant un gène *mcr* seraient plus à même de s'implanter dans le tractus digestif. L'avantage octroyé par la traduction des MCR n'est pas minime, et l'étude des phosphoethanolamines transférases doit être approfondie pour mieux comprendre les dynamiques de colonisations bactériennes. Cet aspect est d'autant plus important que des espèces multirésistantes comme les *Neisseria* possèdent elles aussi une phosphoethanolamine transférase (LptA) avec des propriétés similaires aux MCR (Gao et al. 2016). Une meilleure caractérisation des membranes ainsi que la mise en place de nouveaux modèles paraissent donc capitales pour une meilleure compréhension du sujet.

PARTIE II : ÉTUDE DU TROPISME DES *NEISSERIA* HUMAINES PAR LA MISE EN PLACE D'UN MODÈLE *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS.

INTRODUCTION

I. La famille des *Neisseriaceae*

Au sein des Proteobactéries on peut retrouver les membres de la famille des *Neisseriaceae*. La famille des *Neisseriaceae* constituée du genre *Neisseria*, mais aussi d'autres genres plus ou moins éloignés dans l'évolution comme les genres *Kingella*, *Eikenella*, *Alysiella* ou *Simonsiella*. Les membres des *Neisseriaceae* sont pour la plupart des bactéries Gram –, mais aussi des commensaux retrouvés chez les mammifères. On notera que certaines espèces sont présentes chez les insectes comme les abeilles ou les moustiques (Tønjum et van Putten 2017). De nombreuses morphologies sont présentes dans le genre *Neisseria* : les coques, les bacilles et les MulDi (Multicellular Longitudinally Dividing) (Veyrier et al. 2015; Nyongesa, Weber, et al. 2022) Cette diversité témoigne des divergences évolutives qui ont pu se produire au cours de

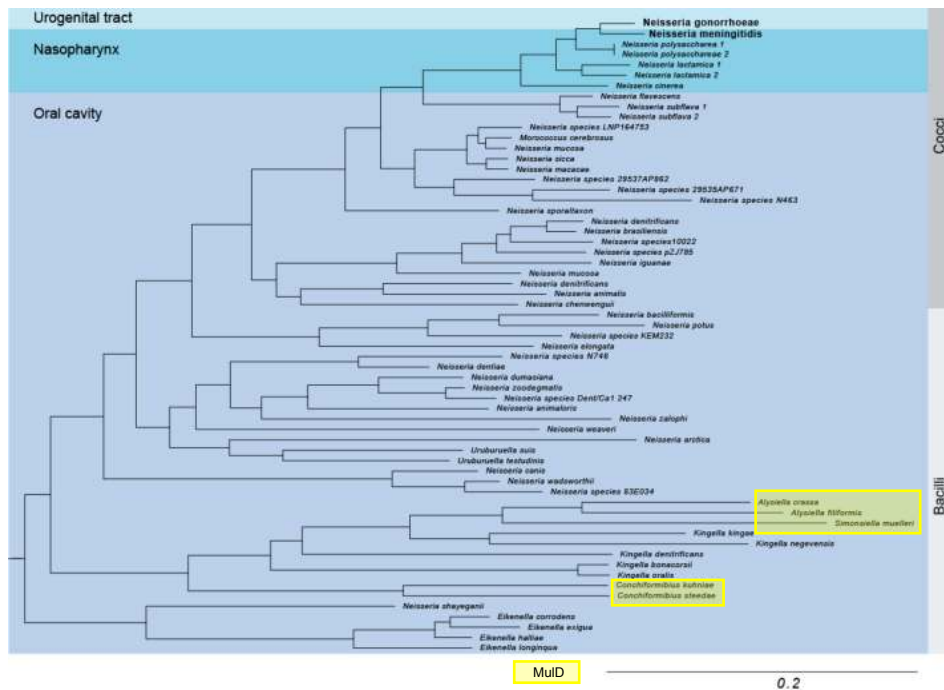


Figure 10 : Arbre phylogénétique des *Neisseriaceae*. Les *Neisseriaceae* regroupent de nombreuses espèces localisées principalement dans le nasopharynx et la cavité orale à l'exception du pathogène *Neisseria gonorrhoeae* qu'on retrouve dans les voies uro-génitales. L'arbre phylogénétique a été obtenu à partir de l'étude du *core genome*, c'est-à-dire en se basant sur l'ensemble des gènes présents dans toutes les souches bactériennes étudiées. La distance phylogénétique est représentée par la longueur des branches sur l'arbre. MulDi : **Multicellular Longitudinally Dividing** (Figure du laboratoire non publiée)

l'évolution et de l'adaptation des bactéries à différentes niches écologiques (Figure 10). Il est d'autant plus important que l'établissement de la phylogénie des *Neisseria* a permis d'identifier un nœud dans l'évolution au niveau de la morphologie, ou le passage de la morphologie coque à bacille s'est effectué. Pour déterminer ce nœud évolutif, une étude du *core* génome a été réalisée. On parle de *core* génome pour définir l'ensemble des gènes retrouvés dans presque tous les bactéries d'une même branche phylogénétique. Lors de cette étude, il a été observé que les membres bacilles ont tous une délétion du gène *yacF*. *YacF* a un rôle important dans le cycle cellulaire chez *E. coli*, en participant à la promotion de l'assemblage de l'anneau *FtsZ* nécessaire à la division bactérienne. Un rôle potentiellement similaire a pu être identifié pour la famille des *Neisseria* et ce gène a principalement été retrouvé chez les individus coques. *YacF* est un acteur important du passage évolutif de bacille à coque. On notera que la délétion du gène *yacF* s'accompagne chez certains descendants d'une perte de la machinerie d'élongation, ce qui appuie les preuves de son implication dans l'élongation (Veyrier et al. 2015) . Un autre nœud évolutif a été identifié dans l'étude de (Nyongesa, Weber, et al. 2022) dans lequel une nouvelle morphologie a pu être caractérisée : la forme MulDi. Les MulDis sont des bactéries multicellulaires qui se divisent de manière longitudinale. Deux branches de divergences de la forme bacille à MulDi ont pu être identifiées : une pour les genres *Simonsiella* et *Alysiella* et une autre pour le genre *Conchiformibius* (Figure 10). Plusieurs gènes ont été identifiés comme présents chez les MulDi et absents chez les formes bacilles, dont *amiC2* et *cdsA*, deux gènes formant un locus qui serait impliqué dans le développement de la multicellularité (Lehner et al. 2011). D'autres gènes comme *mraZ* ou *mreB* ont aussi été identifiés comme des acteurs pour la morphologie MulDi, mais de nombreux éléments restent à déterminer quant à leurs rôles précis.

Les individus de la famille des *Neisseriaceae* sont principalement localisés au niveau des voies de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures et peuvent être retrouvés chez plusieurs espèces. Les genres *Alysiella* et *Simonsiella* par exemple sont présents dans la cavité buccale de nombreux mammifères comme l'Humain ou le singe (Kuhn 1981). Lorsque l'on s'intéresse aux individus colonisant l'Humain, la plupart des espèces localisent au niveau de la cavité buccale et du nasopharynx avec pour exception *Neisseria gonorrhoeae* dans les voies urogénitales. On recense seulement deux espèces caractérisées comme pathogènes dans le genre *Neisseria* : *Neisseria gonorrhoeae* l'agent de la gonorrhée et *Neisseria meningitidis* induisant des méningites bactériennes. *Neisseria gonorrhoeae* a une forte prévalence d'infection avec un faible taux de mortalité, là où *Neisseria meningitidis* a une faible prévalence pour un risque de mortalité élevé. Il a déjà été recensés des infections par les bactéries dites commensales, comme des

conjonctivites causées par *Moraxella lacunata* ou des infections de plaies avec *Eikenella corrodens* (Morse 1996).

II. Le genre des *Neisseria*

a. Tropisme des *Neisseria*

Le nasopharynx est la partie supérieure du pharynx et permet la connexion entre l'oropharynx et les cavités nasales (Mankowski et Bordoni 2021). Le nasopharynx est recouvert à 60% d'un épithélium stratifié squameux qui crée une barrière physique importante pour le système immunitaire (Coureuil et al. 2019). Le nasopharynx étant un point d'entrée stratégique pour les pathologies respiratoires, il joue un rôle important dans l'immunité de l'hôte contre le non-soi (Flynn et Dooley 2021). En effet, il possède son propre microbiome qui permet entre autres le maintien de l'homéostasie immunitaire et la protection contre les espèces pathogènes de passage dans la cavité (Novak et al. 2008). Le microbiome nasopharyngé est composé d'espèces

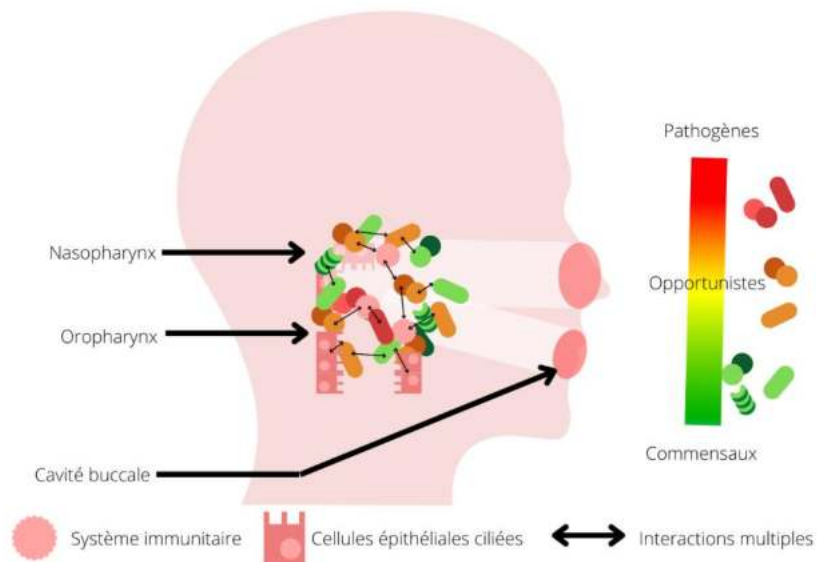


Figure 11 : Le nasopharynx, un carrefour d'entrée dans l'organisme. Le nasopharynx est un point stratégique pour le système immunitaire, car c'est l'entrée de nombreuses espèces pathogènes. Il possède une flore très riche composée d'individus commensaux, mais aussi de pathogènes opportunistes, c'est-à-dire des bactéries qui profitent d'un déficit immunitaire pour induire des infections.

commensales, mais aussi des pathogènes souvent « opportunistes » (pouvant induire des

infections chez des patients immunodéprimés (**Figure 11**)). Chez l'adulte, les genres les plus retrouvés dans le microbiome nasopharyngé sont : *Moraxella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Alloprevotella* ou *Haemophilus* en ordre d'abondance (De Boeck et al. 2017).

Même si le genre *Neisseria* n'est pas le plus prédominant dans ce microbiome, celui-ci est activement étudié, car une espèce pathogène importante du genre est retrouvée en portage sain dans le nasopharynx, *Neisseria meningitidis* (Hollingshead et Tang 2019). Celle-ci peut perdurer plusieurs mois dans le nasopharynx (Glitza et al. 2008). Au total, trente espèces de *Neisseria* ont été reportées. Ce genre occupe une place à part entière dans le microbiome du nasopharynx. En effet les *Neisseria* sont systématiquement retrouvés dans un microbiome sain (Zaura et al. 2009), quelle que soit la distribution géographique des individus (Nasidze et al. 2009). De plus, on retrouve au sein de la flore nasopharyngée des espèces de *Neisseria* dès la première semaine de vie du nourrisson, avec une proportion grandissante jusqu'à 15-20 ans qui décline ensuite en vieillissant (Cephas et al. 2011; Gold et al. 1978). Chez les *Neisseria* pathogènes comme *N. meningitidis* d'autres facteurs environnementaux peuvent augmenter le portage, comme la vie dans un environnement exigü, les échanges de salives par baisés et le tabagisme (actif et passif) (J. MacLennan et al. 2006). Si on se focalise sur les membres commensaux des *Neisseria* ils sont tous retrouvés au niveau des muqueuses des mammifères avec un portage spécifique dû à leur coévolution avec l'hôte. On retrouve des espèces de *Neisseria* principalement chez les humains, le singe, le chien, le canard, mais aussi dans certains cas dans des espèces autres que les mammifères comme les insectes (Cantas et al. 2011; H. Wang et al. 2014; G. Liu, Tang, et Exley 2015). Le portage des *Neisseria* commensal se fait principalement au niveau des voies buccales et respiratoires supérieures avec quelques exceptions comme *N. cinerea* qui peut aussi être retrouvées au niveau du col de l'utérus, de l'urètre ou du rectum (Humbert et Christodoulides 2020) et *N. lactamica*, *N. sicca* et *N. flava* qui ont déjà été retrouvées au niveau des voies génitales (Wilkinson 1952; Johnson 1983).

De nombreuses études ont démontré que les membres du genre *Neisseria* interagissaient entre eux au sein du microbiote. Par exemple une étude métagénomique a permis de déterminer la co-colonisation de plusieurs espèces de *Neisseria* dans la cavité buccale avec la colonisation de la surface de la langue par *Neisseria flavescens* et *Neisseria subflava*, ou celle de la plaque gingivale par *Neisseria sicca* et *Neisseria macacae* (Donati et al. 2016; Baerentsen, Tang, et Exley 2022). De même on notera que des phénomènes de co-colonisation par les souches d'une même espèce ont déjà été étudiés (Sáez Nieto, Marcos, et Vindel 1998). Dans certains cas, des cas d'antagonismes sont observés entre les membres du genre *Neisseria*. On parle d'antagonisme

lorsqu'une bactérie réduit la croissance normale ou l'activité d'un agent pathogène. Ce phénomène a été observé en *in vitro*, lors d'une infection simultanée entre *N. cinerea* et *N. meningitidis*. En effet, les lésions de cellules épithéliales pathogènes étaient réduites par la présence de l'espèce commensale, cependant aucun mécanisme d'action précis n'avait été identifié (Custodio et al. 2020). En revanche, trois mécanismes d'antagonismes ont été caractérisés chez *Neisseria spp.* : la production de toxines polymorphiques, la production de molécules antimicrobiennes et la production d'ADN méthylé inhibiteur (Baerentsen, Tang, et Exley 2022).

b. Interactions hôtes pathogènes et mécanisme de virulence

i. Adhésion colonisation et dissémination

Bien qu'interagissant dans des flores différentes chez l'Humain (Le nasopharynx pour *N. meningitidis* et le tractus uro-génital pour *N. gonorrhoeae*), les deux pathogènes possèdent des mécanismes d'infections similaires. En effet, le premier contact avec l'hôte se fait au niveau de l'épithélium de la muqueuse. Ce contact va être médié par des composés se situant à la surface des bactéries qui vont permettre l'adhésion de celle-ci (Quillin et Seifert 2018). Quatre structures sont principalement impliquées dans l'adhésion : les pili de type IV, les protéines Opa, le lipooligosaccharide et la porine PorB (**Figure 12**).

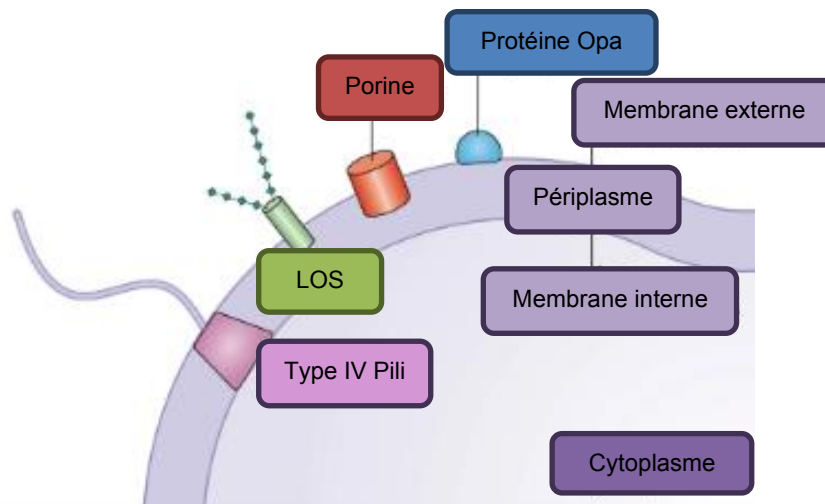


Figure 12 : Récapitulatif des éléments nécessaires aux mécanismes d'adhésions et de colonisation. Les efforts combinés de ces différents éléments de la paroi vont permettre l'internalisation de la bactérie et la poursuite du processus d'infection (« Figure 2: Overview of *Neisseria Gonorrhoeae* Pathogenesis Factors. | Nature Reviews Microbiology » s. d.)

Le pilus de type IV est une structure de la membrane bactérienne qui joue un rôle très important pour l'adhésion, mais aussi dans d'autres fonctions de la bactérie comme la compétence naturelle ou dans les mécanismes d'évasion au système immunitaire de l'hôte. Le pilus va établir le premier contact avec la muqueuse et permettre le rapprochement de la bactérie (Craig, Pique, et Tainer 2004). Lorsque la bactérie sera rapprochée de la membrane plasmique de la cellule épithéliale, les protéines Opa de la bactérie vont pouvoir établir une liaison avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales. Les protéines Opa (Opacity-associated) sont exprimées au niveau de la membrane externe de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* et sont des éléments antigéniques hypervariables. Une souche de *N. gonorrhoeae* peut contenir jusqu'à 12 gènes *Opa* différents, et jusqu'à 4 chez le méningocoque. Cette hypervariabilité est due à la traduction de phase ON/OFF de la protéine résultante en une multitude de combinaisons différentes (Hauck et Meyer 2003). Il existe deux grandes catégories de protéines Opa chez les *Neisseria* :

- Les Opa_{HS} (OPA qui expriment les récepteurs HSPGs), seulement présents chez *N. gonorrhoeae*. Ces protéines ont la propriété de se lier aux cellules épithéliales exprimant les récepteurs protéoglycanes Héparansulphate protéoglycanes (HSPGs).

Les récepteurs HSPGs sont normalement impliqués dans l'attachement cellulaire, la croissance cellulaire et l'organisation du

cytosquelette. Lors de la liaison avec Opa_{HS} avec les récepteurs HSPGs plusieurs cascades cellulaires vont être activées est stimulé l'internalisation de la bactérie, lui permettant d'initier l'invasion (Dehio 1998)

- Les Opa_{CEA} qui sont exprimées chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*. Les protéines Opa_{CEA} se lient aux récepteurs transmembranaires CEACAM (CEA-related cell adhesion molecule) retrouvé principalement sur la membrane des cellules épithéliales, mais aussi chez les phagocytes et des lymphocytes activés (Gu et al. 2010; Tchoupa, Schuhmacher, et Hauck 2014). Ce type de récepteurs ont un rôle essentiel dans la communication avec la barrière épithéliale qui représente le premier obstacle contre les infections. La liaison CEACAM/Opa_{CEA} va inhiber sur le long terme l'activation du système immunitaire et permettait la persistance des *Neisseria* dans la flore nasopharyngée humaine (Gray-Owen et Blumberg 2006; Alcott et al. 2022).

En plus de la liaison entre les récepteurs membranaires et les protéines Opa. Après l'adhésion des *Neisseria* plusieurs facteurs membranaires peuvent affecter la colonisation. Les porines sont retrouvées en abondances sur la membrane externe des *Neisseria*. Ces protéines ont comme principale fonction de créer un passage pour les ions et les nutriments, mais elles permettent aussi de lier deux facteurs du complément : le C4pb et le facteur H. Ces deux éléments sont nécessaires pour l'activation du complément et leurs inactivation induit une suppression de l'activité immunitaire des neutrophile (Wetzler et al. 1992). L'autre protéine qui peut intervenir dans la modulation de la colonisation est le LOS. Le LOS est une molécule structurellement similaire au LPS, avec pour seule différence l'absence d'antigène O (Figure 5). Les variations de la composition lipidique du LOS lui confère des propriétés de liaisons fortes avec les récepteurs de l'immunité qui leur permettent par la suite de se rapprocher étroitement des cellules. Le rapprochement trop étroit de la bactérie va induire des réorganisations de la cellule qui peuvent mener *in fine* à l'internalisation de la bactérie par endocytose (Song et al. 2000). À partir de cette étape, les fragments de LOS et de peptidoglycanes libérée par la bactérie vont induire une activation des cellules du système immunitaire. Les fragments vont être reconnus par les macrophages et les cellules dendritiques à partir de leurs récepteurs membranaires Toll like 3 (TLR3) et par les récepteurs NOD au niveau intracellulaire (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein). L'activation de ces cellules immunitaires va induire une libération de

cytokines et chimiokines très importante qui va permettre le recrutement de leucocytes et de neutrophiles au site d'infection. Ces dernières vont phagocyter les *Neisseria* et seront ensuite des vecteurs pour le pathogène pour sa dissémination dans l'ensemble du tissu (Quillin et Seifert 2018) (Figure 13)

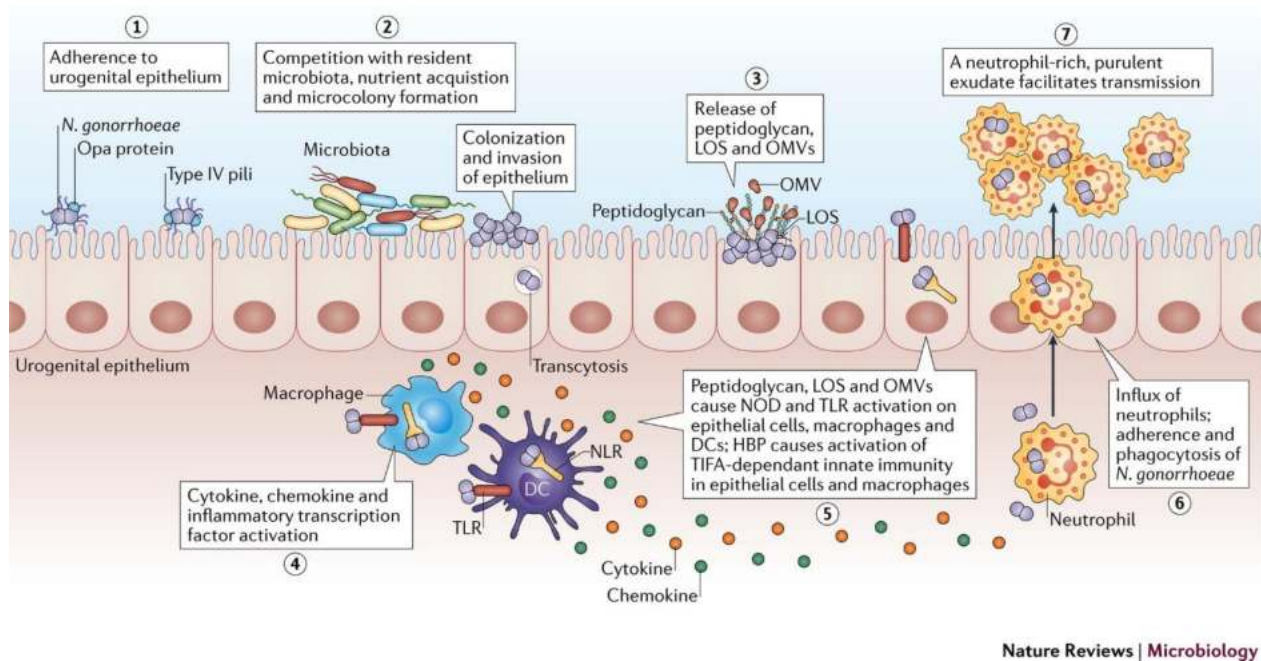


Figure 13 : Infection par *Neisseria*. Exemple avec le pathogène *Neisseria gonorrhoeae*. La bactérie va commencer par adhérer à l'épithélium cellulaire par le biais des pili de type IV et des récepteurs Opa. Les bactéries peuvent ensuite former un mini-biofilm pour permettre de résister aux autres résidents du microbiotes et ensuite coloniser l'épithélium. Par transcytose les *Neisseria* vont traverser l'épithélium est ensuite pouvoir libérer des facteurs de pathogénicités comme les LOS, le peptidoglycane ou les OMVs (des vésicules de membranes externes). Le contact entre les récepteurs cellulaires et ces fragments de bactéries vont induire une activation des cellules immunitaires et une libération de cytokines et de chimiokines dans l'environnement. Cette réponse pro-inflammatoire va induire elle-même le recrutement de leucocytes et de neutrophiles qui vont phagocyter les bactéries et *In fine facilité* leurs transmissions dans l'épithélium (« **Figure 1: Overview of *Neisseria Gonorrhoeae* Infection. | Nature Reviews Microbiology** » s. d.)

c. Santé publique et résistances aux antibiotiques

Chez l'humain deux espèces ont été définies comme pathogènes : *Neisseria gonorrhoeae* et *N. meningitidis* (Figure 10).

N. gonorrhoeae est un pathogène obligatoire qui colonise les muqueuses épithéliales de l'urètre chez l'homme et dans l'endo/ectocervix chez la femme. Lorsque symptomatique, la gonorrhée

induit une urétrite très douloureuse chez les hommes et un cervix muco-purulent chez la femme. Cependant, plusieurs études ont reporté de nombreux cas d'infections asymptomatiques autant chez les hommes que chez les femmes, ce qui augmente grandement le potentiel d'infection de la bactérie (GEISLER, YU, et HOOK 2005; Xiong et al. 2016). On a comptabilisé 82,4 millions de nouveaux cas au niveau mondial en 2020, le plaçant au niveau de menace de haut niveau par l'OMS en 2020 (Humbert et Christodoulides 2020; Baerentsen, Tang, et Exley 2022), l'augmentation des cas traduisant l'émergence des nombreuses résistances aux antibiotiques. Pour traiter le pathogène, de nombreux antibiotiques ont été utilisés en commençant par les sulfonamides dans les années 1940. Seulement des résistances ont été acquises pour cet antibiotique, ce qui forcera son remplacement. Une multitude d'antibiotiques se succéderont par la suite avec dans l'ordre : les pénicillines, les streptomycines, les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et les céphalosporines de génération deux aboutissant aux souches multirésistantes qui circulent actuellement (Unemo et Shafer 2014). Le pathogène utilise plusieurs mécanismes pour acquérir une résistance en se basant principalement sur sa capacité à altérer son matériel génétique. Tous les mécanismes de résistances aux antibiotiques connus à ce jour sont présents chez *N. gonorrhoeae* (**Figure 14**) :

- L'inactivation ou la modification de l'antibiotique par une enzyme peut être illustrée par l'exemple de la pénicilline : l'enzyme TEM-1 – B-lactamase modifie la conformation de la molécule d'antibiotique, la rendant inactive (Unemo et Shafer 2014).
- La modification de la cible thérapeutique avec pour d'objectif la réduction de l'affinité antimicrobienne. Celle-ci est utilisée dans le cas de la résistance aux polymyxines (colistine) ou une partie du lipooligosaccharide (LOS) bactérien est modifiée (phosphatidylethanolamine transférase EptA), qui empêche *in fine* la fixation de l'antibiotique (Jen et al. 2020).
- La diminution de l'influx d'antibiotique induite par la mutation de la chaîne membranaire de porine PorB1b (*penB*) est un mécanisme utilisé dans la résistance contre la famille des tétracyclines et des céphalosporines (Unemo et Shafer 2014).
- L'augmentation de l'efflux d'antibiotique régulé par le système d'efflux MtrCDE (mutation du gène *mtrR*) est fortement impliqué dans la résistance contre les macrolides (Chitsaz et al. 2019).

Neisseria gonorrhoeae est maintenant classé comme un pathogène *superbug*, c'est-à-dire qu'il est résistant à la plupart des antibiotiques normalement utilisés pour leurs traitements (Unemo et Shafer 2014). Ceci en plus du fait que aucune formulation spécifique de vaccin efficace n'a pour le moment été trouvée. On notera cependant que le vaccin contre le meningocoque B aurait été prouvé efficace comme protection contre *Neisseria gonorrhoeae* (« Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study » s. d.)

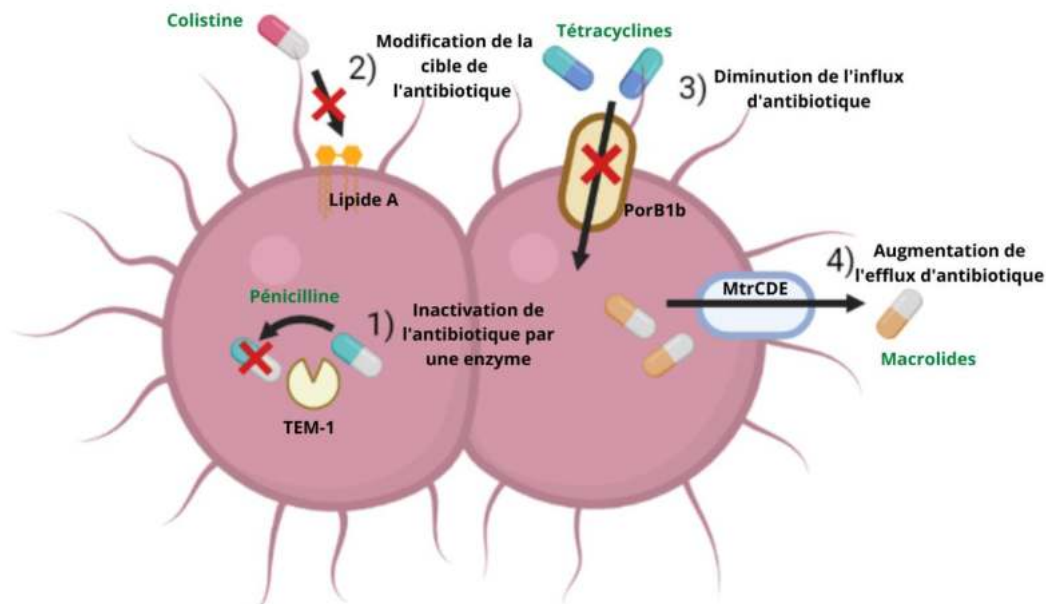


Figure 14 : Les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques retrouvés chez *N. gonorrhoeae*. Les 4 mécanismes principaux de résistances aux antibiotiques sont retrouvés dans l'espèce *N. gonorrhoeae* en faisant un pathogène multirésistant et donc difficile à traiter. (Eichenberger et Thaden 2019)

N. meningitidis est un commensal du microbiote nasopharyngé humain. Il peut cependant devenir invasif et causer une septicémie qui peut aboutir en méningite cérébrospinale. Les symptômes de la méningite cérébrospinale sont causés par une multiplication bactérienne au niveau des compartiments intravasculaires et intracrâniens induisant une inflammation chez l'hôte. Les taux d'incidences de la pathologie sont variables entre 0,5 à 10 cas / 100 000 personnes / année en sachant que le taux est beaucoup plus élevé dans les zones endémiques comme le continent Africain, pouvant augmenter jusqu'à 1000 cas / 100 000 personnes / année (Humbert et Christodoulides 2020). Il est important de savoir que *N. meningitidis* est encapsulé à

contrario de *N. gonorrhoeae*. La variation des antigènes présent sur la capsule polysaccharidique permet de déterminer les différents sérogroupes qui sont actuellement au nombre de treize. Les sérogroupes induisant le plus des infections sont les souches de type A, B, C, Y et W (Yazdankhah et Caugant 2004) (Figure 15). Le mode de transmission de la bactérie se fait par échange de microgouttelettes respiratoire lors de contacts rapprochés. (Coureuil et al. 2019) On notera que l'infection par le méningocoque n'est pas synonyme de la mise en place de la pathologie. Des paramètres comme la virulence de la souche ou la déficience du système immunitaire peuvent être la cause d'une invasion par *N. meningitidis* (J. M. MacLennan et al. 2021).

Pour ce qui est du traitement de la méningite bactérienne, la prise en charge rapide du patient est capitale pour éviter la septicémie. Le premier traitement à avoir été utilisé a été les sulfonamides dans les années 1940, mais comme pour *N. gonorrhoeae* l'émergence de souches résistantes à forcer une modification de la prise en charge (van Deuren, Brandtzaeg, et van der Meer 2000). D'autres traitements comme la pénicilline ou les chloramphénicol se sont succédés et sont toujours utilisés bien que très surveillés à cause de l'apparition de nouvelles résistances ces dernières années (Zouheir, Atany, et Boudebouch 2019). Le traitement actuel utilisé est la prise de céphalosporines de 3^{ème} génération comme le ceftriaxone ou le céfotaxime pour lesquelles peu de souches résistantes ont encore été recensées (van Deuren, Brandtzaeg, et van der Meer 2000; Zouheir, Atany, et Boudebouch 2019).

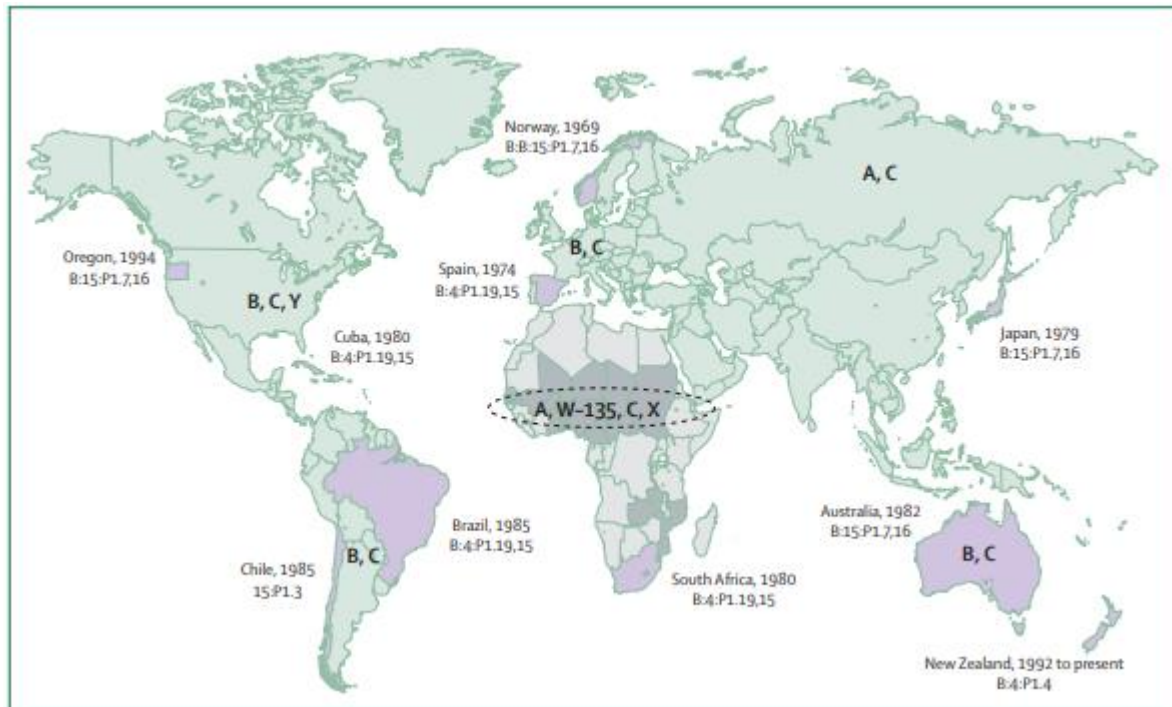


Figure 15 : Distribution mondiale des sérogroupes de *N. meningitidis* majeurs et des principales épidémies du sérogruppe B (En violet). La ceinture de la méningite située au niveau de l’Afrique sub-saharienne est représentée par des pointillées. (Stephens, Greenwood, et Brandtzaeg 2007)

Comparer à *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* ne nécessite pas l’utilisation de traitement de dernier recours, la multi-résistante et beaucoup plus rare et bien que des souches résistantes existent il existe encore de nombreux traitements efficaces contre le pathogène. La différence entre les deux souches peut s’expliquer par une meilleure utilisation des antibiotiques de *N. meningitidis* à cause de son taux de mortalité très rapide et de la nécessité de prendre en charge les patients rapidement permettant de leur administrer les soins adaptés (Humbert et Christodoulides 2020).

Il est intéressant de savoir que des vaccins contre les sérogroupes A, C, W135 et Y de *Neisseria meningitidis* existent, mais ne sont pas efficaces contre les souches de sérogruppe B. En effet le vaccin A,C, W135, Y se base sur la composition polysaccharidique de la capsule permettant d’induire une réaction immunitaire et donc l’immunité lors du prochain contact. Or, les propriétés faiblement immunogènes de la capsule du sérogruppe B empêchent d’utiliser ce même procédé (Vogel et Claus 2011). Pour le sérogruppe B, les protéines des vésicules de la membrane externe (OMV) sont utilisées. En effet OMVs sont relarguées de manière spontanée par les bactéries Gram – lors de leurs croissances, ce qui en fait une cible parfaite pour l’immunité. Il est cependant bon de noter que les vaccins contre le sérogruppe B sont spécifiques du sous-sérogruppe visé

seulement, et qu'il n'existe, pour le moment pas de vaccin protégeant contre l'ensemble des sous-sérogroupe B (Crum-Cianflone et Sullivan 2016).

Les *Neisseria commensales* peuvent elles aussi induire des pathologies dans certaines conditions. En effet, des infections et des septicémies ont déjà été recensées de nombreuses fois chez des individus immunodéprimés. On peut retrouver 13 espèces de *Neisseria* commensales ayant induit une infection chez l'*Humain*, dont 7 espèces spécifiques de l'humain (**Tableau 2**). On constate donc que ce phénomène, bien que non systématique, est loin d'être anecdotique et que la caractérisation du comportement de ces espèces pourrait être la clé dans la compréhension de la colonisation du nasopharynx par les espèces pathogènes. Il est important de noter que les espèces commensales induisant des infections (*Neisseria lactamica* et *Neisseria cinerea* principalement) sont les plus proches des pathogènes phylogénétiquement (Figure 10). En plus de leur relation phylogénétique proche, on retrouve des facteurs de virulences communs entre *N. meningitidis* et *N. cinerea* actif comme protéine de liaison au facteur H, un antigène retrouvé dans presque toutes les souches de *N. meningitidis* induisant une infection (Lavender, Poncin, et Tang 2017). La limite entre les individus pathogènes et les commensaux est à nuancer, car de nombreux éléments appuient sur la nécessité de conditions extérieures spécifiques pour induire des infections comme par exemple la mise en place de co-infection.

De nombreuses *Neisseria* commensales ont été étudiées dans un contexte de résistance aux antibiotiques. Selon les souches étudiées et leurs localisations les profils de résistance peuvent être différents (Tableau 3).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des infections attribuées aux espèces de *Neisseria* commensales (adapté de l'article Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus par Guangyu Liu et al).

Espèces	Cas reportés	Référence
<i>N. elongata</i>	Ostéomyélite : Homme en bonne santé, cas reporté 10 mois après l'incision d'un abcès au niveau du palais.	Garner & Briant (1986)
	Endocardite: Homme en bonne santé de 54 ans, 4 mois après un traitement dentaire.	Haddow et al. (2003)
	Endocardite and septicemie: Homme de 30 ans, avec des antécédents de cardiomyopathies obstructives hypertrophiques, traité avec du verapamil	Hofstad et al. (1998)
<i>N. subflava</i>	Méningite et septicémie : 5 cas chez des enfants	Lewin & Hughes (1966)
	Bactéricémie : Femme de 61 ans, 12 ans après une transplantation rénale.	Ramos et al. (1998)
	Co-infection avec H.pylori dans la formation de follicules lymphoïdes dans l'estomac : cas multiples	Nakamura et al. (2006)
	Endocardite : Femme de 49 ans, 1 an après la mise en place d'une prothèse de valve mitrale	Molina et al. (2000)
<i>N. flavescens</i>	Endocardite : Femme de 82 ans avec un diabète de type II, de la sclérose aortique et de l'hypertension	Sinave & Ratzan (1987)
	Septicémie : Femme de 20 ans, 7 jours après une opération dentaire	Wertlake & Williams (1968)
	Pneumonie nécrosée : Homme de 58 ans avec un diabète de type II, de l'hypertension et fumeur pendant 40 ans.	Huang et al. (2014)
<i>N. mucosa</i>	Méningite : Femme de 33 ans, après la dérive d'un implant ventriculo-péritonéal	Stotka et al. (1991)
	Endocardite : 21 cas	Pilmis et al. (2014)
	Botryomycose viscérale : Homme de 20 ans avec une pathologie chronique granulomateuse	Washburn et al. (1985)
	Septicémie : Homme de 71 ans, 1 an après le remplacement des valves aortique et mitral	Locy (1995)
<i>N. sicca</i>	Endocardite : 17 cas principalement liés à des remplacements de valve mitraux.	Sommerstein et al. (2013)
	Méningite : Femme de 44 ans avec une hémorragie intracrâniale.	Carter et al. (2007)
	Conjonctivite : Femme de 79 ans sans aucun historique de chirurgie ou de trauma	Eser et al. (2014)
<i>N. cinerea</i>	Péritonite : Homme de 38 ans avec un diabète de type II, 2 ans après une pathologie rénale au stade terminal.	Taegtmeier et al. (2006)
	Conjonctivite néonatale : nouveau-nés pendant l'accouchement.	Bourbeau et al. (1990)
	Pneumonie nosocomiale : Homme de 25 ans atteint du SIDA	Boyce et al. (1985)
	Endocardite de la valve tricuspide : Homme de 34 ans, utilisateur de drogues intraveineuses	Benet et al. (2003)
	Méningite et septicémie : Homme de 17 ans, trauma faciale et luxation alvéolodentaire	Kirchgesner et al. (1995)
	Rectite : Petit garçon de 8 ans	Dossett et al. (1985)
	Bactéricémie : Homme de 47 ans, avec un septies polymicrobien et une dépendance forte à l'alcool	Southern & Kutscher (1987)
<i>N. lactamica</i>	Septicémie : Homme de 60 ans immunodéprimé	Everts et al. (2010)
	Maladie pulmonaire cavitaires : Homme de 64 ans, 2 ans après une allogreffe de rein.	Zavascki et al. (2006)
	Pneumonie bactérienne : Homme de 42 ans avec un historique de cirrhose et 20 ans	Wang et al. (2006)

Tableau 3 : Les résistances aux antibiotiques chez les *Neisseria* commensales.

	Premier auteur de l'étude	Année de publication	Pays	Résistance aux antibiotiques trouvée
<i>Neisseria cinerea</i>	Knapp et al., 1984	1984	USA	Pénicilline
	Bowler et al., 1994	1994	France/Allemagne	Pénicilline
	Berger and Paepcke, 1962	1962	Germany	Pénicilline
	Kacey A.king et al., 2021	2021	USA	Chlorophénicol, azitromicine, érythromycine
	Kochi et al., 1999	1999	France	Pénicilline
	Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine
<i>Neisseria lactamica</i>	Kacey A.king et al., 2021	2021	USA	Azitromicine érythromicine,
	Saez Nieto et al., 1990	1990	Spain	Pénicilline; céftriaxone
	Takei et al., 2021	2020	Japan	Azithromycine, ampicilline, céfotaxime, tosufloxacin
	Arreaza et al., 2002	2002	Spain	Pénicilline, ciprofloxacine, céftriaxone
	Karch et al., 2015	2015	Germany	Pénicilline
	Shen and Chen, 2020	2019	China	Ciprofloxacine
	Laumen et al., 2022	préprint	Belgique	Céftriaxone, azithromycine, ciprofloxacine
Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine	
<i>Neisseria macacae</i>	Laumen et al., 2021	2020	Belgique	Céftriaxone, azithromycine, ciprofloxacine
	Laumen et al., 2021	2020	Belgique	Céftriaxone, azithromycine
<i>Neisseria mucosa</i>	S'aez Nieto et al., 1998	1998	Spain	Pénicilline
	Kacey A.king et al., 2021	2021	USA	Azitromicine érythromicine, pénicilline
	Dong et al., 2019	2021	Vietnam	Céftriaxone
	Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine
<i>Neisseria oralis</i>	Laumen et al., 2021	2020	Belgium	Céftriaxone, azithromycine
	Laumen et al., 2021	2020	Belgium	Céftriaxone, azithromycine
	Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine
	Dong et al., 2019	2021	Vietnam	Céftriaxone
<i>Neisseria polysaccharea</i>	Saez Nieto et al., 1990	1990	Spain	Pénicilline, céftriaxone
	Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine
<i>Neisseria subflava</i>	Laumen et al., 2021	2020	Belgium	Céftriaxone, azithromycine
	Laumen et al., 2021	2020	Belgique	Céftriaxone, azithromycine
	Chen et al., 2020	2019	China	Ciprofloxacine
	Furuya et al., 2007	2007	Japan	Pénicilline, céftriaxone, ciprofloxacine
	S'aez Nieto et al., 1998	1998	Spain	Pénicilline
	Dong et al., 2019	2021	Vietnam	Céftriaxone
<i>Neisseria elongata</i>	Kacey A.king et al., 2021	2021	USA	Azitromicine, érythromicine, chlorophénicol, gentamycine, pénicilline

De plus, on constate que les souches commensales possèdent de nombreux gènes de résistances dont certains partagés avec les individus pathogènes. Par exemple, de *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. elongata* et *N. lactamica* ont été identifiés comme résistant à l'azithromycine et à la ceftriaxone deux médicaments fortement utilisés pour le traitement de *N. gonorrhoeae*, mais aussi d'autres antibiotiques comme la pénicilline, l'ampicilline et la tétracycline (Mechergui, Achour, et Ben Hassen 2014). On sait que la compétence naturelle des individus de la famille *Neisseria* leurs permet d'acquérir très facilement de l'information génétique et favorise les transferts horizontaux.

III. Spécificités du génome des *Neisseria* : les stratégies induisant de l'hypervariabilité

Le génome du genre *Neisseria* fait en moyenne 2,2Mbp. Il code pour environ 2000 protéines et ont un pourcentage de G+C proche de 50%. On retrouve de nombreux éléments extra-chromosomiques dans plusieurs espèces du genre comme les plasmides, les prophages ou les transposons. On notera tous de même que les plasmides sont rarement reportés chez *N. meningitidis* à comparer des espèces *N. gonorrhoeae* ou *N. lactamica* (Tønjum et van Putten 2017)

Le génome des *Neisseria* a grandement été étudié dans un contexte d'hypervariabilité génétique. Les espèces du genre *Neisseria* sont doté de compétence naturelle. C'est-à-dire la capacité d'une cellule à prélever une molécule d'ADN libre dans son environnement par le phénomène de transformation. Avec ce mécanisme les *Neisseria* peuvent effectuer des transferts horizontaux de manière facilitée par recombinaison homologue. Lorsque des sites de recombinaisons spécifiques sont reconnus, la bactérie va procéder à un échange de gènes permettant l'acquisition de gènes, le plus souvent bénéfique. Des séquences d'ADN hyper spécifique des *Neisseria* favorisent même ce phénomène : les DUS (DNA uptake sequences). Les DUS sont des séquences d'une dizaine de nucléotides, présentes chez les espèces pathogènes et les commensaux. Elles sont grandement répétées dans le génome bactérien ce qui permet l'acquisition préférentielle de gènes provenant des autres espèces de *Neisseria* (**Figure 16**) (Bennett et al. 2014). Il existe plusieurs variants de DUS dans le genre *Neisseria*, souvent spécifique d'espèce. En effet la séquence classique « ATGCCGTCTAA » est retrouvée dans 5 espèces de *Neisseria* dont les deux pathogènes, mais on retrouve aussi des séquences différentes de seulement une ou deux paires de bases chez d'autres individus (Figure 17). Il est intéressant de noter que la présence du DUS non spécifique de l'espèce sur un brin d'ADN réduit les taux de transformations de manière drastique (Berry et al. 2013).

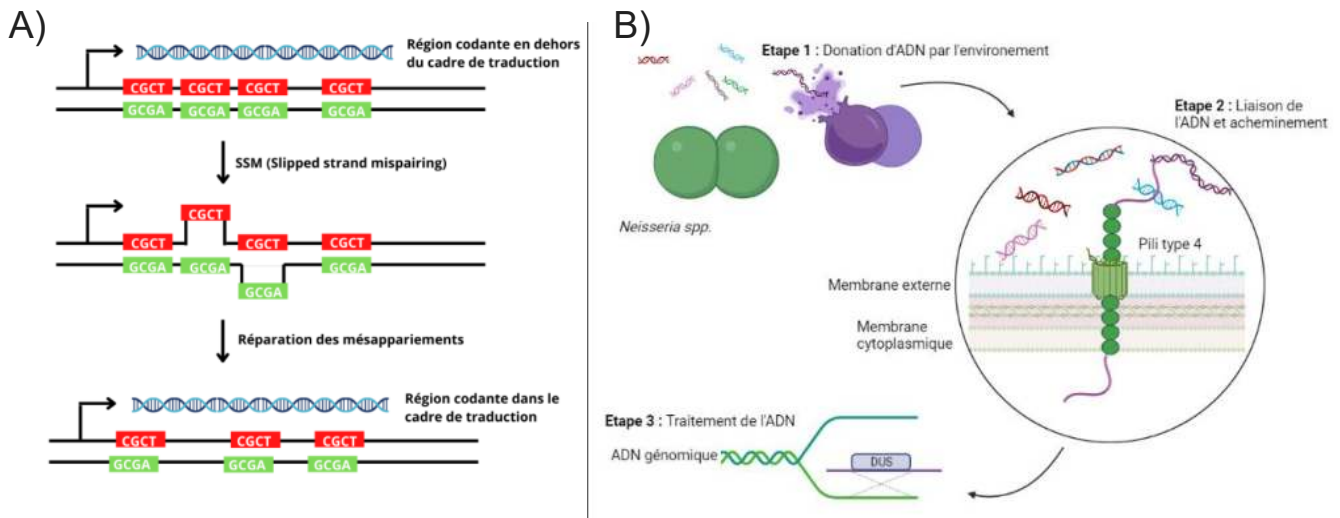


Figure 16 : Représentation schématique des deux mécanismes spécifiques des *Neisseria* induisant une hypervariabilité dans le génome. A) Les Slipped strand mispairing sont des mésappariements nucléotidiques qui vont décaler le cadre de lecture lors de la traduction et induire un changement d'expression des protéines. B) Les séquences DUS sont des séquences hyperspécifiques des *Neisseria* qui vont favoriser la translocation de séquences d'espèces proches bénéfiques (Tønjum et van Putten 2017).

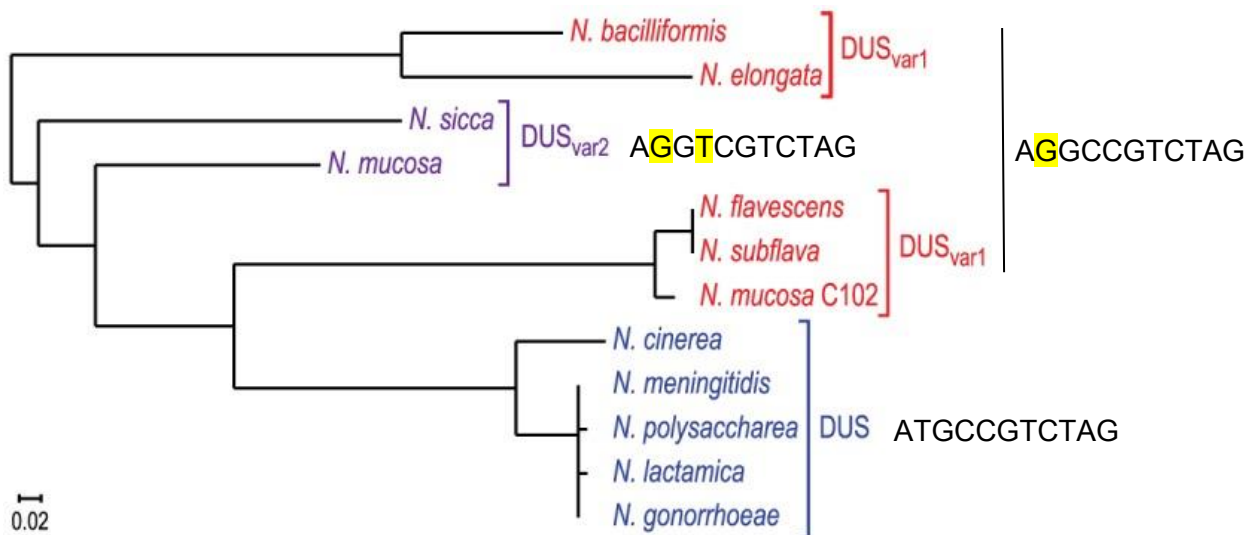


Figure 17 : Les espèces de *Neisseria* humaines possèdent des DUS spécifiques d'espèces. Il existe deux séquences variantes du DUS des *Neisseria* DUS_{var1} et DUS_{var2}. Les variations des séquences DUS sont surlignées en jaune (Berry et al. 2013).

Une autre caractéristique présente chez les *Neisseria* est la variation de phase par gènes switch ON/OFF. En effet, on parle de gènes switch ON/OFF pour décrire les variations d'expression protéique due à des mésappariements nucléotidiques lors de la réplication de l'ADN (Slipped strand mispairing (SSM)). Ces SSM vont induire une augmentation ou une diminution de la présence des courtes séquences répétées, induisant une altération de l'expression génique. **(Figure 16B)** Ce phénomène a été longuement décrit pour le genre *Neisseria* et un peu plus d'une centaine de gènes de variation de phase ont été identifiés au sein du genre (Tønjum et van Putten 2017).

L'ensemble de ces mécanismes permettent le maintien d'une forte variabilité génique chez les *Neisseria* ce qui permet aux pathogènes et aux opportunistes d'échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte (Cahoon et Seifert 2011).

IV. Les différents modèles d'étude de la colonisation pour les *Neisseria* : De l'humain au modèle *in vivo*

a. Modèle d'infections par le genre *Neisseria*

Pour pouvoir étudier le tropisme du genre *Neisseria* et leur processus d'infection, il a été nécessaire de mettre au point des modèles d'études appropriés et représentatifs du microbiote général humain.

Les premiers modèles d'infections avec le genre *Neisseria* ont été mis au point dans le but d'étudier les pathogènes *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*. Des primates comme le chimpanzé ont déjà été étudiés pour des infections urogénitales par la gonorrhée de par la forte similitude de leurs appareils génitaux avec l'Humain. Le lapin et le cochon d'Inde ont souvent été utilisés dans l'étude des deux pathogènes pour leurs capacités à produire du sérum immun et donc pour étudier la réponse immunologique induite par l'infection (Robert J. Arko 1974). De même, des essais sur rat ont été réalisés, mais leur système immun élimine rapidement les *Neisseria*, ce qui limite les essais sur ce type de modèle. De la même manière, les expériences sur hamster ont été abandonnées à cause des difficultés liées à leurs manipulations et des risques de morsures plus fréquents. l'ensemble des avantages et inconvénients pour chaque modèle ont été rassemblés dans le **Tableau 4**. Bien que des essais sur les chimpanzés, les autres animaux cités soient réalisables, l'entretien, la gestion et la mise en place des essais sont assez compliquées et nécessitent souvent un apport onéreux plus considérable (R J Arko 1989). Un modèle grandement utilisé actuellement pour les infections par *Neisseria*, la souris.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différents modèles d'étude des *Neisseria*. (R J Arko 1989)

Modèle animal utilisé	Avantages du modèle	Inconvénients du modèle
Chimpanzé	Modèle très proche de l'Humain (Groupes sanguins, immunoglobine A)	Demande une organisation logistique et économique importante en plus d'un coût éthique
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> perdure longtemps dans les parties urogénitales des chimpanzés (3 à 6 semaines) et transmission sexuelle entre individus possible	Toutes les souches de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ne sont pas virulentes chez le chimpanzé
	Bon pour l'évaluation de la protection vaccinale	
Lapin	Bon pour la production de serum immunisé après une infection	Pas très sensibles aux infections par les <i>Neisseria</i> sans médicament immuno-suppressifs
Cochon d'inde	Bon pour les études immunologiques, car possède un système du complément très actif.	Modèle éloigné de l'humain, peu de lignées consanguines
Rat	Bon modèle pour étudier les effets arthropathiques de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	La composition du sérum empêche une infection efficace par les <i>Neisseria</i> . (Bactéricide)
Souris	Modèle de référence pour les infections par <i>Neisseria meningitidis</i>	Difficultés à faire perdurer les <i>Neisseria</i> dans les différentes flores
	Facile d'entretien et peu onéreux	
	Modèle largement documenté avec de nombreuses techniques d'infections différentes, nombreuses lignées disponibles, immunité très bien caractérisée	
Souris humanisée	Mêmes avantage que les souris non humanisées	
	Possibilité de faire exprimer aux cellules murines des gènes humains. Permet de recréer des conditions similaires à l'Humain.	

La souris possède de nombreux avantages, de par sa taille, son rythme de reproduction et son faible coût à comparer des modèles cités plus haut. Cependant la persistance des souches humaines chez la souris reste compliquée. Il a été testé d'infecter des souris par *N. meningitidis* le pathogène humain, mais la colonisation ne perdure pas plus que 4 à 6 jours dans les souris Balb-c, sans induire une septicémie chez le modèle (Mackinnon et al. 1992). Pour rendre le modèle plus performant, des modèles de souris transgéniques humanisés ont été mis au point. On parle d'humanisation lorsqu'un modèle animal a la capacité d'exprimer un ou plusieurs gènes

provenant de l'humain. Un exemple de modèle murin humanisé pour l'étude de la colonisation par les *Neisseria* est le modèle de souris transgéniques hCEACAM. Ces souris expriment le récepteur humain CEACAM1 qui permet la liaison aux récepteurs Opa_{CEA} présent chez les *Neisseria* pathogènes, mais aussi à certains homologues Opa retrouvées dans les *Neisseria* commensales humaines comme *N. lactamica*, *N. subflava* ou *N. flavescens* (Toleman, Aho, et Virji 2001). Le modèle de référence pour les *Neisseria* pathogènes sont les souris transgéniques FVB/hCEACAM (Johswich et Gray-Owen 2019).

b. Modèles animaux mis en place au sein du laboratoire

Le laboratoire de recherche du professeur Frédéric Veyrier utilise actuellement le modèle FVB/hCEACAM pour étudier le tropisme du genre *Neisseria*. En couplant l'humanisation des souris à une supplémentation en lactoferrine et transferrine humaine (saturés en fer) lors de l'infection à *Neisseria* pathogène. En effet ces deux éléments ont été identifiés comme capitaux pour la survie de ces espèces et leurs persistances dans le microbiote humain (Blanton et al. 1990; Brooks, Arutyunova, et Lemieux 2014). Pour pouvoir étudier l'infection en temps réel, la sélection d'une espèce au pelage blanc été capitale. En effet, le pelage blanc des souris FVB/hCEACAM permet leurs utilisations dans des modèles d'infections par souche luminescentes. La luminescence des souches est observable dans la souris ce qui permet de regarder où les bactéries vont se développer, à quel rythme et combien de temps elles peuvent perdurer. C'est avec l'appareil d'acquisition d'image *in vivo* IVIS (Perkin Elmer) que la luminescence des souches bactériennes peut être observée. (Figure 18)

Grâce à la technique d'acquisition par portage de souches luminescentes, plusieurs modèles d'études ont pu voir le jour :

- Un modèle de septicémie, où les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de *N. meningitidis*, qui provoque ensuite une infection généralisée à cause de sa propagation dans la circulation sanguine.
- Un modèle de portage nasopharyngé, dans lequel les souris vont recevoir une solution bactérienne de *N. meningitidis* au niveau de leurs fosses nasales pour observer les différences entre le portage chez l'Homme et chez la souris au sein du nasopharynx.

- Un modèle de portage commensal murin, où les souris vont être infectées par leurs commensales naturelles *N. musculi* par une inoculation orale. La bactérie étant naturellement présente dans la cavité orale des souris, elle est parfaitement adaptée et permet un portage qui perdurera plus longtemps.

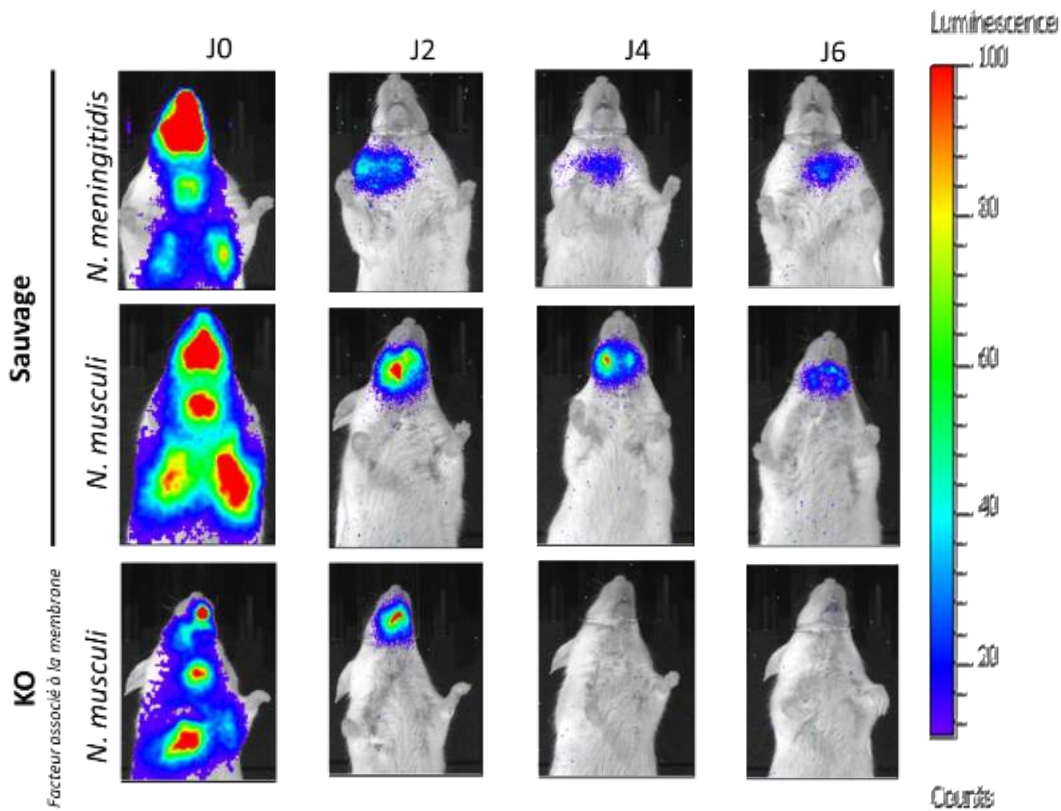


Figure 18 : Modèle FVB pour l'infection des souris par souche luminescente : exemple d'infection par *Neisseria meningitidis* sauvage, *Neisseria musculi* sauvage et *Neisseria musculi* Knock out. Les souris ont été infectées par les différentes souches de *Neisseria* exprimant la luciférase et sont le substrat. La luminescence permet de localiser l'infection et de suivre l'évolution de la colonisation. Images réalisées à partir de l'appareil d'acquisition IVIS lumina III. (Figure du laboratoire non publiée)

Le laboratoire développe aussi un modèle d'induction de septicémie par *N. meningitis* qui s'appuie sur une infection par le virus H1N1 murin. En plus des injections de transferrine, la souris va être inoculée 7 jours avant l'infection par *N. meningitis* avec le virus H1N1, ce processus favorise l'attachement du méningocoque lors de l'infection et lui permettra de se développer au point de créer des septicémies. Le développement de l'infection peut être suivi sur 24 à 48h et les animaux doivent ensuite être euthanasiés. De la même manière que pour le modèle d'infection de base, l'utilisation de souches luminescentes couplée à l'acquisition par l'appareil IVIS permettent le suivi de l'infection et son développement au cours du temps.

c. Modèles pour le suivi de la colonisation des *Neisseria*

Malgré les nombreux essais réalisés avec les infections par pathogènes, il est difficile de pouvoir observer la colonisation de ces espèces humaines sur le long terme dans les modèles murins. Cependant une espèce du genre *Neisseria* est spécifique à la souris : *Neisseria musculi*. Cette bactérie commensale, présente chez la souris sauvage, est facilement cultivable et modifiable. Des modèles d'études avec infection de souris CAST/EiJ (CAST) ou Balb-C par *N. musculi* ont permis d'observer l'invasion d'une souche de *Neisseria* chez la souris. Ce type d'essais permettent une observation de la colonisation sur le long terme pouvant perdurer jusqu'à 1 mois après l'inoculation, ce qui en fait un modèle parfait pour tester le rôle spécifique de certaines protéines ou tout simplement les dynamiques d'adaptation de l'espèce à son environnement (Ma et al. 2018; Rhodes, Ma, et So 2019).

V. Objectifs du projet de recherche

Mon projet de recherche avait pour objectif d'étudier le tropisme des bactéries commensales du genre *Neisseria* sur un modèle murin. Le but était de pouvoir observer la localisation de la population bactérienne, mais aussi son évolution dans le temps afin de mieux comprendre les phénomènes de colonisations au travers d'un modèle animal.

Pour permettre la visualisation de souches de *Neisseria* commensales dans le modèle *in vivo* du laboratoire et l'optimisation des paramètres deux axes de recherches ont été explorés

- (i) La réalisation de souches luminescentes de trois souches commensales *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*.

- (ii) La mise en place d'une nouvelle colonie de souris avec le changement de leur fond génétique pour améliorer le bien-être animal et les conditions de manipulations.

In fine le nouveau modèle aurait pu être utilisé pour induire des infections, mais par manque de temps, les essais n'ont pas pu être réalisés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Élaboration des souches lumineuses

a. Souches bactériennes et conditions de cultures

Dans le but de réaliser des clonages, la souche *E. coli* DH5 α a été utilisée comme souche de clonage pour les constructions plasmiques. La souche a été cultivée à 37°C sur milieu Luria-Bertani « LB » (Difco) supplémenté en ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lorsque le plasmide pJET été utilisé ou en kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et érythromycine (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour les différents clonages réalisés. De même l'ensemble des souches de *Neisseria* ont été mises en culture à 37°C avec 5% de CO₂ sur un milieu gonococcal « GCB » Agar (Oxoid) enrichis en supplément Kellogg décrit dans la littérature (Kellogg et al. 1963). Lors que nécessaire de la kanamycine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou de l'érythromycine (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont pu être ajoutées au GCB Agar.

L'ensemble des souches utilisées dans cette étude on était répertorié dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des souche utilisées, pour les expériences de clonage et d'infection dans les *Neisseriaceae*.

	Numéro de souche	Fournisseur
<i>Neisseria cinerea</i>	DSM 4630	Leibniz-Institut DSMZ GmbH
<i>Neisseria polysaccharea</i>	CCUG 18030T	Culture Collection University of Gothenburg
<i>Neisseria polysaccharea</i>	DSM 22809	Leibniz-Institut DSMZ GmbH
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23970	American Type Culture collection
<i>Neisseria musculi</i>	DSMZ 101846	Leibniz-Institut DSMZ GmbH
<i>Simonsiella muerelli</i>	ATCC 29453	American Type Culture collection
<i>Neisseria meningitidis</i>	LNP24198	CNRM (Centre National de Références des Méningocoques de l'Institut Pasteur)
<i>Neisseria meningitidis</i>	LNP20553	CNRM (Centre National de Références des Méningocoques de l'Institut Pasteur)

b. Construction des plasmides avec la méthode d'intégration des régions homologues *Neisseria* spécifiques

1. Constructions avec uniquement le gène de résistance

En se basant sur la compétence naturelle des *Neisseria*, des régions de 500 à 600 pb (Région 5' et 3') ont été générées de manière à être localisées de chaque côté de la région d'intérêt sélectionnée pour insérer le gène. Ces régions 5'3' ont été créés par « overlap-extension PCR », les couples d'amorces LactaEcoRV et LactaBglII ont étaient utilisés pour la construction des

régions spécifiques de la souche *Neisseria lactamica*, et de la même manière les couples d'amorces : PolyScal et PolyBgIII, CineSmal et CineBgIII ont été utilisées pour la création des régions spécifiques de *Neisseria polysacchareae* et *Neisseria cinerhea* respectivement (Annexe 1). Ceci a permis d'insérer un site de restriction EcoRI au site de chevauchement des deux box. L'insert a ensuite été cloné dans le plasmide commercial pJET à partir de la trousse fourni (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit) (**Figure 19**), permettant la création d'une base fonctionnelle pour les constructions suivantes. La cassette de résistance à la kanamycine *aphA3* ou la cassette de résistance à l'érythromycine *emr3* ont été inséré au niveau du site de restriction EcoRI par méthode de ligation-restriction standard permettant la génération des plasmides pJET5'3' Lacta :: km, pJET 5'3'Cine :: km, pJET 5'3'Poly :: km et pJET5'3'Lacta :: ery, pJET5'3'Cine :: ery, pJET5'3'Poly :: ery (**Figure 19**).

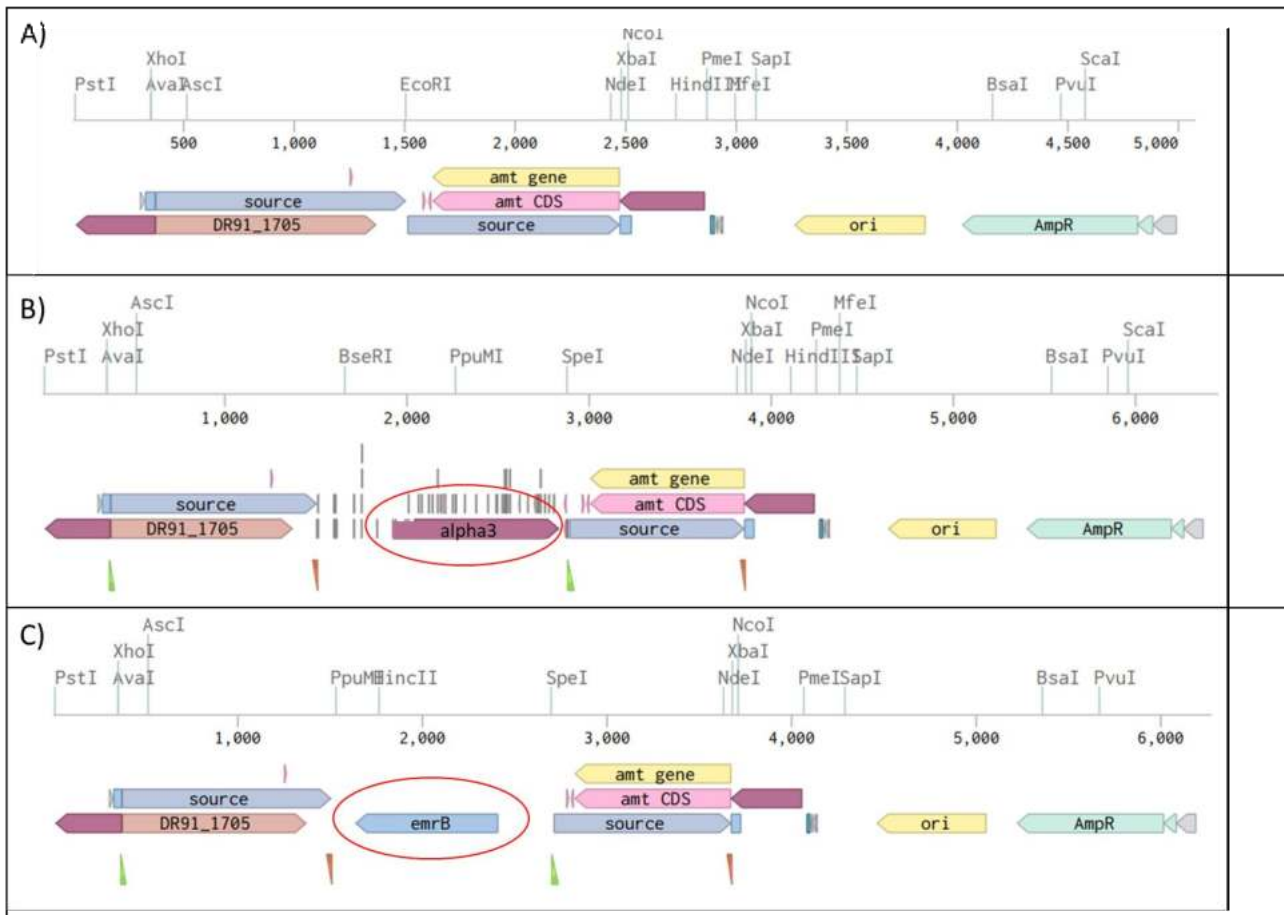


Figure 19 : Plasmides pour l'insertion d'un gène de résistance : exemple de *N. lactamica* Carte linéaire de A) pJET5'3' Lacta (5077 pb), B) pJET5'3' Lacta :: km (6457 pb) et C) pJET5'3'Lacta :: ery (6276

pb) avec les régions 5' 3' spécifiques de *N. lactamica* utilisé pour l'insertion d'un gène de résistance dans la souche. Les cassettes de résistances sont entourées en rouge sur les cartes.

II. Construction avec le gène de résistance et la cassette de luciférase

La cassette du plasmide pCR-porblux a été utilisée pour induire la luminescence dans les constructions. En effet cette cassette composée de l'opéron luxCDABE, extrait de la souche luminescente *N. meningitidis* LNP24198 (Guiddir et al. 2014) et du promoteur *porBp* provenant du génome de *N. meningitidis* pour permettre l'expression de la cassette. La construction a été extraite du plasmide pCR-porblux par les sites de restrictions EcoRI pour ensuite être insérée entre les box 5'3' au niveau de ce même site de restriction (**Figure 20**). Il n'est pas nécessaire d'ajouter une source de luciférine pour l'expression de l'opéron luxCDABE, car la cassette code pour la luciférase et son substrat. La sélection de clones positifs s'est fait par la mesure de luminescence des clones sur gélose avec l'appareil l'IVIS Lumina III (Perkin-Elmer). Pour

permettre une transformation chez *Neisseria* des cassettes kanamycine *aphA3* et érythromycine *emr3* possédant les sites de restrictions NheI et SpeI ont été amplifiés par PCR et insérées au niveau du site de restriction NheI du plasmide pJET5'3': lux pour chaque box 5'3' spécifiques. Ce qui a permis l'obtention des plasmides pJET5'3'Lactalux ::km, pJET5'3'Cinelux ::km, pJET5'3'Polylux ::km, pJET5'3'Lactalux ::ery, pJET5'3'Cinelux ::ery, pJET5'3'Polylux ::ery.(Figure 21).

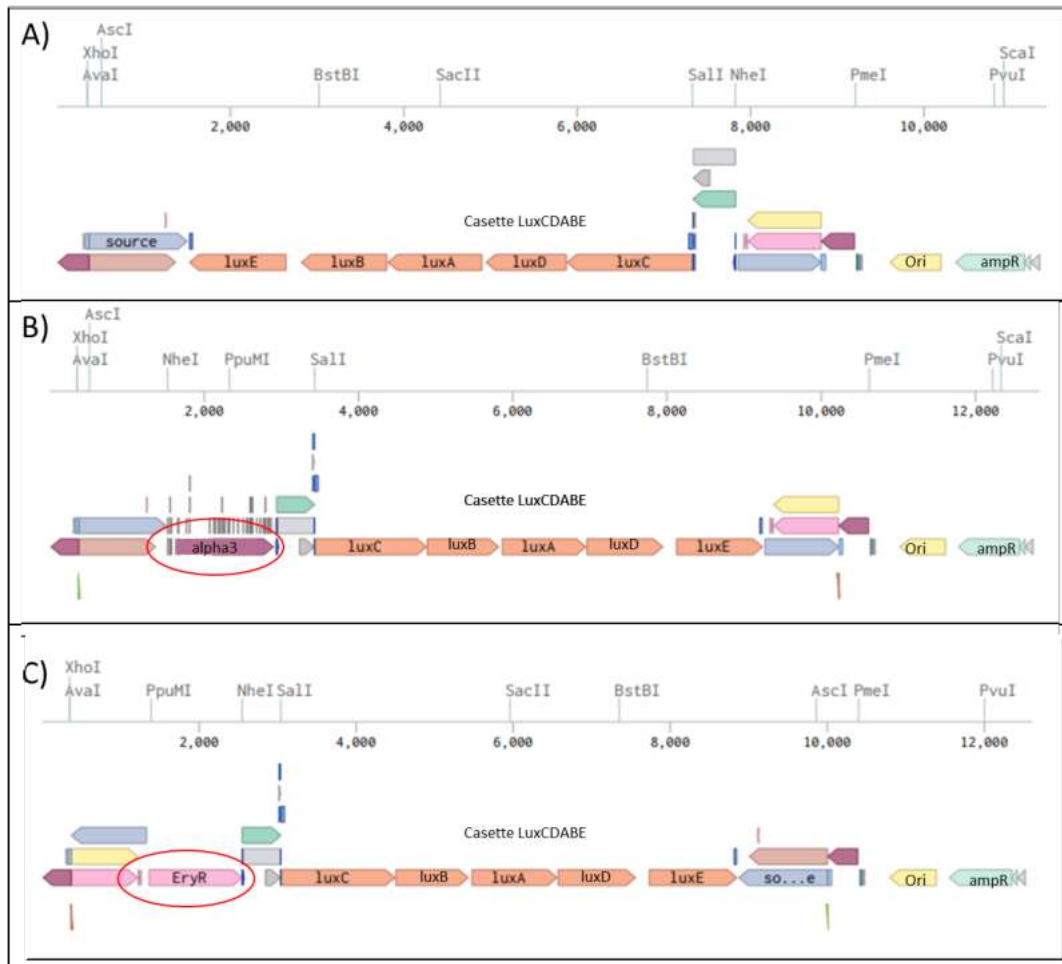


Figure 20 : Plasmides pour l'insertion de la cassette de la luciférase et de son gène de résistance associé : exemple de *N. lactamica* Carte linéaire de A) pJET5'3'Lacta: lux (11420 pb), B) pJET5'3'Lactalux::km (12832 pb) et C) pJET5'3'Lactalux::ery (12610 pb) avec les régions 5' 3' spécifiques de *N. lactamica* utilisé pour l'insertion de la cassette de luciférase dans la souche. Les cassettes de résistances sont entourées en rouge sur

III. Constructions pour les mutants *MreB* (Projet annexe)

La première construction réalisée a été un plasmide contenant une cassette permettant l'expression du gène *MreB* de l'espèce *Simonsiella muelleri* dans la souche de *N. musculi*. Le

plasmide pUCMrebSm-Nmusc::Ery a été désigné avec des régions 5'3' spécifiques de l'espèce *N. musculi* qui cible la région où se situe le gène *MreB*_{N.muscu}. Entre les deux régions, le gène *MreB* de l'espèce *S. muelleri* a été ajouté avec une séquence modifiée permettant l'expression de la GFP, ceci dans le but de pouvoir observer après transformation la localisation de *MreB*_{SimonGFP} par microscopie confocale. Le plasmide a été produit par une entreprise externe (Biobasic). Une version sans GFP du plasmide a aussi été désignée en amplifiant le gène *MreB*_{Simon} à partir de l'ADN génomique de *S. muelleri* et en amplifiant la box 3' du plasmide pUCMrebSm-Nmusc::Ery permettant la création d'un insert *MreB*_{SimonØGFP} pour remplacer *MreB*_{SimonGFP} dans le plasmide pUCMrebSm-Nmusc::Ery par les sites de restrictions NheI et BamHI. On obtenait donc le plasmide pUCMrebSmØGFP-Nmusc::Ery (**Figure 22**).

IV. La stratégie « unmarked luminescente strain » :

Lors de la création de souches commensales luminescentes de *Neisseria*, la création de mutants dits « non marqués » a été envisagée. En effet, cette technique a déjà été utilisée dans le laboratoire pour trois souches de *Neisseria* : *N.musculi*, *N.meningitidis* et *N.elongata*. Pour réaliser ce type de souches, 3 étapes sont nécessaires (**Figure 21**). Dans un premier temps l'allèle génique *rpsI* de la souche *Neisseria* doit être muté pour rétablir la résistance à la streptomycine (*rpsI**). Une seconde délétion est ensuite réalisée par insertion d'une cassette plasmidique RPLK ou RPCC entre les box 5'3' sélectionnées. La cassette RPLK possède un gène de résistance à la kanamycine, le gène de contre sélection *rpsI* et *lacZ* induisant le phénotype bleu des colonies positives. La cassette RPCC elle, possède le gène *mCherry* pour la différenciation phénotypique qui induit une fluorescence chez les bactéries. La réussite de la transformation des bactéries par les plasmides se traduira par une souche streptomycine sensible, kanamycine résistante et exprimant un phénotype de couleur bleue pour RPLK ou de la fluorescence pour RPCC. La dernière étape consiste à transformer la bactérie avec une cassette possédant les mêmes box 5'3' que la précédente qui contient le gène de la luciférase. On obtiendra donc finalement des souches streptomycines résistantes et luminescentes. Cette technique permet le recyclage des résistances antibiotiques et permet une insertion naturelle de la cassette luciférase par recombinaison homologue (Nyongesa, Chenal, et al. 2022).

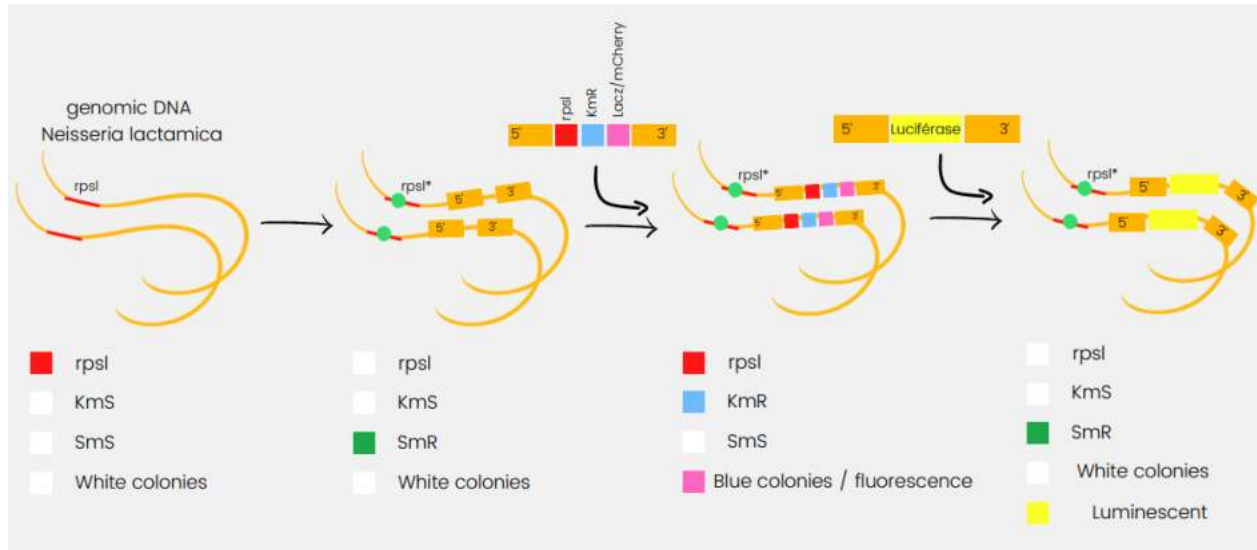


Figure 21 : La création de souches luminescentes par le processus de « unmarked luminescent strain ». La construction se réalise en trois étapes. Dans un premier temps le gène *rpsI* est muté pour induire le facteur de sélection de résistance à la streptomycine. Dans un second temps on introduit une cassette de sélection entre les box 5'3' sélectionnées pour la recombinaison souhaitée. Cette cassette va induire une sélection très spécifique des colonies est aussi une insertion de la cassette de luminescence sans « marquage » du génome. La dernière étape est l'insertion de la cassette possédant la luciférase qui sera elle aussi validée par des facteurs de sélections spécifiques (Nyongesa, Chenal, et al. 2022).

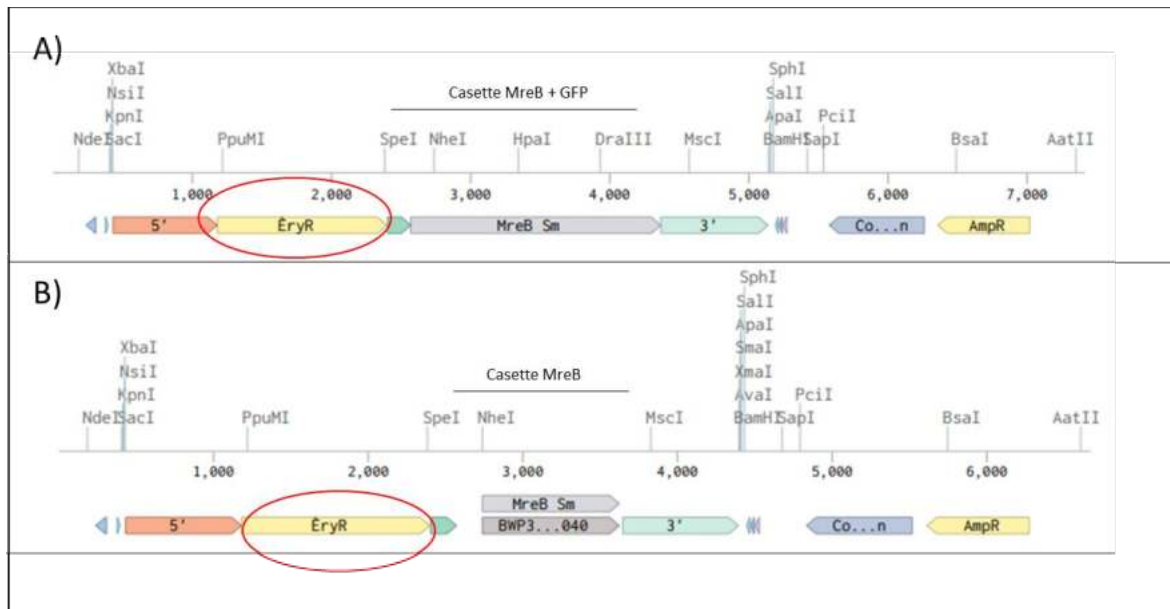


Figure 22 : Plasmides pour l'insertion du gène *MreB* provenant de plusieurs espèces dans *N. muscili*. Carte circulaire de A) pUCMrebSm-Nmusc::Ery (7416pb) , B) pUCMrebSmØGFP-Nmusc::ery (6672pb) avec les régions 5' 3' spécifiques de *N. muscili* utilisé pour l'insertion de la cassette. Les cassettes de résistances sont entourées en rouge sur la carte.

Pour transformer les constructions dans *Neisseria*, les plasmides ont tous d'abord été linéarisés par le site de restriction NheI pour les constructions des souches luminescentes et NdeI pour les constructions des mutants *mreB*, pour augmenter les chances de transformation. Une goutte de 5 µL de plasmide linéarisé (>10µg) a été déposée sur une plate d'Agar GCB MgCl₂ (10 µg/mL) ou des stries de la bactérie avaient été réalisées au préalable. Lorsque la goutte a séché, la géloseensemencée a été incubée à 37°C, avec 5% de CO₂ pour une période d'incubation variable de l'espèce transformée (de 6h à 20h). Les bactéries ont ensuite été prélevées au niveau de l'endroit où la goutte de plasmide a été déposée et ensuite rétamé sur milieu GCB complété en antibiotique (Kanamycine 100µg/mL, ou érythromycine 3µg/mL) (Dillard 2011). Les clones ayant poussé ont été vérifiés par PCR sur l'ADN génomique avec des amorces amplifiant spécifiquement la cassette insérée (Annexe 1).

II. Microscopie confocale

La microscopie confocale est un microscope optique qui peut réaliser des images à partir de plusieurs sections optiques.

Les échantillons ont été préparés de la manière suivante : Les souches *Neisseria musculi* MreBSimonGFP et *Neisseria musculi* sauvage ont été mis en culture 12h avant l'acquisition des images. Les tapis bactériens ont ensuite été complètement récupérés avec un grattoir et étalés de nouveau sur un milieu GCB agarose coulée en très fine couche (Le GCB a été préparé sous forme liquide puis filtré pour enlever l'excédent d'amidon, réduisant le bruit de fond). Après 3h de pousse, de petits carrés d'agarose ont été découpés à l'aide d'un scalpel et déposés dans une boîte dans laquelle il y a une lame, permettant l'observation. L'ensemble de ces étapes ont été réalisées à l'abri de la lumière en maintenant la plaque d'agarose le plus possible à 37°C.

III. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est une technique de microscopie qui utilise un faisceau d'électrons projeté sur l'échantillon pour générer une image très résolutive.

Pour acquérir des images du clone *N. musculi* MreBSimonGFP et MreBSimonØGFP, une demi-ose de bactéries a été re-suspendue dans 50µL d'acide glutaraldéhyde pour la fixation. La suspension bactérienne a été déposée sur une grille de microscopie électronique et le montage a été laissé 10 minutes pour que les bactéries se fixent à la grille. La grille a ensuite été séchée avec du papier absorbant et trempée rapidement dans du PTA (acide phosphotungstique) 2% pour être ensuite séchée de nouveau. Deux grilles par échantillon ont été réalisées, car les grilles sont très fragiles et les bris empêchent une bonne visualisation des échantillons dans le microscope. Les grilles ont ensuite été visualisées par microscopie électronique et des images à plusieurs magnifications (X2000, X5000 et X7000) ont été acquises à plusieurs endroits de la grille pour vérifier si les phénotypes observés ont été homogènes.

IV. Séquençage

Pour vérifier les constructions plasmiques, les plasmides ont été séquencés par méthode Sanger. En utilisant des amorces spécifiques pour séquencer les constructions de cassettes pour les plasmides pJet5'3'Lacta, pJet5'3'Poly, pJet5'3'Cine et aussi les plasmides pUCMrebSm-Mmusc::Ery et pUCMrebSmØGFP-Mmusc::Ery. Les couples d'amorces LactaEcoRV, PolyScal et CineSmaI ont été utilisés pour les plasmides pJet5'3'Lacta, pJet5'3'Poly, pJet5'3'Cine respectivement et les couples d'amorces gfpHairF/MreBSimonNmuscR et MreBSimonNumuscF/3NmuscMreBR pour le plasmide pUCMrebSm-Mmusc::Ery et MreBSimonNumuscF/MreBSimonNmuscR et 3NmuscMreBR pour pUCMrebSmØGFP-Mmusc::Ery. L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel en ligne Benchling.

V. Mise en place de la colonie souris

Toutes les procédures sur animaux ont été approuvées par le comité CIPA (Comité institutionnel de protection des animaux) du LNBE (Laboratoire National de biologie expérimentale)

a. Changement de fond génétique par rétrocroisement

Les souris utilisées pour le changement de fond génétique ont été des souris mâles hCEACAM1 à fond génétique FVB (Gu et al. 2010) et des femelles souris Balb-C sauvages provenant du fournisseur Charles River (6 semaines d'âge). Le changement de fond génétique a été réalisé par une méthode de rétrocroisement ou « *backcrossing* ». Le principe de cette méthode consiste à croiser une lignée dite receveuse (qui possède le gène d'intérêt) et une lignée donneuse (qui possède le fond génétique sélectionné), ceux sur plusieurs générations dans le but de changer le fond

génétique tout en gardant le gène d'intérêt ici, hCEACAM1. (« Le rétrocroisement » s. d.). Comme décrit dans la **Figure 23** l'individu de la lignée receveuse, la souris hétérozygote FVB/hCEACAM va être croisée avec une femelle Balb-C homozygote ce qui permettra en F1 d'obtenir des individus hCEACAM avec un fond génétique à 50% Balb-C et des individus sans gène *hCEACAM* avec un fond génétique à 50% Balb-C dans une proportion 50/50. On sélectionnera ensuite les mâles de la F1 Balb-C/*hCEACAM*_{50%} pour les croiser avec de nouvelles femelles Balb-C et on

obtiendra à la F2 des individus Balb-C/*hCEACAM*_{75%}. À chaque croisement la proportion de fond génétique Balb-C va augmenter jusqu'à ce qu'on obtienne un pourcentage proche de 100% (on arrive à un fond génétique Balb-C de 98,375% après 7 générations, on peut considérer que les souris Balb-C/*hCEACAM* sont quasiment pure) (**Figure 23**).

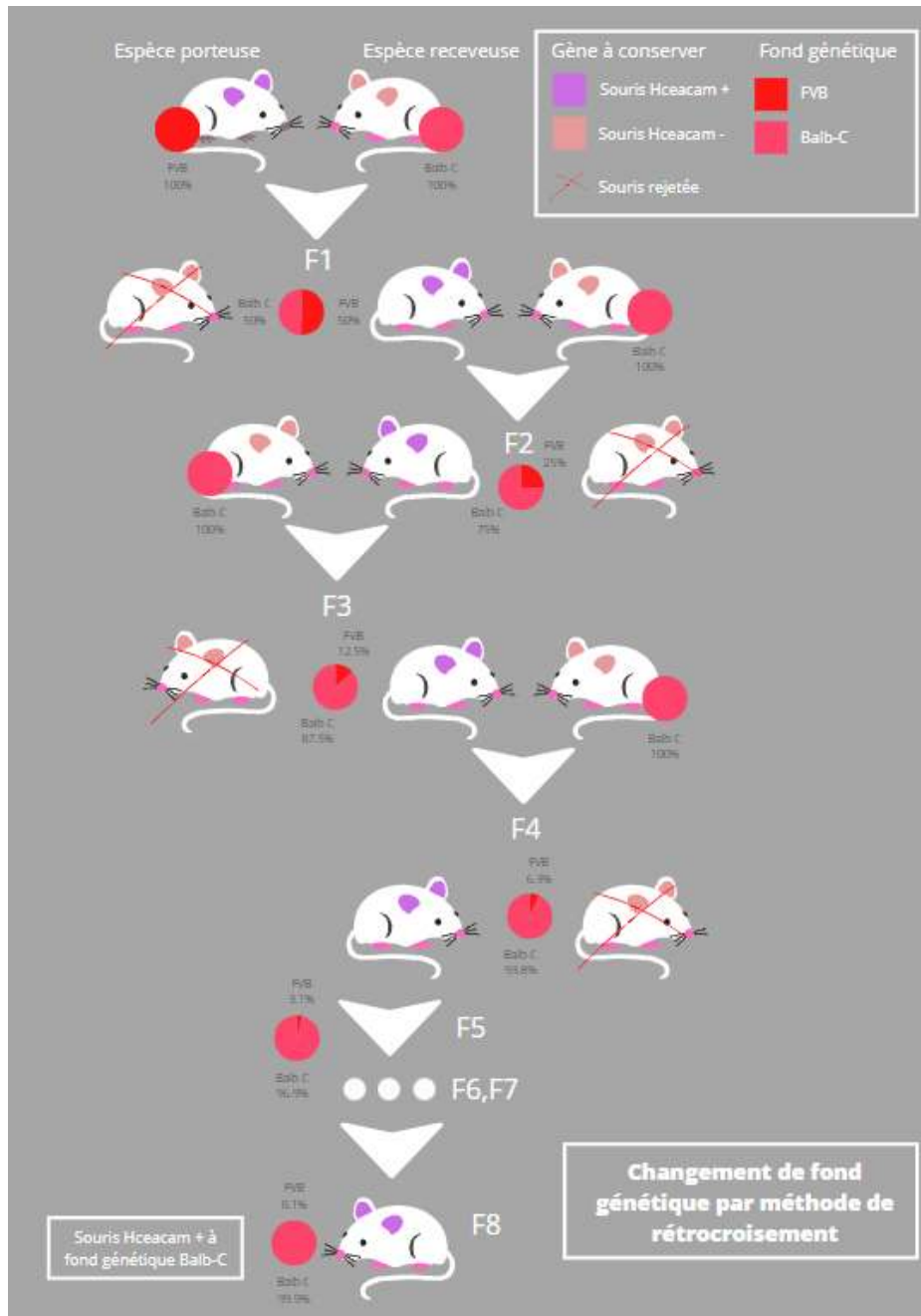


Figure 23 : Méthode de rétrocroisement pour changement de fond génétique utilisé lors de cette étude.

La reproduction des souris permet le changement de fond génétique de FVB à Balb-C. Il est important de conserver uniquement les souris possédant le gène *hCEACAM* pour obtenir des souris Balb-C/*hCEACAM* à la fin du rétrocroisement. La couleur violette est associée au portage du gène humain *hCEACAM*, nécessaire pour le modèle d'infection par *Neisseria*. La couleur rose est associée aux souris qui ne portent pas le gène et qui sont donc retirées du schéma de reproduction. La proportion du fond génétique des souris entre chaque génération est représentée sous la forme de graphiques circulaires par pourcentage de fond génétique. F = génération filiale. (Sul et al. 2013)

Pour sélectionner les souris exprimant le gène *hCEACAM1* à chaque croisement, un génotypage a été nécessaire. Des encoches d'oreilles ont été réalisées sur les souriceaux le jour de leurs sevrages pour permettre l'extraction d'ADN. Les tissus ont été bouillis dans du NaOH (50 nM) pendant 20 minutes et par la suite du Tris-HCl 1M pH 8,0 a été rajouter avant la centrifugation des tubes contenant les échantillons. À partir de la mixture obtenue une PCR par Taq polymérase (Fischer) a été réalisée à partir d'amorces spécifiques (couple Hceacam génotype) qui amplifient une partie de 500 pb du gène CEACAM visualisable sur gel d'agarose (Annexe 1).

c. Infection des souris par *N.meningitidis* pour étudier le changement de fond génétique

Les souris ont été amenées dans le niveau 2 d'expérimentation 5 jours avant l'infection pour leur permettre une acclimatation. Après anesthésie des souris à l'isoflurane, les animaux ont été infectés par inoculation intranasal d'une solution bactérienne supplémentée en lactoferrine, avec 25µL de solution par narine. La solution bactérienne a été préparée au préalable avec du PBS à une densité optique (DO) de 2 pour chaque souche de *Neisseria meningitidis* exprimant LuxCDABE. Une solution de transferrine sera aussi injectée en intrapéritonéal pendant que la souris est encore anesthésiée. La croissance bactérienne a été observée grâce à l'IVIS lumina III sur plusieurs jours. La mesure du signal dans l'IVIS est réalisée avec les souris anesthésiées. La santé des souris a été surveillée tous les jours de l'expérimentation et si la souris a été identifiée comme léthargique, elle a été anesthésiée pour éviter leurs souffrances. À la fin de l'expérimentation, les souris ont été euthanasiées au CO₂, puis leurs vertèbres ont été disloquées pour assurer la mise à mort.

RÉSULTATS :

I. Souches de *Neisseria* commensales luminescentes

C'est en générant dans les régions 5'3' spécifiques que les constructions plasmiques ont commencé. Pour les inserts 5'3' Poly et 5'3' Cine la fabrication à fonctionner du premier coup, en revanche il a fallu réaliser un gradient de PCR pour déterminer la température d'hybridation de l'insert 5'3'Lacta, car la PCR ne fonctionne pas avec le Tm obtenu par simulation (56°C) (**Figure 24**). La PCR gradient a permis l'identification de la température optimale à 59°C, car c'est à cette température que la bande paraissait la plus intense. Cette étape a permis, par la suite, la synthèse de l'insert.

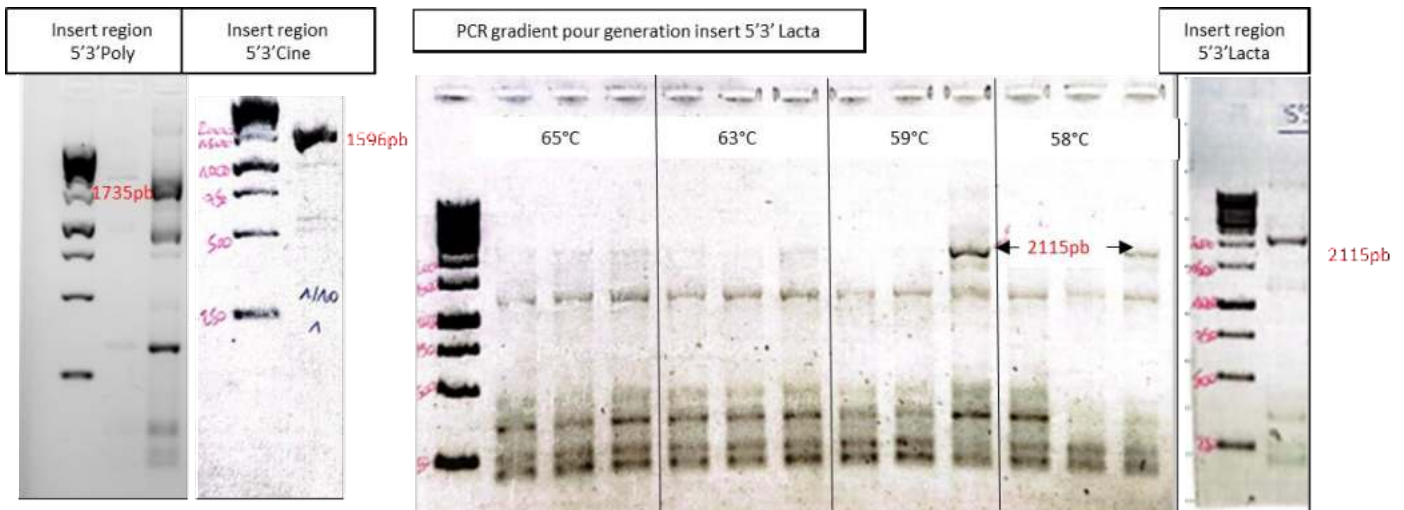


Figure 24 : Produits de PCR pour la création des régions spécifiques 5'3' pour *N.lactamica*, *N.polysaccharaea*, *N. cinerhea*. Les annotations en rouge correspondent à la taille de l'insert pour chaque PCR. Les PCR overlaps ont été réalisées à partir des amorces spécifiques d'espèce permettant l'insertion des sites de restrictions BgIII et EcoRI.

L'insert contenant les régions 5'3' a ensuite été inséré dans le plasmide pJet et vérifié par digestions de vérifications. En plus des vérifications par enzymes de restrictions (Figure 25), les trois plasmides ont été envoyés à séquencer par méthode Sanger pour valider l'insertion de la cassette (Figure 26). Aucune mutation n'a été trouvée sur les alignements, les constructions plasmiques ont donc été validées. Par la suite le gène de la luciférase ainsi que le facteur de sélection ont été ajoutés aux constructions ce qui a permis la réalisation de clones luminescents et résistant à la kanamycine (Figure 27).

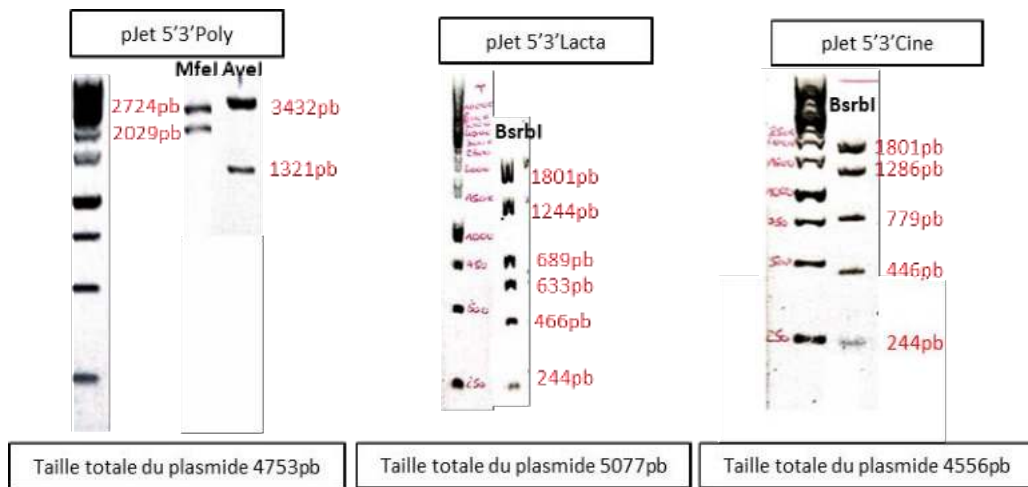


Figure 25 : Digestions, vérifications des plasmides pJET5'3'Poly, pJET5'3'Lacta et pJET5'3'Cine. Le plasmide pJET5'3'Poly a été digéré par les enzymes de restrictions MfeI et AyeI. Les plasmides pJET5'3'Lacta et pJET5'3'Cine ont été vérifiés par l'enzyme de restriction BsrBI.

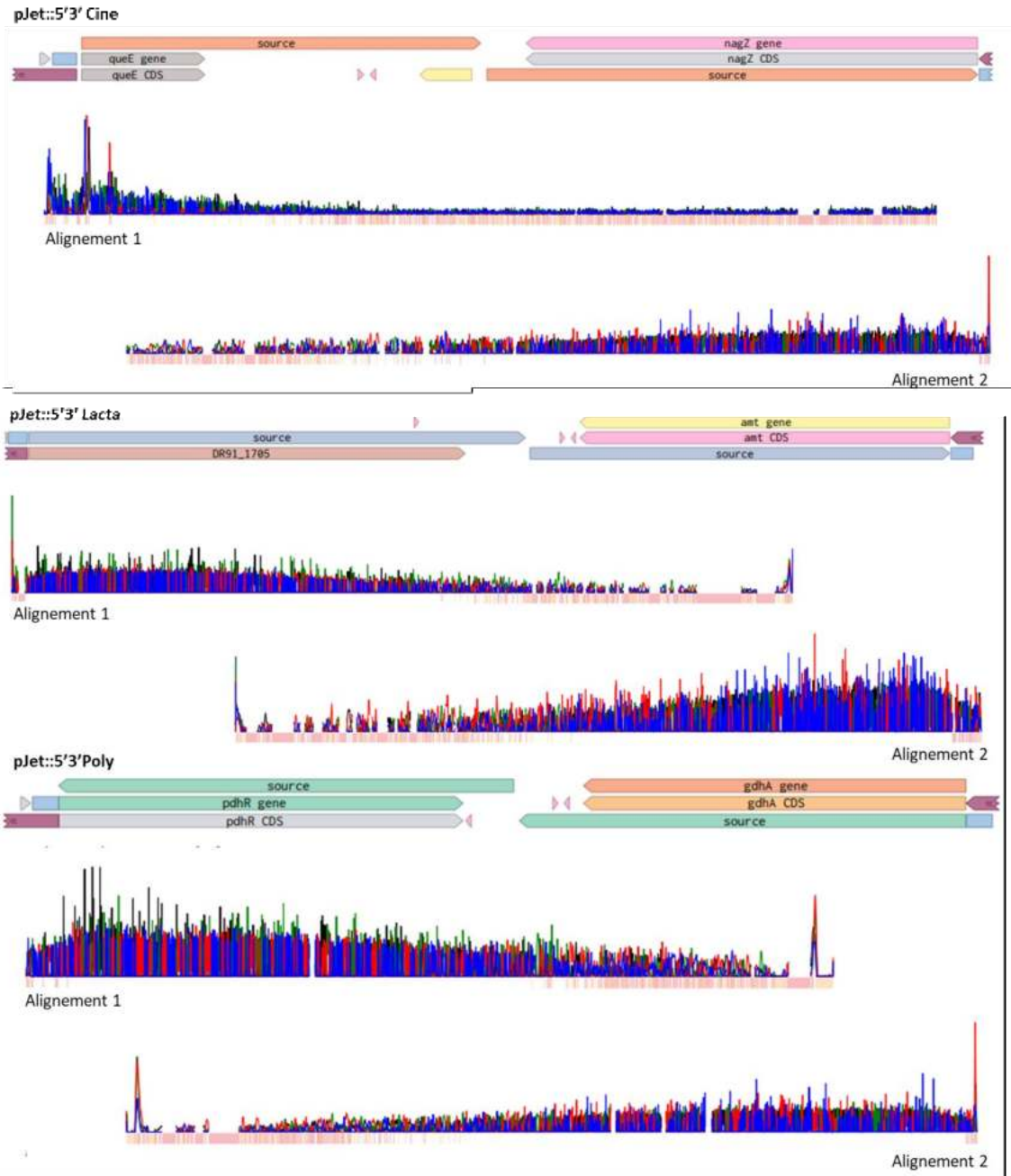


Figure 26 : Résultats de séquençage des plasmides, pJET5'3'Cine, pJET5'3'Lacta et pJET5'3'Poly. Chaque pic sur les alignements correspond à un nucléotide reconnu. Lorsqu'on regarde les alignements, certains pics sont manquants, mais si cette absence n'est pas présente sur le deuxième alignement, alors, on considère qu'il y a une erreur de séquençage. Si on regarde les alignements pour chaque plasmide, on n'observe pas de « gap » présent sur les deux alignements donc les constructions plasmiques sont validées.

Lorsque les constructions ont été finalisées, il a été essayé d'introduire les plasmides pJet5'3'Lactalux ::km dans *N. lactamica*, pJet5'3'Cinelux ::km dans *N. cinerea* et pJet5'3'Polylux ::km dans *N. polysaccharea* respectivement. Mais même après plusieurs essais, la transformation dans chaque souche n'a pas abouti (Absence de souche luminescente sur les plates). Pour déterminer quel était l'élément empêchant la transformation dans nos souches de *Neisseria* nous avons essayé de transférer le gène de résistance de l'érythromycine (*emr3*)

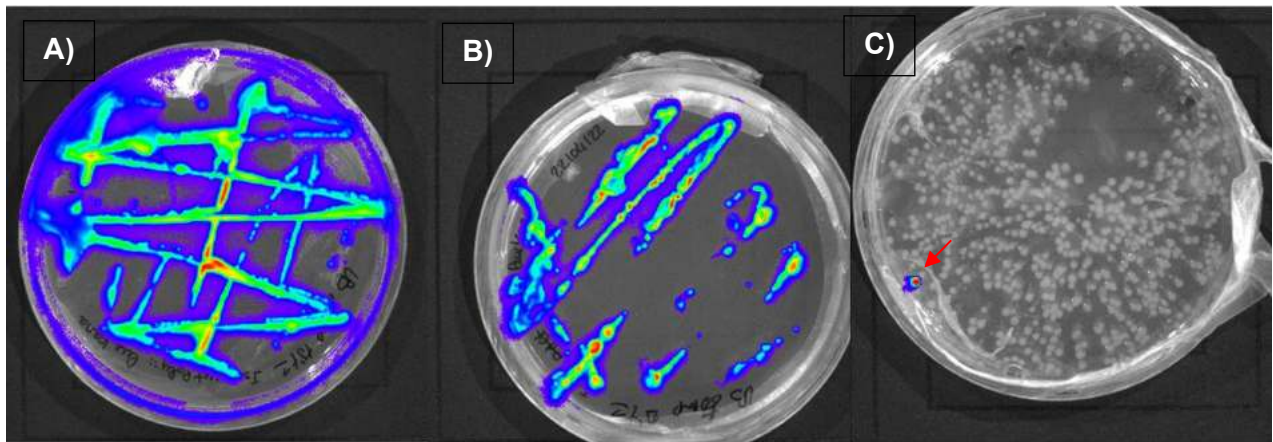


Figure 27 : Obtention des plasmides luminescents kanamycine résistante dans *Escherichia coli* DH5 α . A) pJET5'3'Polylux ::km, B) pJET5'3'Lactalux ::km, C) pJET5'3'Cinelux ::km. Images réalisées à partir de l'appareil d'acquisition IVIS lumina III. La flèche rouge indique la colonie bactérienne luminescente.

dans la région 5'3' (Figure 28). Le but a été de déterminer si le gène de résistance à la kanamycine pouvait être en cause dans l'échec des transformations. Cette fois-ci, seul le gène de résistance à l'érythromycine a été inséré dans les plasmides pJet5'3'Poly et pJet5'3'Cine. Les constructions ont ensuite été transformées dans leurs souches spécifiques : pJet5'3'Poly ::ery dans *N. polysaccharea* et pJet5'3'Cine ::ery dans *N. cinerea*. La transformation des constructions plasmiques a fonctionné (des clones érythromycines résistantes ont été obtenus). Une PCR colony a été réalisée à partir du couple d'amorces PolyScal pour pJet5'3'Poly ::ery et CineSmaI pour pJet5'3'Cine ::ery dans le but de tester les clones. La PCR colony a permis de valider l'insertion du gène de l'érythromycine est ajouté (longueur du gène : 1185 pb).

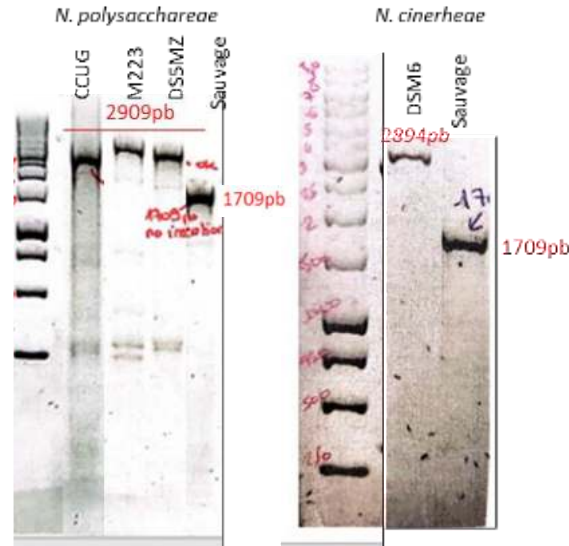


Figure 28 : Résultats de PCR colony pour les transformations de pJet5'3'Poly ::ery dans *N. polysacchareae* et pJet5'3'Cine ::ery dans *N. cinerea*. Une PCR colony a été réalisée à partir du couple d'amorces PolyScal pour pJet5'3'Poly ::ery et CineSmaI pour pJet5'3'Cine ::ery. Les régions 5'3' des plasmides font respectivement : 1735 pb et 1709 pb pour pJet5'3'Poly ::ery et pJet5'3'Cine ::ery. Si le gène de l'érythromycine est ajouté (1185 pb) on obtient une amplification du gène en plus des régions 5'3' donnant des fragments d'ADN à 2909 pb et 2894 pb.

Même si dans les régions 5'3' paraissait fonctionnelle, la transformation de l'érythromycine n'a pas aboutie dans *N. lactamica*. À partir de ces résultats nous avons essayé de transformer les plasmides pJET5'3'Lactalux ::ery dans *N. lactamica*, pJET5'3'Cinelux ::ery dans *N. cinerea* et pJET5'3'Polylux ::ery dans *N. polysaccharea* (Figure 29) en hypothèses que la présence du gène de résistance à la kanamycine pouvait poser problème.

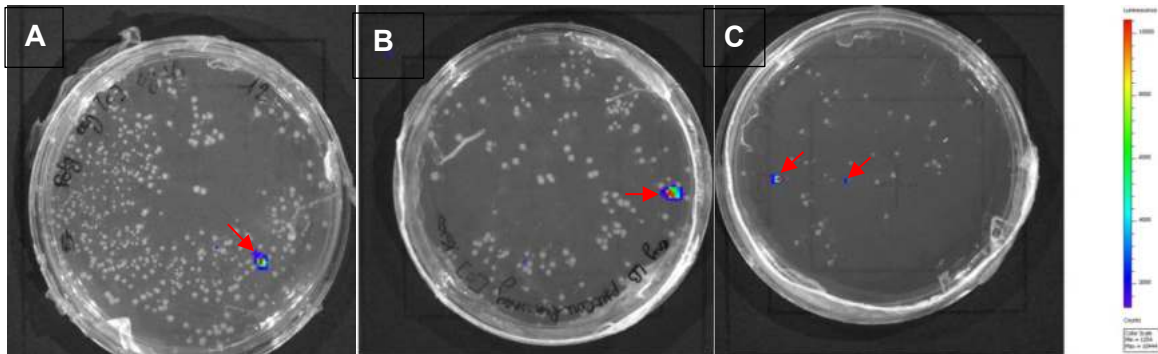







Figure 29 : Obtention des plasmides luminescents érythromycine résistante dans *Escherichia coli* DH5 α . A) pJET5'3'Polylux ::ery, B) pJET5'3'Cinelux ::ery, C) pJET5'3'Lactalux ::ery. Images réalisées à partir de l'appareil d'acquisition IVIS lumina III. La flèche rouge indique la colonie bactérienne luminescente.

Mais encore une fois la transformation n'a pas fonctionné. Malgré les multiples tentatives pour la mise en place de souches luminescentes commensales, certains paramètres n'ont pas permis la réussite du projet. L'ensemble des résultats pour les transformations dans *Neisseria* ont été résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des essais de transformations chez les *Neisseria* commensales pour l'obtention de souches luminescentes. Chaque condition découle des résultats des différents clonages et traduit de la complexité des clonages dans les *Neisseria* commensales. Chaque transformation a été testée au moins 2 fois en suivant le même protocole de transformation. Les plasmides initiaux ont été séquencés pour vérifier que les régions 5'3' ait bien été construite. Km = kanamycine, Ery = érythromycine.

Constructions plasmidiques (Détails de l'insert)		<i>Neisseria cinerea</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>	<i>Neisseria lactamica</i>		
	Régions 5'3'					Plasmides séquencés
	pJet5'3' :: km					La transformation a fonctionnée
	pJet5'3' :: ery					La transformation n'a pas fonctionnée
	pJet5'3'lux :: km					La condition n'a pas été testée
	pJet5'3'lux :: ery					

II. Rétrocroisement des souris

Le processus de changement de fond génétique a été initié à partir d'un constat : on a rapporté de nombreux comportements stéréotypiques dans les souris FVB de la colonie (Tableau 6). La stéréotypie comportementale regroupe l'ensemble des comportements dits anormaux, répétitifs et qui entraînent souvent des complications. (« Stereotypy – Mouse Ethogram » s. d.) Les comportements les plus observés ont été le « *circling* » (l'animal effectue des tours dans sa cage à répétition sans s'arrêter), les « *looping* » (la souris réalise des sauts arrière dans la cage), le « *barbering* » qui rassemble l'ensemble des procédés liés au toilettage que les souris effectuent de manière trop intensive sur elles-mêmes ou sur les autres (Arrachage de fourrure, des poils ou des moustaches) et les bagarres entre animaux (Engineers 2019).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des cas cliniques relevés du 26 mai 2021 au 15 juillet 2022 pour les souris de fond génétique FVB. Les cas cliniques permettent un suivi des comportements stéréotypiques qui ont pu être observés dans la colonie.

Comportements stéréotypiques	Cas cliniques du 26 mai 2021 au 15 juillet 2022 (13)
Etat alerte/Nervosité	12
alopecie lié au barbering	8
circling/looping	7
convulsions	2
agressivité	1

L'ensemble de ces comportements découle d'une hyperactivité chronique des souris FVB déjà décrite dans la littérature (Mineur et Crusio 2002; « A Behavioural Characterisation of the FVB/N Mouse Strain » 2004), qui peut entraîner de nombreuses complications lors de la manipulation des animaux et qui peut nuire au bien-être animal. Pour éviter les effets induits par le fond FVB, la technique de rétrocroisement pour le fond génétique, Balb-C a été mise en place. Ce type de souris ont la réputation d'être moins nerveuses et sont largement utilisées pour les modèles murins.

Pour déterminer le génotype des souris lors de la reproduction, des PCR ont été réalisées pour chaque écouvillon d'ADN des souris nouvellement nées. Les amorces Hceacam (génotypages) ont été utilisées pour amplifier une partie du gène *Hceacam* d'environ 250 pb (Figure 30).

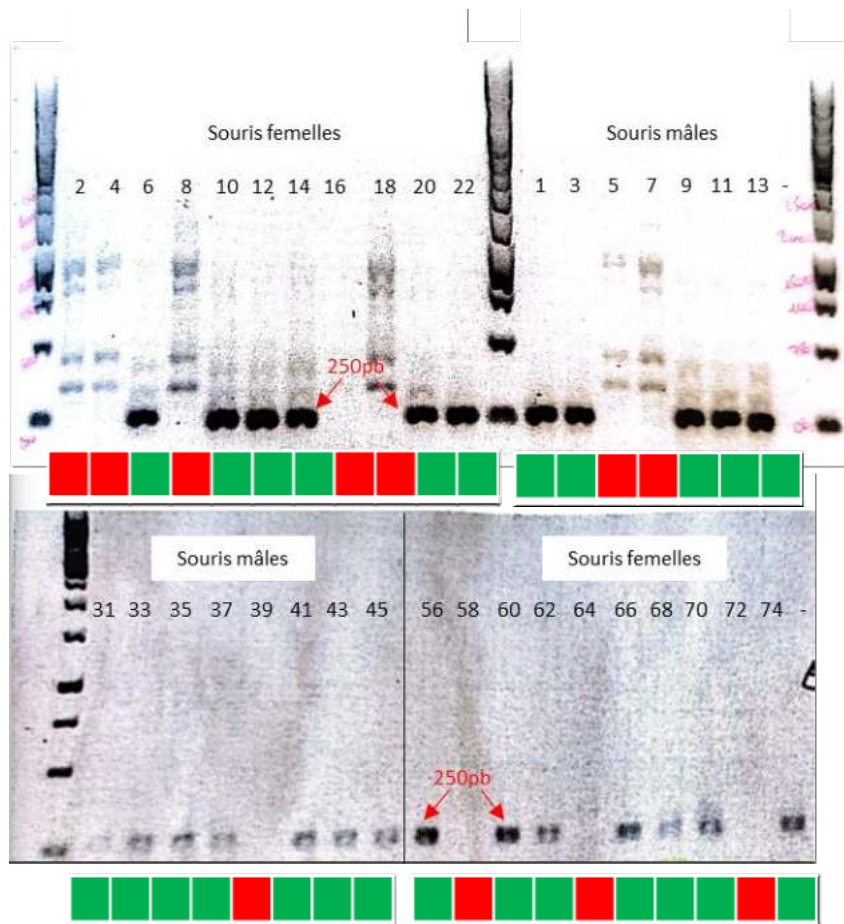


Figure 30 : Détermination des souriceaux Hceacam par PCR colonie. À partir de l'ADN des souriceaux, une PCR visant le gène *Hceacam* a été réalisée avec les amorces Hceacam génotypes. En présence d'une bande, la souris est considérée comme positive et les mâles peuvent alors être réutilisés à l'étape de reproduction suivante. Les carrés verts représentent les souris positives et les carrés rouges, les souris négatives.

La reproduction pour le changement de fond génétique a débuté le 28 janvier 2022 avec deux femelles Balb-C. La F1 a généré 18 souris, dont 5 mâles Balb-C/hCEACAM. En suivant le même schéma de reproduction, la seconde génération a été obtenue avec 18 souris et 4 Balb-C/hCEACAM mâles (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des cycles de reproductions du rétrocroisement. Comme décrits dans le matériel et méthodes, 2 mâles de chaque génération ont été sélectionnés pour être croisés à 2 femelles avec un fond génétique Balb-C100%. m =mâle, f =femelle, WT = sauvage.

Sexe	Date de naissance	Génotype
m	17/02/2022	WT
m	17/02/2022	WT
f	20/02/2022	hCEACAM
f	20/02/2022	WT
f	20/02/2022	hCEACAM
f	20/02/2022	hCEACAM
m	25/05/2022	hCEACAM
m	25/05/2022	hCEACAM
f	25/05/2022	hCEACAM
f	25/05/2022	WT
f	25/05/2022	hCEACAM
f	25/05/2022	hCEACAM
f	25/05/2022	WT
f	25/05/2022	hCEACAM
f	25/05/2022	hCEACAM
m	26/05/2022	WT
m	26/05/2022	WT
m	26/05/2022	WT
m	26/05/2022	hCEACAM
m	26/05/2022	WT
m	26/05/2022	WT
f	26/05/2022	WT
f	26/05/2022	hCEACAM
f	26/05/2022	hCEACAM

Plusieurs générations après celle-ci seront nécessaires pour pouvoir obtenir un fond génétique proche de 100%. L'obtention de la lignée serait hypothétiquement possible en mars 2023, le rétrocroisement est un procédé laborieux et chronophage. Il est à noter qu'avec seulement trois générations décrites il n'est pas possible d'observer les effets bénéfiques sur le fond génétique des souris ou des modifications comportementales, mais le rétrocroisement en cours devrait permettre une réduction de l'hyperactivité de la colonie et permettre une meilleure expérimentation animale pour l'animal et le manipulateur.

Bien que le fond génétique des souris Balb-c ne soit pas complètement établie, nous avons essayé de comparer les souris Balb-C/hCEACAM et les souris FVB/hCEACAM dans une expérience de portage avec le modèle d'étude du laboratoire. Les résultats présentés sont très préliminaires et pourraient ne pas être le reflet des résultats finaux lorsque le background Balb-c sera finalisé. Les souris ont été infectées par 6 souches de *Neisseria meningitidis* : 24198, 20553, 21359, 21317, 17592 et 10820 provenant toutes d'isolats cliniques différents (Figure 31).

Lors de l'infection, la souche 24198 a induit un sepsis chez la souris FVB induisant la mort de celle-ci à J2. Ce phénomène n'a pas été observé pour la souris Balb-c infectée par la même souche ou la présence des bactéries à débris à partir de J1. Pour ce qui est des infections par les souches 10820 et 20553, les profils d'infections sont assez similaires pour les souris FVB. On rapporte un pic de luminescence important à J1 les souris FVB qui n'est pas observé pour les souris Balb-c. Quant aux souches 17592 et 21359 le signal luminescent des souris Balb-c est augmenté après J3 et J4 respectivement, ce qui n'est pas observé chez les autres souches. Le signal a donc perduré sur le temps chez les souris. On peut noter que pour toutes les souris, lorsque le signal luminescent se concentre, il localise entre la narine externe et les incisives supérieures.

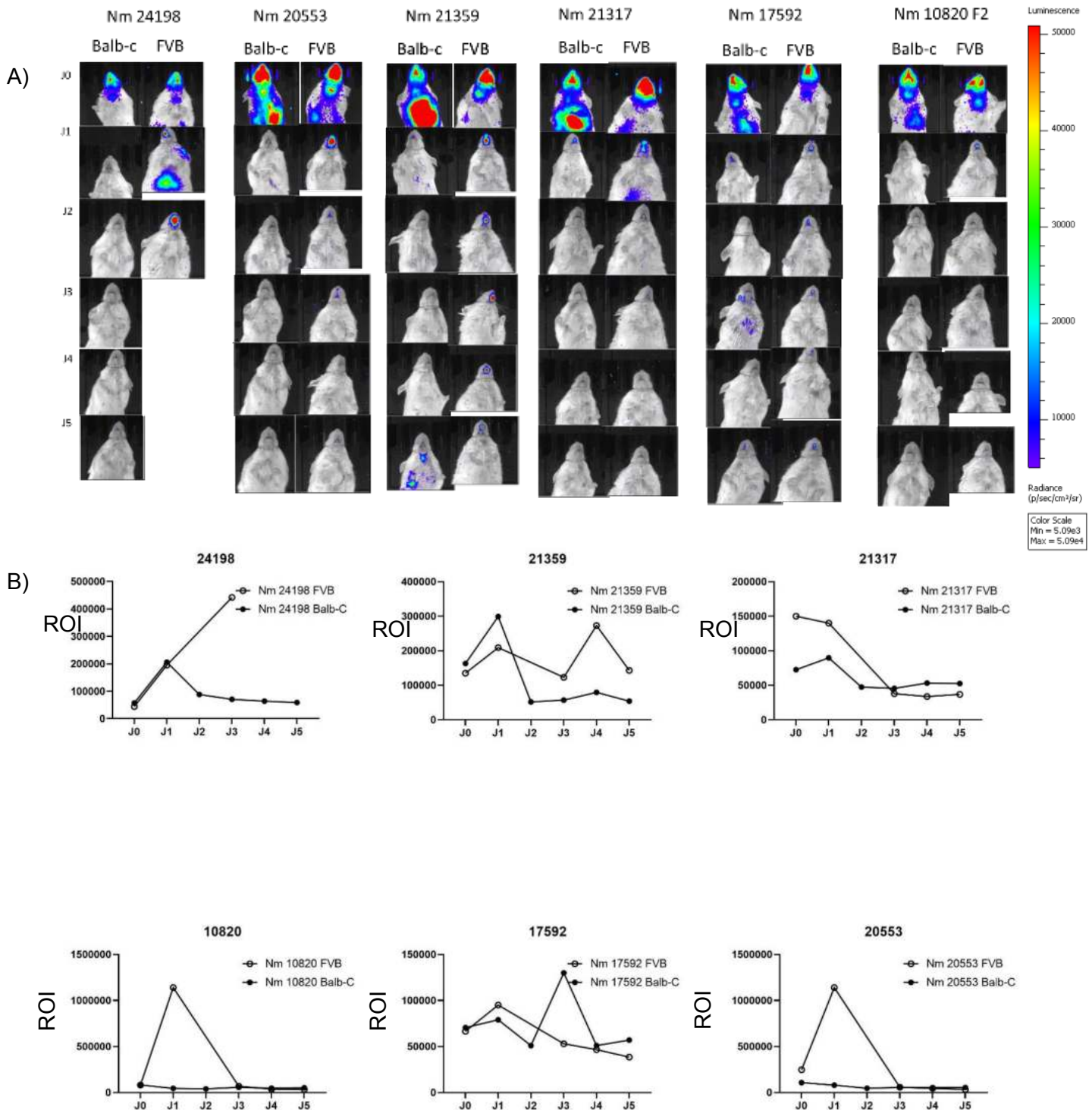
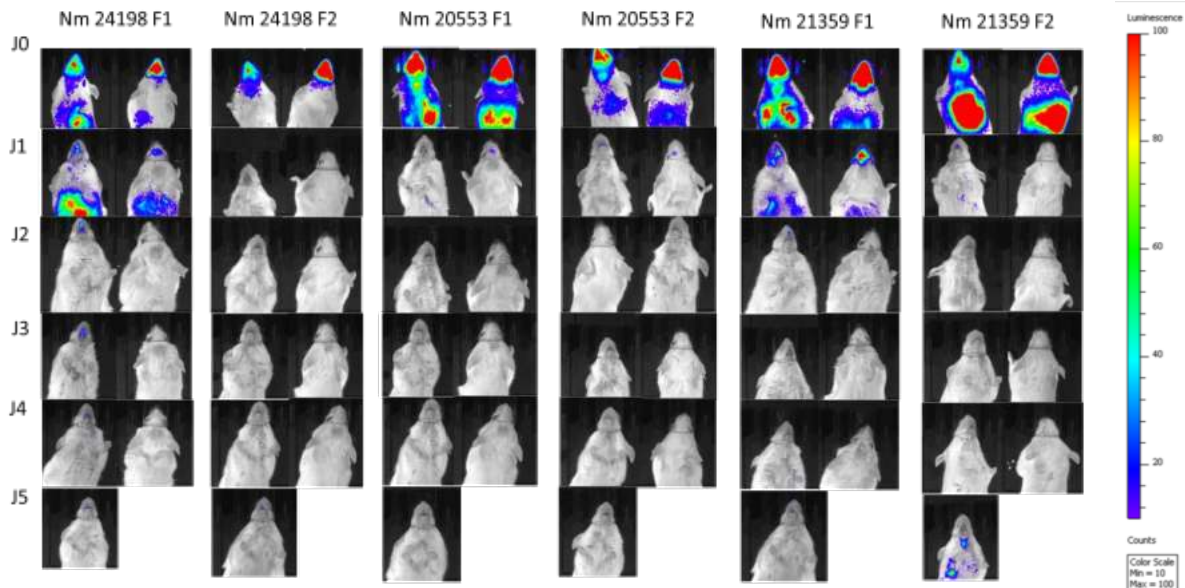


Figure 31 : Infection des souris FVB/hCEACAM et Balb-c/hCEACAM par des souches luminescentes de *Neisseria meningitidis*. A) Acquisition des mesures de luminescences au niveau du flanc des souris à partir de l'appareil de mesure IVIS lumina III. L'acquisition a duré 10 min pour permettre l'acquisition du signal qui peut être assez faible. B) Représentation graphique des mesures de luminescence par ROI (region of interest) pour chaque ventre de souris.

Nm = *Neisseria meningitidis*.

Deux générations de souris Balb-c/hceacam ont été générées lors de ma participation au changement de fond génétique : la F1 (50% Balb-c) et la F2 (75% Balb-c). Ayant un pourcentage de fond génétique différent, nous nous sommes demandé si des différences pouvaient déjà être observées. Encore une fois les résultats restent préliminaires et des essais entre les différentes générations pourront être réalisés lorsque le changement de fond génétique sera complété. Si on compare les deux niveaux de fond génétiques dans une expérience d'infection par les 3 souches de *Neisseria meningitidis* (24198, 20553, 21359) on peut observer plusieurs phénomènes (Figure 32) : dans un premier temps on constate un pic de luminescence à J1 pour les souches 24198 et 21359 de F1 qui n'est pas observée pour les souris de F2, les deux souches ont de même, un profile de luminescence similaire que ce soit pour la F1 ou la F2. On notera que pour l'infection par la souche 21359 le signal luminescent à augmenter à J5 pour la F2, ce qui n'est pas observé pour la première génération de souris Balb-c. Enfin pour la souche 20553, les deux profils de luminescences sont très similaires sans distinction précise pour les souris de F1 ou de F2.

A)



B)

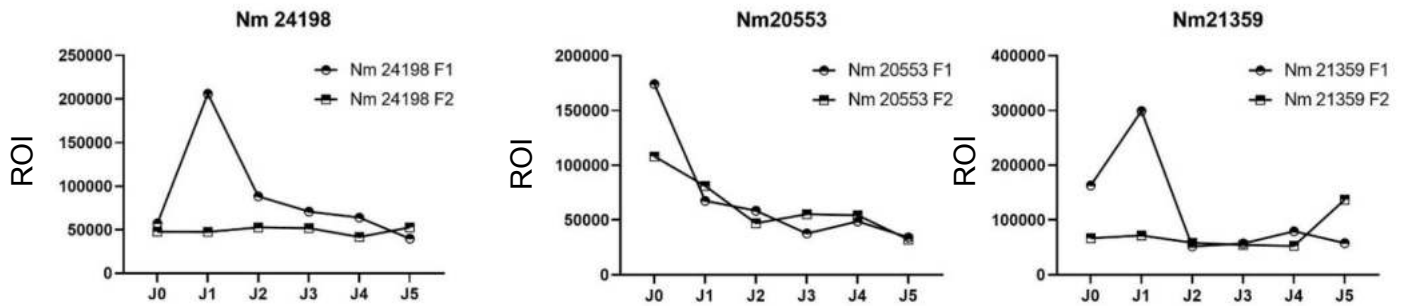


Figure 32 : Infection des souris Balb-c/hCEACAM du premier et second croisement par des souches luminescentes de *Neisseria meningitidis*. Les souris de première génération sont appelées F1 et celles de seconde génération F2. A) Acquisition des mesures de luminescences au niveau du flanc des souris à partir de l'appareil de mesure IVIS lumina III. L'acquisition à durer 10 min pour permettre l'acquisition du signal qui peut être assez faible. B) Représentation graphique des mesures de luminescence par ROI (region of interest) pour chaque ventre de souris.

DISCUSSION :

De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la construction des souches de *Neisseria* commensales luminescentes. En effet les plasmides élaborés pour induire la luminescence n'ont pas réussi à atteindre le génome des espèces de *Neisseria* commensales. Malgré la compétence naturelle du genre *Neisseria*, des facteurs peuvent empêcher la transformation et quelques hypothèses peuvent être apportées. Le gène de l'érythromycine et les régions 5'3' ont réussi à être transformés, il est peu probable que ces éléments soient en cause dans l'échec des transformations. Il est cependant plus difficile de conclure pour *N. lactamica*, car aucun insert n'est rentré dans la souche à partir de nos constructions.

Si on regarde les travaux antérieurs du laboratoire, l'insert de la cassette Porlux suivi d'un gène de résistance à fonctionner dans les espèces *N. elongata* (*Neisseria* commensale), *N. meningitidis* (*Neisseria* pathogène) et *N. musculi* (*Neisseria* commensale de la souris) (Nyongesa, Chenal, et al. 2022). La grande taille de l'insert n'avait pas posé de problème, on peut donc supposer que les échecs des transformations ne sont pas liés à la taille de la cassette (environ 10 000 pb). On notera que l'insertion d'une cassette similaire (Régions 5'3' + Porlux + kanamycine) a été testée dans *N. gonorrhoeae* mais qu'elle n'a elle non plus pas abouti. De ces résultats on comprend que les souches de *Neisseria* pourraient être dotées de caractéristiques spécifiques d'espèce pour l'acquisition de nouveaux matériaux génétiques, ou que d'autres paramètres sont à explorer pour tenter de nouveau ce genre de manipulations.

Une piste de recherche pour mieux comprendre les résultats des transformations serait de regarder la composition précise des séquences DUS. En effet, lorsque ces séquences sont moins nombreuses, le taux de transformation peut être diminué de manière importante. Lorsque la fréquence de séquence DUS (ATGCCGTCTGAA) est recherchée dans les régions 5'3' de chaque souches ont observé 6 répétitions dans *N. lactamica*, 9 répétitions dans *N. polysacchareae* et 5 répétitions dans *N.cinerheae*. On notera que *N. lactamica*, *N. polysacchareae* et *N.cinerheae* possèdent la même séquence DUS que les pathogènes *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* (Berry et al. 2013). Le nombre de répétitions paraît cohérent entre les espèces possédant les mêmes séquences DUS. Pour voir si ce paramètre pourrait influencer sur le taux de transformant, il serait intéressant de synthétiser des régions 5'3' plus ou moins abondantes en DUS couplés à des résistances aux antibiotiques pour déterminer si les DUS pourraient être un paramètre de variation.

Un autre paramètre qui pourrait influencer le ratio de transformation serait les motifs de méthylation. Comme expliqué dans l'introduction, la méthylation est un processus épigénétique retrouvé chez les bactéries qui possède plusieurs propriétés. Elle a comme rôle principal la protection de l'ADN contre les endonucléases, mais elle permet aussi la gestion du système de restriction-modification (RM) de la bactérie. Ce système permet d'identifier l'ADN étranger et de ne pas les assimiler. Cependant dans certaines espèces bactériennes naturellement compétentes comme *Campylobacter jejuni* ou *Haemophilus parasuis*, les systèmes RM ont aussi la capacité d'augmenter les taux de transformations de plasmides possédant des motifs de méthylations spécifiques, et donc favoriser l'assimilation de certains brins d'ADN uniquement à partir des modifications épigénétiques. (Beauchamp et al. 2017) (« Improvement in the Efficiency of Natural Transformation of Haemophilus Parasuis by Shuttle-Plasmid Methylation | Elsevier Enhanced Reader » s. d.). Dans la même idée, un article paru en 2019 a démontré l'échange d'un brin d'ADN méthylé spécifiquement entre *N. elongata* et *N. gonorrhoeae* induisant une toxicité au pathogène, qui permettez à *N. elongata* d'éliminer les autres compétiteurs de la flore bactérienne (Fleming et Mulvey 2019). On comprend que la régulation de la compétence naturelle peut être fortement impactée par les motifs de méthylations des séquences d'ADN et avoir un effet sur les taux de transformations. L'hypothèse dans le cas de la construction des souches luminescentes serait que certains motifs de méthylations soient reconnus comme délétères par l'espèce de *Neisseria* et rejetés, inhibant la transformation. Cette idée est appuyée par le fait que les motifs de méthylations peuvent varier entre espèces et que certains motifs produisent dans *E.coli* lors de la construction des plasmides pourrait inhiber l'assimilation des cassettes. On notera sur la même idée que les *Neisseria* possèdent plusieurs systèmes de méthylations qui peuvent varier selon les espèces (Ritchot et Roy 1990), ce qui pourrait expliquer la réussite des transformations pour certaines constructions et pas d'autre. Il est évident que cette piste est encore très préliminaire et qu'elle n'explique pas l'entièreté des résultats, car des cassettes de clonages similaires sont rentrées sans difficulté chez *N. meningitidis* et *N.elongata*. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer le méthylome des espèces commensales de *Neisseria* avec par exemple la réalisation d'un séquençage SMRT (Single-molecule real-time). Cette technique permet de séquencer de nombreux brins d'ADN de manière individuelle et spécifique. L'incorporation de nucléotides fluorescents permet comme dans une séquence classique la détermination de la séquence nucléotidique, mais aussi des variations épigénétiques. Cette technique a déjà été utilisée dans le but de générer le méthylome de plusieurs bactéries, dont *Neisseria meningitidis* (« Single Molecule Real Time Sequencing - an overview | ScienceDirect Topics » s. d.; Murray et al. 2012). Cette démarche permettrait l'identification de motifs de

méthylations dans les espèces commensales et on pourrait ensuite les étudier pour déterminer leurs impacts sur la sélection de matériel génétique lors la compétence naturelle.

Pour ce qui est du changement de fond génétique FVB en Balb-C la colonie a été lancée avec succès. En effet, le protocole de croisement a permis de réaliser 2 générations pour le moment et devrait permettre l'obtention d'un fonds génétique Balb-C proche de 100% en mars 2023. Le modèle de souris du laboratoire repose principalement sur des caractéristiques facilitant la colonisation des *Neisseria* dans la cavité buccale des souris. Comme expliquer en introduction, les souris possèdent des récepteurs hCEACAM ayant une forte affinité pour les protéines Opa présentent chez les *Neisseria*. Il est cependant important de noter que seules certaines espèces de *Neisseria* possèdent des protéines Opa comme *N.lactamica* et *N.subflava* (Toleman, Aho, et Virji 2001). Le modèle d'infection n'est donc pas adapté pour tous les individus du genre *Neisseria*. Une poursuite de recherche pour répondre à ce problème, ce serait la murinisation des souches humaines de *Neisseria*. En effet l'idée serait de mettre en contact une souche humaine de *Neisseria* comme *N. lactamica* avec de l'ADN de *N. musculi* pour favoriser les échanges de matériel par transformation naturelle et permettre l'acquisition des gènes nécessaires à l'adaptation de la cavité orale des souris. Après plusieurs cycles d'échanges, *N. lactamica* serait introduite dans la souris et on serait capable d'observer si la persistance d'une souche humaine dans la souris est possible. Les protocoles de murinisations sont actuellement en préparation dans le laboratoire.

Un autre point à améliorer serait le bien-être des animaux sur une étape précise : la prise en main des animaux. En effet la méthode standard pour la manipulation des souris consiste à prendre la base de la queue de la souris entre le pouce et l'index et de la déposer ensuite sur une surface. Or il a été prouvé que cette technique induisait un stress très important chez les animaux et enclenche une mécanique d'aversion pour la manipulation chez les souris. Une technique beaucoup moins stressante a été validée par de nombreux articles : le ramassage des souris avec un tunnel déjà présent dans la cage (Hurst et West 2010; Gouveia et Hurst 2013; 2019). En effet, en en laissant un tunnel dans la cage de souris, l'objet lui devient familier et paraît moins dangereux. Les souris avaient tendance à interagir plus longtemps avec le manipulateur à comparer des souris sorties par la méthode standard. En plus du stress réduit avec l'utilisation de tunnels transparents, l'inspection de l'apparence, la posture et des mouvements des animaux est plus précis, car l'animal n'est pas maintenu dans une position contractée. Un autre point sur lequel on pourrait moduler le stress des souris est leurs environnements l'étude. Gurfein, B.T *et al.* a montré que des cages plus grandes avec des éléments d'enrichissements comme des roues

d'exercices, des tubes en polycarbonate ou du matériel pour faire les nids, réduisent de manière importante les niveaux de stress de la souris et avaient même un effet sur la croissance de leurs rates, élément très important pour les fonctions immunes (Gurfein et al. 2012).

Pour ce qui est des expériences d'infections avec les souches de *Neisseria meningitidis*, deux paramètres ont été testés sur les deux générations du fond génétique Balb-C : la génération de croisement (F1 ou F2) et les fonds génétiques (FVB et Balb-C). Les expériences ont été réalisées avec les deux premières générations de souris, Balb-C_{50%} et Balb-C_{75%}. Cependant cela implique que dans chaque génération il reste des traces de l'ancien fond génétique FVB. Or, on ne peut pas déterminer dans quelle proportion la présence restante du fond FVB peut induire des variations dans le comportement des souris. Les expériences réalisées sur la F1 et F2 ont permis de mettre en place l'expérimentation, mais lorsque des souris Balb-C_{100%} seront générées il faudra réitérer les essais pour valider les résultats observés avec les générations F1 et F2. Plusieurs souches de *N. meningitidis* ont été testées lors de l'infection des souris. En effet celles-ci proviennent d'isolat clinique différent et peuvent avoir des niveaux de virulences plus ou moins variables. Cette hétérogénéité a pu être observée dans nos expériences d'infections. En effet certaines souches comme la 24198 qui a induit une septicémie dès les premiers jours chez la souris FVB, alors que d'autres ont persisté plus longtemps dans la cavité buccale des souris comme la 21359 et la 17592. Pour valider les profils d'infections observés lors de nos différentes expériences sur le tropisme des *Neisseria* il serait nécessaire de reproduire les essais au moins deux fois de plus, permettant par la suite une étude statistique de nos résultats. L'amélioration du modèle hCEACAM par le changement de fond génétique est encore en cours, mais les expériences de portage pour *Neisseria meningitidis* ont l'air d'être impactées par celui-ci.

CONCLUSION

La paroi est un élément central chez les bactéries. Lors de de cette étude du genre *Neisseria*, plusieurs paramètres ont pu être explorés dont : les variations de tropisme des bactéries de la famille des *Neisseria* avec des essais sur la mise en place d'un modèle d'étude *in vivo* pour des *Neisseria* commensales, mais aussi à partir d'un projet annexe sur la régulation de la morphologie bactérienne. Lors de mes travaux, des essais sur les souches luminescentes de *Neisseria* commensales ont pu être réalisés. Cependant, les constructions plasmiques initiales n'ont pas réussi à intégrer le génome de nos espèces malgré de multiples tentatives. On notera tous de même que le modèle d'infection du laboratoire a pu être amélioré par le changement de fond génétique (toujours en cours) des souris, bien que les résultats produits soient assez préliminaires. Il reste encore de nombreux éléments à comprendre sur l'adaptation des *Neisseria* à la flore nasopharyngée, mais les mises en place de modèles d'études comme celui de ce projet pourraient permettre une meilleure compréhension de leurs interactions et *in fine* pourrait permettre l'identification de mécanismes bactériens importants.

CONCLUSION GÉNÉRALE :

Lors de ces deux années de maîtrise, j'ai pu étudier de nombreuses facettes de la bactériologie en me focalisant plus précisément sur les rôles de la paroi bactérienne dans leurs interactions avec l'hôte et leurs persistances dans le microbiote. En plus de permettre à la bactérie d'échapper à l'action des antibiotiques, les éléments de la paroi influent énormément sur les modulations de la réponse immunitaire, permettant la persistance de la bactérie et sa synergie avec l'hôte. De nombreuses pistes sont encore à creuser pour mieux comprendre le tropisme bactérien et leurs mécanismes d'adaptations dans leurs hôtes. Les axes de recherches auxquels j'ai pu participer permettent la continuation de nombreux projets portés par le laboratoire qui devrait continuer de se développer dans les prochaines années.

BIBLIOGRAPHIE

- « A Behavioural Characterisation of the FVB/N Mouse Strain ». 2004. *Behavioural Brain Research* 155 (2): 283-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.021>.
- Abd El-Baky, Rehab M, Salwa M Masoud, Doaa S Mohamed, Nancy GFM Waly, Engy A Shafik, Dina A Mohareb, Azza Elkady, Mohamed M Elbadr, et Helal F Hetta. 2020. « Prevalence and Some Possible Mechanisms of Colistin Resistance Among Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ». *Infection and Drug Resistance* 13 (février): 323-32. <https://doi.org/10.2147/IDR.S238811>.
- Alcott, Allison M., Lacie M. Werner, Christopher M. Baiocco, Meagan Belcher Dufresne, Linda Columbus, et Alison K. Criss. 2022. « Variable Expression of Opa Proteins by *Neisseria gonorrhoeae* Influences Bacterial Association and Phagocytic Killing by Human Neutrophils ». *Journal of Bacteriology* 204 (4): e00035-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00035-22>.
- Alekshun, Michael N., et Stuart B. Levy. 2007. « Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance ». *Cell* 128 (6): 1037-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>.
- Annunziato, Giannamaria, et Gabriele Costantino. 2020. « Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015–2020) ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 30 (12): 931-47. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1851679>.
- Arko, R J. 1989. « Animal models for pathogenic *Neisseria* species. » *Clinical Microbiology Reviews* 2 (Suppl): S56-59.
- Arko, Robert J. 1974. « An Immunologic Model in Laboratory Animals for the Study of *Neisseria gonorrhoeae* ». *The Journal of Infectious Diseases* 129 (4): 451-55.
- Baerentsen, Rene, Christoph M. Tang, et Rachel M. Exley. 2022. « Et tu, *Neisseria*? Conflicts of Interest Between *Neisseria* Species ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.913292>.
- Beauchamp, Jessica M., Rhiannon M. Leveque, Suzanne Dawid, et Victor J. DiRita. 2017. « Methylation-dependent DNA discrimination in natural transformation of *Campylobacter jejuni* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (38): E8053-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703331114>.
- Bennett, Julia S., Holly B. Bratcher, Carina Brehony, Odile B. Harrison, et Martin C. J. Maiden. 2014. « The Genus *Neisseria* ». In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, édité par Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, et Fabiano Thompson, 881-900. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_241.
- Berry, Jamie-Lee, Ana Cehovin, Melanie A. McDowell, Susan M. Lea, et Vladimir Pelicic. 2013. « Functional Analysis of the Interdependence between DNA Uptake Sequence and Its Cognate ComP Receptor during Natural Transformation in *Neisseria* Species ». Édité par Diarmaid Hughes. *PLoS Genetics* 9 (12): e1004014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004014>.
- Bialvaei, Abed Zahedi, et Hossein Samadi Kafil. 2015. « Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance ». *Current Medical Research and Opinion* 31 (4): 707-21. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>.
- Bickel, M. 1993. « The Role of Interleukin-8 in Inflammation and Mechanisms of Regulation ». *Journal of Periodontology* 64 (5 Suppl): 456-60.
- Blanton, K J, G D Biswas, J Tsai, J Adams, D W Dyer, S M Davis, G G Koch, P K Sen, et P F Sparling. 1990. « Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. » *Journal of Bacteriology* 172 (9): 5225-35.

- Brooks, Cory L., Elena Arutyunova, et M. Joanne Lemieux. 2014. « The Structure of Lactoferrin-Binding Protein B from *Neisseria Meningitidis* Suggests Roles in Iron Acquisition and Neutralization of Host Defences ». *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* 70 (Pt 10): 1312-17. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14019372>.
- Brugiroux, Sandrine, Markus Beutler, Carina Pfann, Debora Garzetti, Hans-Joachim Ruscheweyh, Diana Ring, Manuel Diehl, et al. 2016. « Genome-Guided Design of a Defined Mouse Microbiota That Confers Colonization Resistance against *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Nature Microbiology* 2 (novembre): 16215. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.215>.
- Cahoon, Laty A., et H. Steven Seifert. 2011. « Focusing homologous recombination: pilin antigenic variation in the pathogenic *Neisseria* ». *Molecular microbiology* 81 (5): 1136-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07773.x>.
- Cantas, Hasan, Marta Pekarkova, Hege S. Kippenes, Espen Brudal, et Henning Sorum. 2011. « First Reported Isolation of *Neisseria canis* from a Deep Facial Wound Infection in a Dog ». *Journal of Clinical Microbiology* 49 (5): 2043-46. <https://doi.org/10.1128/JCM.02610-10>.
- Cephas, Kimberly D., Juhee Kim, Rose Ann Mathai, Kathleen A. Barry, Scot E. Dowd, Brandon S. Meline, et Kelly S. Swanson. 2011. « Comparative Analysis of Salivary Bacterial Microbiome Diversity in Edentulous Infants and Their Mothers or Primary Care Givers Using Pyrosequencing ». *PLOS ONE* 6 (8): e23503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023503>.
- Chitsaz, Mohsen, Lauren Booth, Mitchell T. Blyth, Megan L. O'Mara, et Melissa H. Brown. 2019. « Multidrug Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Identification of Functionally Important Residues in the MtrD Efflux Protein ». *mBio* 10 (6): e02277-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02277-19>.
- Coureuil, Mathieu, Anne Jamet, Emmanuelle Bille, Hervé Lécuyer, Sandrine Bourdoulous, et Xavier Nassif. 2019. « Molecular Interactions between *Neisseria Meningitidis* and Its Human Host ». *Cellular Microbiology* 21 (11): e13063. <https://doi.org/10.1111/cmi.13063>.
- Craig, Lisa, Michael E. Pique, et John A. Tainer. 2004. « Type IV Pilus Structure and Bacterial Pathogenicity ». *Nature Reviews. Microbiology* 2 (5): 363-78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro885>.
- Crum-Cianflone, Nancy, et Eva Sullivan. 2016. « Meningococcal Vaccinations ». *Infectious Diseases and Therapy* 5 (2): 89-112. <https://doi.org/10.1007/s40121-016-0107-0>.
- Custodio, Rafael, Errin Johnson, Guangyu Liu, Christoph M. Tang, et Rachel M. Exley. 2020. « Commensal *Neisseria cinerea* impairs *Neisseria meningitidis* microcolony development and reduces pathogen colonisation of epithelial cells ». *PLoS Pathogens* 16 (3): e1008372. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008372>.
- Dalmasso, Guillaume, Racha Beyrouthy, Sandrine Brugiroux, Pierre Saint-Sardos, Etienne Ruppé, Amine Ghozlane, Vincent Gaumet, Nicolas Barnich, Julien Delmas, et Richard Bonnet. s. d. « MCR-1 induces commensal behavior in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ». <https://mail.uca.fr/service/home/~/?auth=co&loc=fr&id=10904&part=2>.
- De Boeck, Ilke, Stijn Wittouck, Sander Wuyts, Eline F. M. Oerlemans, Marianne F. L. van den Broek, Dieter Vandenheuvel, Olivier Vanderveken, et Sarah Lebeer. 2017. « Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity ». *Frontiers in Microbiology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02372>.
- Dehio, C. 1998. « The Role of *Neisseria* Opa Proteins in Interactions with Host Cells ». *Trends in Microbiology* 6 (12): 489-95. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01365-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01365-1).
- Deuren, Marcel van, Petter Brandtzaeg, et Jos W. M. van der Meer. 2000. « Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Pathogenesis and Clinical Management ». *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1): 144-66.

- Dillard, Joseph P. 2011. « Genetic Manipulation of *Neisseria gonorrhoeae* ». *Current protocols in microbiology* 0 4 (novembre): Unit4A.2.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc04a02s23>.
- Donati, Claudio, Moreno Zolfo, Davide Albanese, Duy Tin Truong, Francesco Asnicar, Valerio Iebba, Duccio Cavalieri, et al. 2016. « Uncovering Oral *Neisseria* Tropism and Persistence Using Metagenomic Sequencing ». *Nature Microbiology* 1 (7): 1-9.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.70>.
- « Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study ». s. d. Consulté le 12 mars 2023. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31449-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31449-6/fulltext).
- Engineers, Maze. 2019. « Mouse Ethogram: Barbering Behavior ». *Maze Engineers* (blog). 16 novembre 2019. <https://conductscience.com/maze/mouse-ethogram-barbering-behavior/>.
- Ernst, R. K., T. Guina, et S. I. Miller. 1999. « How Intracellular Bacteria Survive: Surface Modifications That Promote Resistance to Host Innate Immune Responses ». *The Journal of Infectious Diseases* 179 Suppl 2 (mars): S326-330.
<https://doi.org/10.1086/513850>.
- Errington, Jeff. 2015. « Bacterial Morphogenesis and the Enigmatic MreB Helix ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (4): 241-48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3398>.
- Few, A. V., et J. H. Schulman. 1953. « The Absorption of Polymyxin E by Bacteria and Bacterial Cell Walls and its Bactericidal Action ». *Microbiology* 9 (3): 454-66.
<https://doi.org/10.1099/00221287-9-3-454>.
- « Figure 1: Overview of *Neisseria Gonorrhoeae* Infection. | Nature Reviews Microbiology ». s. d. Consulté le 24 septembre 2022.
<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.169/figures/1>.
- Fleming, Brittany A., et Matthew A. Mulvey. 2019. « Commensal Strains of *Neisseria* Use DNA to Poison Their Pathogenic Rivals ». *Cell Host & Microbe* 26 (2): 156-58.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.014>.
- Flynn, Matthew, et James Dooley. 2021. « The microbiome of the nasopharynx ». *Journal of Medical Microbiology* 70 (6): 001368. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001368>.
- Gao, Rongsui, Yongfei Hu, Zhencui Li, Jian Sun, Qingjing Wang, Jingxia Lin, Huiyan Ye, et al. 2016. « Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance ». *PLoS Pathogens* 12 (11): e1005957. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005957>.
- GEISLER, WILLIAM M., SHUYING YU, et EDWARD W. HOOK. 2005. « Chlamydial and Gonococcal Infection in Men Without Polymorphonuclear Leukocytes on Gram Stain: Implications for Diagnostic Approach and Management ». *Sexually Transmitted Diseases* 32 (10): 630-34.
- Glitza, I. C., I. Ehrhard, B. Müller-Pebody, R. Reintjes, T. Breuer, A. Ammon, et H. -G. Sonntag. 2008. « Longitudinal Study of Meningococcal Carrier Rates in Teenagers ». *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211 (3): 263-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.05.006>.
- Gold, R., I. Goldschneider, M. L. Lepow, T. F. Draper, et M. Randolph. 1978. « Carriage of *Neisseria Meningitidis* and *Neisseria Lactamica* in Infants and Children ». *The Journal of Infectious Diseases* 137 (2): 112-21. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.112>.
- « Gonorrhée multirésistante ». s. d. Consulté le 19 juillet 2022. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/multi-drug-resistant-gonorrhoea>.
- Gouveia, Kelly, et Jane L. Hurst. 2013. « Reducing Mouse Anxiety during Handling: Effect of Experience with Handling Tunnels ». *PLoS ONE* 8 (6): e66401.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066401>.

- . 2019. « Improving the Practicality of Using Non-Aversive Handling Methods to Reduce Background Stress and Anxiety in Laboratory Mice ». *Scientific Reports* 9 (1): 20305. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56860-7>.
- Gray-Owen, Scott D., et Richard S. Blumberg. 2006. « CEACAM1: Contact-Dependent Control of Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (6): 433-46. <https://doi.org/10.1038/nri1864>.
- Gu, Angel, Zhifang Zhang, Nan Zhang, Walter Tsark, et John E. Shively. 2010. « Generation of Human CEACAM1 Transgenic Mice and Binding of Neisseria Opa Protein to Their Neutrophils ». *PLOS ONE* 5 (4): e10067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010067>.
- Guiddir, Tamazoust, Ala-Eddine Deghmane, Dario Giorgini, et Muhamed-Kheir Taha. 2014. « Lipocalin 2 in cerebrospinal fluid as a marker of acute bacterial meningitis ». *BMC Infectious Diseases* 14 (mai): 276. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-276>.
- Gurfein, Blake T., Andrew W. Stamm, Peter Bacchetti, Mary F. Dallman, Nachiket A. Nadkarni, Jeffrey M. Milush, Chadi Touma, et al. 2012. « The Calm Mouse: An Animal Model of Stress Reduction ». *Molecular Medicine* 18 (4): 606-17. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00053>.
- Hauck, Christof R, et Thomas F Meyer. 2003. « 'Small' Talk: Opa Proteins as Mediators of Neisseria–Host-Cell Communication ». *Current Opinion in Microbiology* 6 (1): 43-49. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00004-3).
- Hollingshead, Sarah, et Christoph M. Tang. 2019. « An Overview of Neisseria Meningitidis ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1969: 1-16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9202-7_1.
- Höltje, J. V. 1998. « Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of Escherichia Coli ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 62 (1): 181-203. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.181-203.1998>.
- Humbert, Maria Victoria, et Myron Christodoulides. 2020. « Atypical, Yet Not Infrequent, Infections with Neisseria Species ». *Pathogens* 9 (1): 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010010>.
- Hurst, Jane L., et Rebecca S. West. 2010. « Taming Anxiety in Laboratory Mice ». *Nature Methods* 7 (10): 825-26. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500>.
- Hussain, Saman, Carl N Wivagg, Piotr Szwedziak, Felix Wong, Kaitlin Schaefer, Thierry Izoré, Lars D Renner, et al. s. d. « MreB filaments align along greatest principal membrane curvature to orient cell wall synthesis ». *eLife* 7: e32471. <https://doi.org/10.7554/eLife.32471>.
- « Improvement in the Efficiency of Natural Transformation of Haemophilus Parasuis by Shuttle-Plasmid Methylation | Elsevier Enhanced Reader ». s. d. Consulté le 27 juillet 2022. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.001>.
- Jen, Freda E.-C., Arun V. Everest-Dass, Ibrahim M. El-Deeb, Sanjesh Singh, Thomas Haselhorst, Mark J. Walker, Mark von Itzstein, et Michael P. Jennings. 2020. « Neisseria Gonorrhoeae Becomes Susceptible to Polymyxin B and Colistin in the Presence of PBT2 ». *ACS Infectious Diseases* 6 (1): 50-55. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00307>.
- Johnson, A. P. 1983. « The Pathogenic Potential of Commensal Species of Neisseria ». *Journal of Clinical Pathology* 36 (2): 213-23. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.2.213>.
- Johswich, Kay O., et Scott D. Gray-Owen. 2019. « Modeling Neisseria Meningitidis Infection in Mice: Methods and Logistical Considerations for Nasal Colonization and Invasive Disease ». In *Neisseria Meningitidis: Methods and Protocols*, édité par Kate L. Seib et Ian R. Peak, 149-68. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9202-7_11.
- Kellogg, Douglas S., William L. Peacock, W. E. Deacon, L. Brown, et Carl I. Pirkle. 1963. « NEISSERIA GONORRHOEAE I. » *Journal of Bacteriology* 85 (6): 1274-79.

- Kuhn, Daisy A. 1981. « The Genera *Simonsiella* and *Alysiella* ». In *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, édité par Mortimer P. Starr, Heinz Stolp, Hans G. Trüper, Albert Balows, et Hans G. Schlegel, 390-99. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_23.
- Lavender, Hayley, Katy Poncin, et Christoph M. Tang. 2017. « *Neisseria cinerea* Expresses a Functional Factor H Binding Protein Which Is Recognized by Immune Responses Elicited by Meningococcal Vaccines ». *Infection and Immunity* 85 (10): e00305-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00305-17>.
- « Le rétrocroisement ». s. d. SEMAE Pédagogie. Consulté le 21 juin 2022. <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/retrocroisement/>.
- Lehner, Josef, Yao Zhang, Susanne Berendt, Tobias M. Rasse, Karl Forchhammer, et Iris Maldener. 2011. « The Morphogene *AmiC2* Is Pivotal for Multicellular Development in the Cyanobacterium *Nostoc Punctiforme* ». *Molecular Microbiology* 79 (6): 1655-69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07554.x>.
- Ling, Zhuoren, Wenjuan Yin, Zhangqi Shen, Yang Wang, Jianzhong Shen, et Timothy R Walsh. 2020. « Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9* ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (11): 3087-95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>.
- Liu, Guangyu, Christoph M. Tang, et Rachel M. Exley. 2015. « Non-Pathogenic *Neisseria*: Members of an Abundant, Multi-Habitat, Diverse Genus ». *Microbiology* 161 (7): 1297-1312. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000086>.
- Liu, Yi-Yun, Yang Wang, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, et al. 2016. « Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study ». *The Lancet Infectious Diseases* 16 (2): 161-68. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Ma, Mancheong, Daniel A. Powell, Nathan J. Weyand, Katherine A. Rhodes, María A. Rendón, Jeffrey A. Frelinger, et Magdalene So. 2018. « A Natural Mouse Model for *Neisseria* Colonization ». *Infection and Immunity* 86 (5): e00839-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00839-17>.
- Mackinnon, Fiona G., Andrew R. Goringe, Simon G.P. Funnell, et Andrew Robinson. 1992. « Intranasal Infection of Infant Mice with *Neisseria Meningitidis* ». *Microbial Pathogenesis* 12 (6): 415-20. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(92\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0882-4010(92)90004-8).
- MacLennan, Jenny, George Kafatos, Keith Neal, Nick Andrews, J. Claire Cameron, Richard Roberts, Meirion R. Evans, et al. 2006. « Social Behavior and Meningococcal Carriage in British Teenagers ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (6): 950-57. <https://doi.org/10.3201/eid1206.051297>.
- MacLennan, Jenny M., Charlene M. C. Rodrigues, Holly B. Bratcher, Aiswarya Lekshmi, Adam Finn, Jenny Oliver, Mandy Wootton, et al. 2021. « Meningococcal Carriage in Periods of High and Low Invasive Meningococcal Disease Incidence in the UK: Comparison of UKMenCar1–4 Cross-Sectional Survey Results ». *The Lancet Infectious Diseases* 21 (5): 677-87. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30842-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30842-2).
- Mankowski, Nicholas L., et Bruno Bordoni. 2021. *Anatomy, Head and Neck, Nasopharynx. StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557635/>.
- Mechergui, Arij, Wafa Achour, et Assia Ben Hassen. 2014. « Antibiotic Resistance among Commensal *Neisseria* Species ». *Reviews and Research in Medical Microbiology* 25 (4): 93-99. <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000013>.
- Millan, Alvaro San. 2018. « Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context ». *Trends in Microbiology* 26 (12): 978-85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>.

- Mineur, Yann S, et Wim E Crusio. 2002. « Behavioral and Neuroanatomical Characterization of FVB/N Inbred Mice ». *Brain Research Bulletin*, Behavioral Neurogenetics, 57 (1): 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00635-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00635-9).
- Morse, Stephen A. 1996. *Neisseria, Moraxella, Kingella and Eikenella. Medical Microbiology. 4th Edition*. University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7650/>.
- « Multiresistant organisms: bacteria and beyond : Current Opinion in Organ Transplantation ». s. d. Consulté le 12 mars 2023. https://journals.lww.com/co-transplantation/Abstract/2022/06000/Multiresistant_organisms__bacteria_and_beyond.5.aspx.
- Murray, Iain A., Tyson A. Clark, Richard D. Morgan, Matthew Boitano, Brian P. Anton, Khai Luong, Alexey Fomenkov, Stephen W. Turner, Jonas Korlach, et Richard J. Roberts. 2012. « The methylomes of six bacteria ». *Nucleic Acids Research* 40 (22): 11450-62. <https://doi.org/10.1093/nar/gks891>.
- Nasidze, Ivan, Jing Li, Dominique Quinque, Kun Tang, et Mark Stoneking. 2009. « Global diversity in the human salivary microbiome ». *Genome Research* 19 (4): 636-43. <https://doi.org/10.1101/gr.084616.108>.
- Novak, Natalija, Jörg Haberkant, Thomas Bieber, et Jean-Pierre Allam. 2008. « The Immune Privilege of the Oral Mucosa ». *Trends in Molecular Medicine* 14 (5): 191-98. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.03.001>.
- Nyongesa, Sammy, Martin Chenal, Ève Bernet, Florian Coudray, et Frédéric J. Veyrier. 2022. « Sequential Markerless Genetic Manipulations of Species from the Neisseria Genus ». *Canadian Journal of Microbiology*, mai, cjm-2022-0024. <https://doi.org/10.1139/cjm-2022-0024>.
- Nyongesa, Sammy, Philipp Weber, Eve Bernet, Francisco Pullido, Marta Nieckarz, Marie Delaby, Cecilia Nieves, et al. 2022. « Evolution of Multicellular Longitudinally Dividing Oral Cavity Symbionts (Neisseriaceae) ». Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1200288/v1>.
- Oliveira, Junio, et Wanda C. Reygaert. 2021. « Gram Negative Bacteria ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>.
- O'Neill, Jim. 2016. « Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations ». Report. Government of the United Kingdom. United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>.
- Quillin, Sarah Jane, et H Steven Seifert. 2018. « Neisseria gonorrhoeae host-adaptation and pathogenesis ». *Nature reviews. Microbiology* 16 (4): 226-40. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.169>.
- Rhodes, Katherine, Mancheong Ma, et Magdalene So. 2019. « A Natural Mouse Model for Neisseria Persistent Colonization ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1997: 403-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9496-0_23.
- Ritchot, Nathalie, et Paul H. Roy. 1990. « DNA Methylation in Neisseria Gonorrhoeae and Other Neisseriae ». *Gene* 86 (1): 103-6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90120-G](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90120-G).
- Rosadini, Charles V., et Jonathan C. Kagan. 2017. « Early innate immune responses to bacterial LPS ». *Current opinion in immunology* 44 (février): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.005>.
- Sáez Nieto, J. A., C. Marcos, et A. Vindel. 1998. « Multicolonization of Human Nasopharynx Due to Neisseria Spp ». *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 1 (1): 59-63.
- Shah, Nita R., Robert E. W. Hancock, et Rachel C. Fernandez. 2014. « Bordetella Pertussis Lipid A Glucosamine Modification Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides

- and Increases Resistance to Outer Membrane Perturbation ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (8): 4931-34. <https://doi.org/10.1128/AAC.02590-14>.
- « Single Molecule Real Time Sequencing - an overview | ScienceDirect Topics ». s. d. Consulté le 7 octobre 2022. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/single-molecule-real-time-sequencing>.
- Song, Wenxia, Lang Ma, Ruiwu Chen, et Daniel C. Stein. 2000. « Role of Lipooligosaccharide in Opa-Independent Invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into Human Epithelial Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (6): 949-60.
- « Stereotypy – Mouse Ethogram ». s. d. Consulté le 4 juillet 2022. <https://mousebehavior.org/stereotypy/>.
- Tchoupa, Arnaud Kengmo, Tamara Schuhmacher, et Christof R. Hauck. 2014. « Signaling by epithelial members of the CEACAM family – mucosal docking sites for pathogenic bacteria ». *Cell Communication and Signaling* 12 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-27>.
- Toleman, Mark, Ellen Aho, et Mumtaz Virji. 2001. « Expression of Pathogen-like Opa Adhesins in Commensal *Neisseria*: Genetic and Functional Analysis ». *Cellular Microbiology* 3 (1): 33-44. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00089.x>.
- Tønjum, Tone, et Jos van Putten. 2017. « 179 - *Neisseria* ». In *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, édité par Jonathan Cohen, William G. Powderly, et Steven M. Opal, 1553-1564.e1. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00179-9>.
- Trent, M. Stephen. 2013. « Fortifying the Barrier: The Impact of Lipid A Remodelling on Bacterial Pathogenesis ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (7): 467-81. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3047>.
- Unemo, Magnus, et William M. Shafer. 2014. « Antimicrobial Resistance in *Neisseria Gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (3): 587-613. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-14>.
- Veyrier, Frédéric J., Nicolas Biais, Pablo Morales, Nouria Belkacem, Cyril Guilhen, Sylvia Ranjeva, Odile Sismeiro, et al. 2015. « Common Cell Shape Evolution of Two Nasopharyngeal Pathogens ». *PLoS Genetics* 11 (7): e1005338. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005338>.
- Vogel, Ulrich, et Heike Claus. 2011. « Vaccine Development against *Neisseria Meningitidis* ». *Microbial Biotechnology* 4 (1): 20-31. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00178.x>.
- Wang, Guangshun, Jayaram Lakshmaiah Narayana, Biswajit Mishra, Yingxia Zhang, Fangyu Wang, Chunfeng Wang, D. Zarena, Tamara Lushnikova, et Xiuqing Wang. 2019. « Design of Antimicrobial Peptides: Progress Made with Human Cathelicidin LL-37 ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1117: 215-40. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_12.
- Wang, Hanqing, Zongyan Chen, Xiaoxu Wang, Ning Li, Jianzhong Wei, Pei Sun, Guijun Wang, et Guangqing Liu. 2014. « Isolation and Characterization of a *Neisseria* Strain from the Liver of a Chinese Peking Duck ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 25 (juillet): 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.016>.
- Wetzler, L. M., M. S. Blake, K. Barry, et E. C. Gotschlich. 1992. « Gonococcal Porin Vaccine Evaluation: Comparison of Por Proteosomes, Liposomes, and Blebs Isolated from Rmp Deletion Mutants ». *The Journal of Infectious Diseases* 166 (3): 551-55. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.3.551>.
- Wilkinson, A. E. 1952. « Occurrence of *Neisseria* Other than the *Gonococcus* in the Genital Tract ». *The British Journal of Venereal Diseases* 28 (1): 24-27. <https://doi.org/10.1136/sti.28.1.24>.
- Xiong, Mingzhou, Lina Lan, Tiejian Feng, Guanglu Zhao, Feng Wang, Fuchang Hong, Xiaobing Wu, et al. 2016. « Analysis of the Sex Ratio of Reported Gonorrhoea Incidence in

- Shenzhen, China ». *BMJ Open* 6 (3): e009629. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009629>.
- Yang, Jun, Hai-Hong Wang, Yaoyao Lu, Ling-Xian Yi, Yinyue Deng, Luchao Lv, Vincent Burrus, et Jian-Hua Liu. 2021. « A ProQ/FinO Family Protein Involved in Plasmid Copy Number Control Favours Fitness of Bacteria Carrying Mcr-1-Bearing IncI2 Plasmids ». *Nucleic Acids Research* 49 (7): 3981-96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab149>.
- Yang, Qiu E., Craig MacLean, Andrei Papkou, Manon Pritchard, Lydia Powell, David Thomas, Diego O. Andrey, et al. 2020. « Compensatory Mutations Modulate the Competitiveness and Dynamics of Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Escherichia Coli Clones ». *The ISME Journal* 14 (3): 861-65. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0578-6>.
- Yazdankhah, Siamak P., et Dominique A. Caugant. 2004. « Neisseria Meningitidis: An Overview of the Carriage State ». *Journal of Medical Microbiology* 53 (Pt 9): 821-32. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45529-0>.
- Zaura, Egija, Bart JF Keijsers, Susan M. Huse, et Wim Crielaard. 2009. « Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities ». *BMC Microbiology* 9 (1): 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>.
- Zouheir, Yassine, Taha Atany, et Najma Boudebouch. 2019. « Emergence and Spread of Resistant N. Meningitidis Implicated in Invasive Meningococcal Diseases during the Past Decade (2008–2017) ». *The Journal of Antibiotics* 72 (3): 185-88. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0125-0>.

ANNEXE 1 : TABLEAU DES AMORCES

Nom des couples d'amorces	Amorce 5'	Amorce 3'
Lacta EcoRV (Région5'3')	5' - gaagatactcttggcaacagctctttgcag-3'	5' - accgataccggatggagaatattccgcaat-3'
Lacta BgII (Ajout RS BgII)	5' - caaaaatcaggaacaagcagatctgaattcaagccgcagacagtaacaatag-3'	5' - atttgaactgctggcgcttgaattcagatctcgtcgtctgcttcatatttg-3'
Poly Scal (Région5'3')	5' - gaaagtcigctcaggctgctctatttc-3'	5' - accagctactgataaaggccgcagaaaatca-3'
Poly BgII (Ajout RS BgII)	5' - gaaataagcgcttttcaactgtaagatcigatctcagagtggaatcagccggg-3'	5' - ccggcagatccatcctcgtggaattcagatcttcaagtgaaaagctcgtctatttc-3'
Cine SmaI (Région5'3')	5' - gaaccgggtagcacaacaatataaaacca-3'	5' - accccgggttagggcaaatgggacag-3'
5' Cine BgII (Ajout RS BgII)	5' - cgctcttttaagttataatagatcgaattcccgttccaattattcg-3'	5' - cgaataatggaaacggggaattcagatctattataaactgtaaaaagagcag-3'
Eram (Erythromicine NheI/SpeI)	5' - atccaggctagcgcacaacttaagaagtggttg-3'	5' - taaactagtcgattaagcttgcgctcigaag-3'
Km6/7 (Kanamycine NheI/SpeI)	5' - atgtctagcccagcgaaccattggagg-3'	5' - ttcaactagtgatgctcgtcgaatgctttttagacatcaataatctagg-3'
Hcaacam (Génotype souris)	5' - CACCATGCCCAGCTAATTTT-3'	5' - GTGGTCTGTTGCTCCAGAT-3'
MireB <i>Simonsiella muelleri</i>	5' - ATGATGGATCCTTAAAAATTAGTTTGTAGTAAAAATCTG-3'	5' - GGCTGTGCGAGTGGTTGGCTGTATGGATTATGATAAAAAATTGAG-3'
MireB <i>Neisseria muscui</i>	5' - TGAAGACGGGTGTGATTGCC-3'	5' - CGTTGGAGCTGATGGTGAAG-3'
Promoteur <i>Neisseria muscui</i>	5' - atcactaggaatctgctcagatctacg-3'	5' - GTGATGAAAAAGCGGAAACATAACAATTTCTTAATGTGGATATATTTTG-3'

ANNEXE 2 : PROJET ANNEXE : EFFETS DU GÈNE *MREB* SUR LA MORPHOLOGIE DE *NEISSERIA MUSCULI* : ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Mise en contexte et résultats :

Le gène *MreB* est un gène de régulation capital pour le maintien de la morphologie bactérienne. En effet, c'est l'équivalent de l'actine des eucaryotes. Ce gène régulateur est capital pour la croissance et la formation du PG, car sa délétion amène à une perte de la forme allongée et l'acquisition d'une morphologie de coque (ceci dans plusieurs espèces bactériennes, dont les *Neisseria*) (Höltje 1998; Veyrier et al. 2015). Le gène *MreB* de *S. muelleri* est particulièrement intéressant, car c'est une bactérie à morphologie MulDi, très différente de la forme bacille. De plus, la bactérie *N. musculi* a été sélectionnée pour sa capacité à facilement être introduite dans les modèles d'infections murins. Le but de cette approche est de déterminer si les différences morphologiques induites par le changement de *mreB* ont une influence sur le tropisme de la bactérie dans un modèle murin, avec l'exemple de *mreB_{Sm}*. En plus de l'observation de la morphologie, la localisation du gène *mreB* à souhaiter être déterminé pour voir si ce paramètre était lui aussi modifié. Pour ce faire, *mreB_{Simon}* a été fusionné avec la GFP et ensuite observé par microscopie confocale.

Après avoir vérifié la construction par une enzyme de restriction, le plasmide linéarisé a été transformé dans *N.musculi*. Les clones ont dans un premier temps été vérifiés par PCR colony avec les couples d'amorces *mreB_{Simonsiella muelleri}* et *mreB_{Neisseria musculi}* pour déterminer la présence de *mreB_{Sm}* et l'absence de *mreB_{N.muscu}* (Figure 33). Les amorces sont spécifiques de chaque gène *mreB* et amplifient une partie d'environ 500 pb pour chacun. Pour valider les résultats de la PCR, un séquençage du clone a permis de valider que *mreB_{Sm}GFP* c'était bien inséré à la place de *mreB_{N.muscu}* (Figure 36).

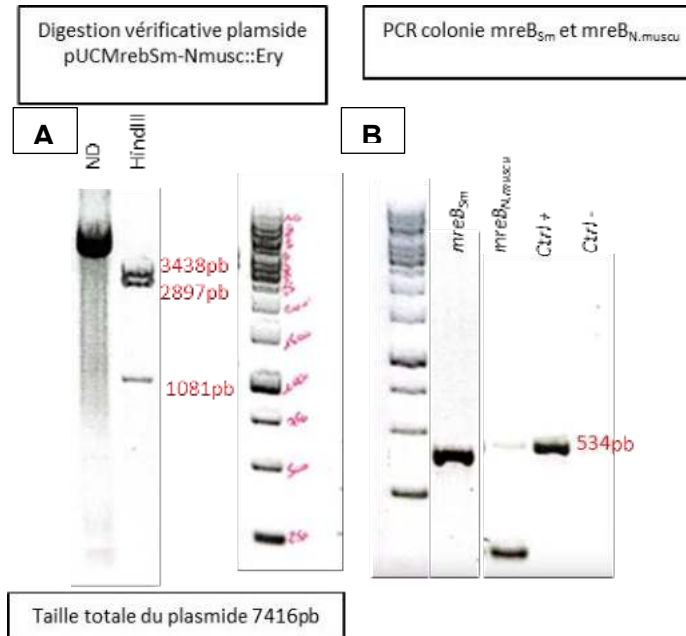


Figure 33 : : Transformation du plasmide pUCMrebSm-Nmuscu::Ery dans *N. muscui lux*. A) Le plasmide à dans un premier état vérifier par digestion avec l'enzyme HindIII. B) Après transformation, les clones ont été testés par PCR colony à partir des amorces mreB Simonsiella muelleri et mreB *Neisseria muscui*. Le clone présenté en figure était bien positif à mreB_{Sm} et négatif à mreB_{N.muscu}.

Après avoir validé les clones *muscui* MreB_{Sm}GFP l'étude de la morphologie a pu commencer. En effet par microscopie électronique on observe que les clones MreB_{Sm}GFP sont tous de forme de coque, arborant des diamètres différents par rapport à la forme bacille de *N. muscui* sauvage. La morphologie bacille a été perdue lors du remplacement du gène. On a bien un changement de forme pour les mutants montrant que l'insertion du gène à bien induit un phénotype (Figure 34A et B).

Pour ce qui est des images de microscopies confocal, les mutants MreB_{Sm}GFP n'émettent pas un signal lumineux intense. En effet, à comparer de la souche sauvage, on observe bien la présence d'un signal lumineux, mais il est très diffus et est réparti dans toute la bactérie (Figure 34C et D).

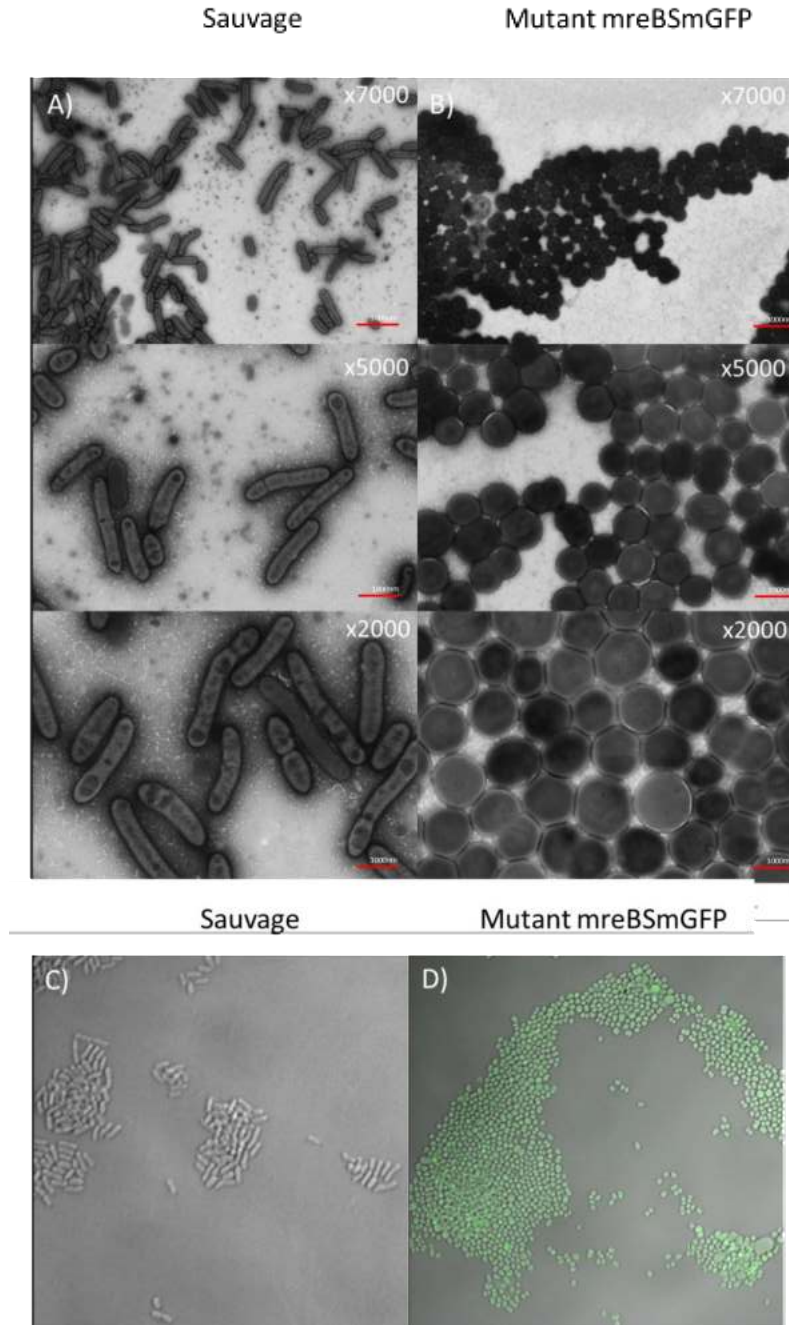


Figure 34 : Comparaison morphologique des clones, *Neisseria musculi* mreBSmGFP et *Neisseria musculi* sauvage. Les images des sous-figures A) et B) ont été obtenues par microscopie électronique à transmission à magnification x7000, x5000 et x2000 et les images des sous-figures C) et D) ont été acquises par microscopie confocale et acquisition de la fluorescence de la GFP (En vert).

Pour déterminer si la morphologie coque était bien causée par le gène *mreB* et pas la présence de la GFP, la construction pUCmreBsmGFP-Mmusc::Ery a été réalisée. Le plasmide a été cloné dans *N. musculi* et observé par microscopie électronique (Figure 35). Encore une fois, la présence

du gène *mreB* a induit la forme coque chez les clones *N. muscoli*. L'ensemble de ces résultats nous permet de lier la perte de la morphologie bacille par la présence du gène *mreB_{Sm}*. Pour valider nos résultats le plasmide pUCMrebSmØGFP-Mmusc::Ery à lui aussi été séquencer (Figure 35).

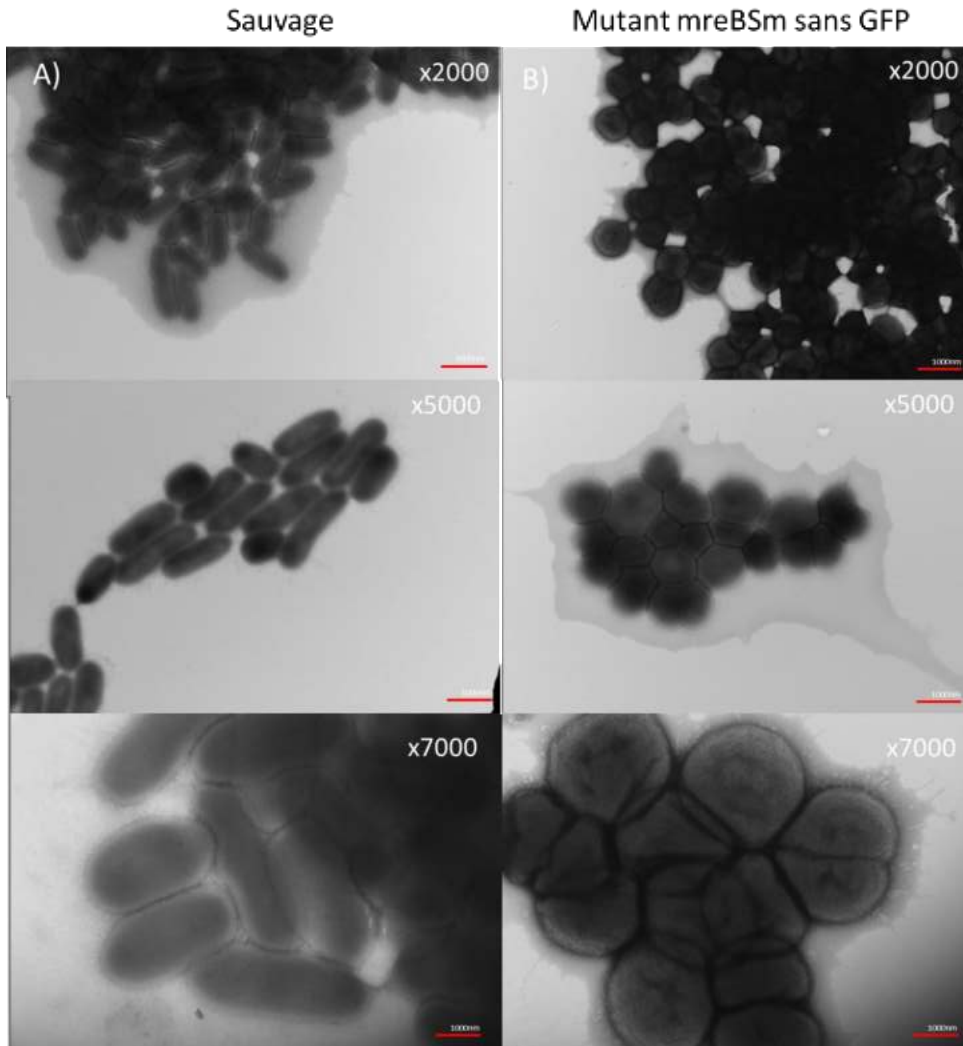


Figure 35 : : Comparaison morphologique des clones, *Neisseria muscoli* mreBSimonØGFP et *Neisseria muscoli* sauvage. Les images des sous-figures A) et B) ont été obtenues par microscopie électronique à transmission à magnification x7000, x5000 et x2000.

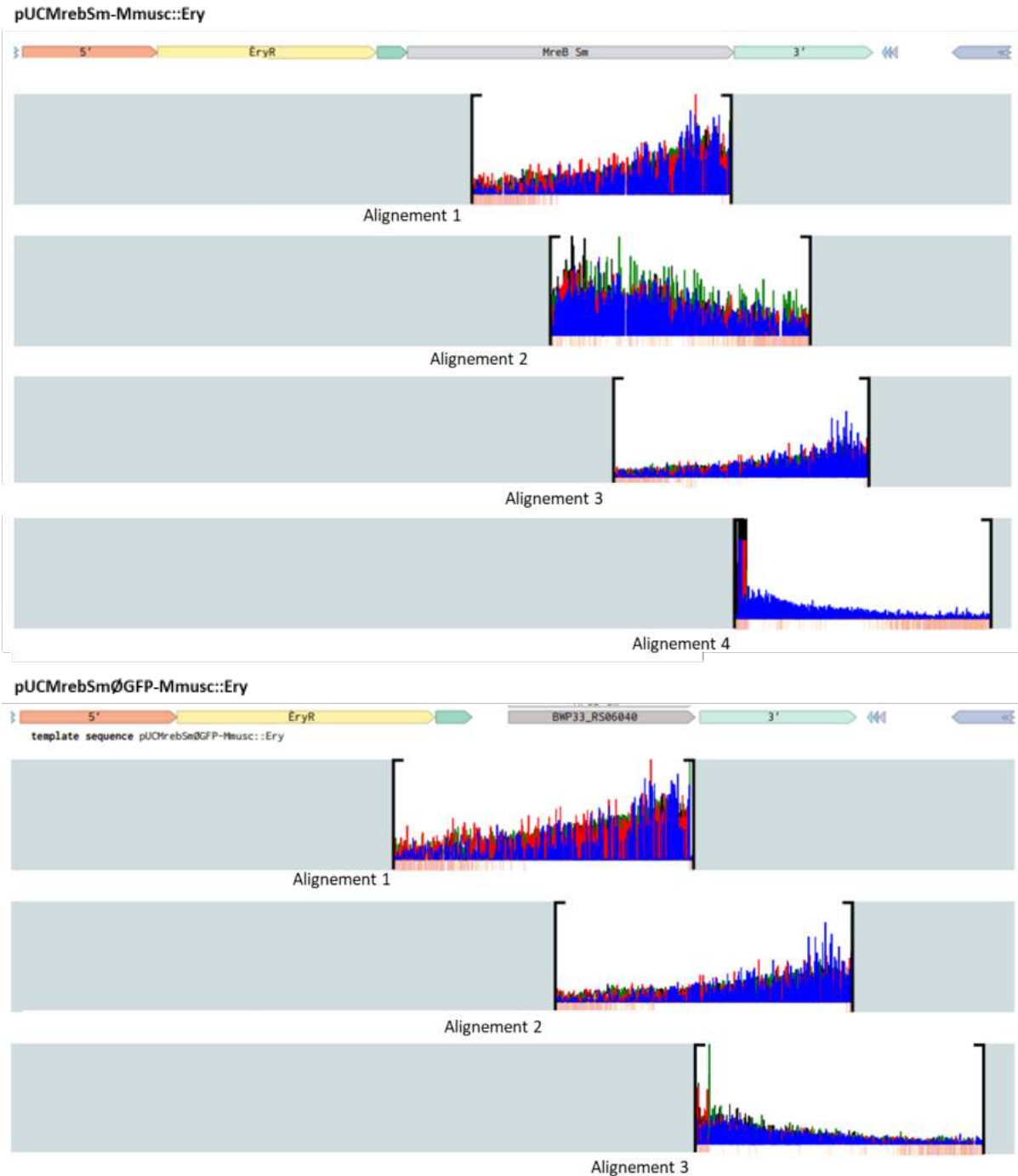


Figure 36 : Séquençage Sanger des plasmides pUCMrebSm-Mmusc::Ery et pUCMrebSmØGFP-Mmusc::Ery. Chaque pic sur les alignements correspond à un nucléotide reconnu. Lorsqu'on regarde les alignements, certains pics sont manquants, mais si cette absence n'est pas présente sur le deuxième alignement, alors, on considère qu'il y a une erreur de séquençage. Si on regarde les alignements pour chaque plasmide, on n'observe pas de « gap » présent sur les alignements donc les constructions plasmiques sont validées.

Discussion des résultats :

En ce qui concerne les essais sur *mreB*, l'ensemble des tests qui ont été réalisés sont encore assez préliminaires. Le gène a déjà été étudié comme acteur dans la régulation de la morphologie par le laboratoire. En insérant le gène *mreB* de l'espèce *S. muelleri*, (une bactérie multicellulaire) dans *N. elongata* (Un bacille), on a constaté un allongement de la forme bacille de *N. elongata* (Nyongesa, Weber, et al. 2022). Il paraissait donc intéressant de continuer à étudier l'influence de *MreB_{Simon}* sur la morphologie avec d'autres espèces pour savoir si le phénotype était conservé. Lors de l'acquisition des images au microscope électronique à transmission, les mutants

N. musculi mreB_{Sm}GFP avaient tous un phénotype de coque. La première hypothèse était qu'en s'insérant *MreB_{Sm}GFP* aurait induit une inactivation du domaine, créant alors un mutant avec un domaine MreB inactif (*Knock-out*) et un phénotype de coque. Cependant, lors que la souche *MreB_{Sm}ØGFP* a été observée au microscope électronique, le phénotype coque était aussi présent. La présence de la GFP n'a donc pas l'air d'influencer le phénotype qui reste le même avec ou sans le marqueur. On notera que l'acquisition de la forme coque a été observé lors de la délétion du locus de *mreB* chez *N. elongata*, une espèce bacille (Veyrier et al. 2015). Des essais supplémentaires sur la construction plasmidique ont été réalisés par le laboratoire. En effet, le plasmide pUCMrebGFPNmusc::Ery a été généré. Ce plasmide contient une version GFP du gène *mreB* provenant de *N. musculi* et là encore le phénotype coque était observé (Figure 37).

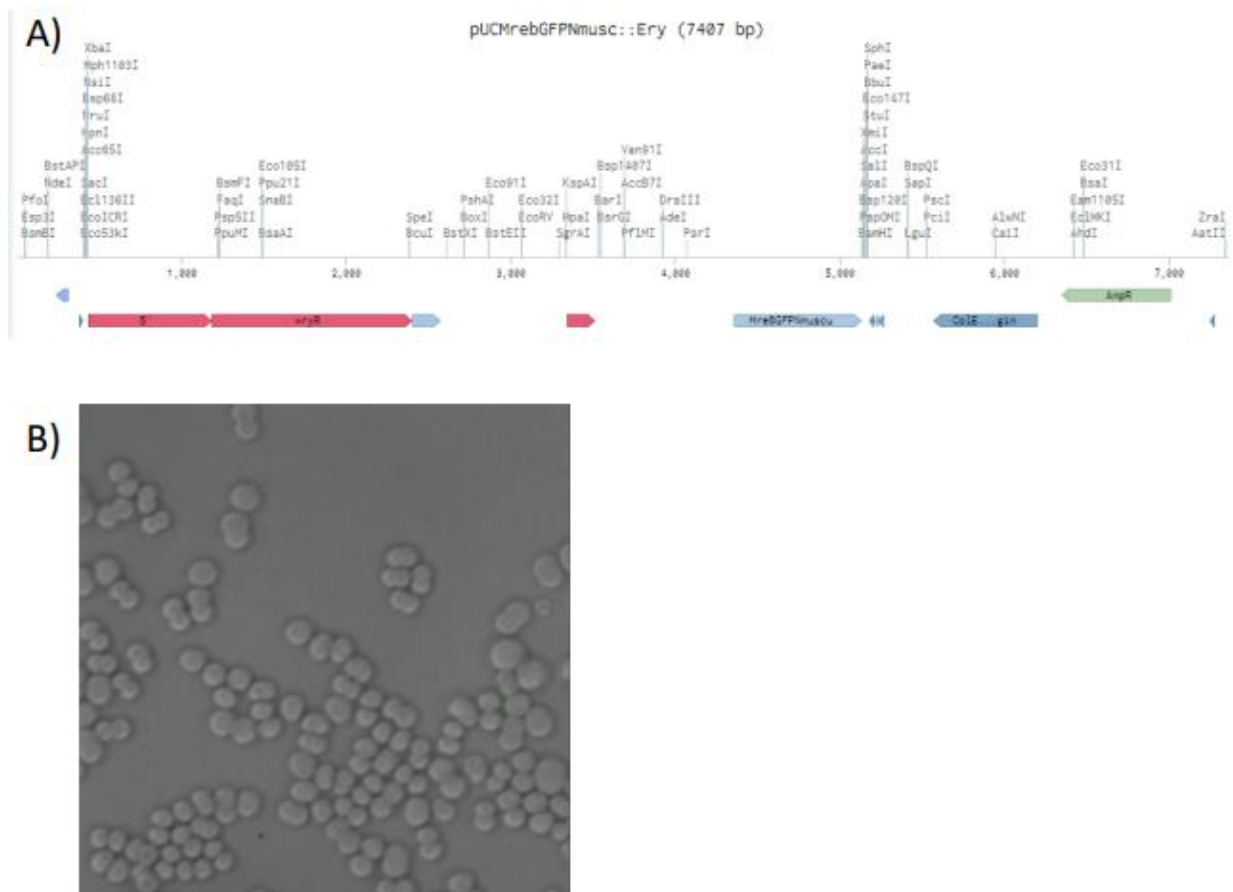


Figure 37 : La construction pUCMrebGFPNmusc::Ery possède aussi un phénotype de coque. A) Construction plasmidique de pUCMrebGFPNmusc::Ery, le plasmide doit exprimer le gène *mreB* de l'espèce *N. muscui* ainsi que la GFP. B) Acquisition des clones par microscopie confocale.

On soupçonne donc que la construction serait en cause du phénotype coque, car l'insertion du gène de la même espèce ne devrait pas modifier le phénotype. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer lequel des éléments du plasmide empêcherait l'expression du gène *mreB* et induirait le phénotype choqué. Une hypothèse serait que le promoteur ne soit pas fonctionnel et donc empêcherait l'expression du gène *mreB*. Lorsque les problèmes de constructions seront résolus, il serait intéressant de tester si ce phénotype est toujours présent dans les espèces déjà tester mais aussi dans d'autres espèces de *Neisseria* de forme bacille comme *Neisseria elongata*, un commensal de l'humain, ou dans d'autres phénotypes morphologiques pour être plus à même de comprendre les différents gènes *mreB* au travers de la famille des *Neisseriaceae*. De même pour les futures expériences, les souches mutées pourront être utilisées dans des modèles animaux pour étudier la colonisation de la cavité orale des souris

ou du nasopharynx, mais aussi les autres paramètres qui pourraient être modifiés comme la variation de la virulence des souches ou les mécanismes de résistance aux antibiotiques par exemple.

Pour ce qui est des images de microscopie confocal obtenues pour le mutant *mreB_{Sm}GFP*, la fluorescence des bactéries était diffuse et très faible. En effet, un signal n'était pas concentré dans une zone précise de la bactérie, mais plutôt de manière homogène dans toute la cellule. Si on regarde la littérature, on sait que les protéines MreB sont distribuées de manière hélicoïdale sur tout le contour de la bactérie chez les morphologies bacilles (Errington 2015; Hussain et al., s. d.). Les images du confocal peuvent faire penser que MreB pourrait être distribué sur l'ensemble de la paroi bactérienne, mais il n'est pas possible de voir si c'est sous forme de filaments hélicoïdaux. Pour creuser cette piste, il serait intéressant d'utiliser des techniques pour pouvoir traquer en temps réel le mouvement de MreB lors de la mise en place de la morphologie bactérienne pour déterminer sa conformation chez nos mutants. Une technique envisageable serait la microscopie à illumination structurée (SIM), qui permet l'excitation de très petits fluorophores de manière spécifique et super résolutive. Cette technique est principalement utilisée pour suivre le mouvement de petites molécules ou de petits complexes proches de la surface cellulaire, ce qui serait idéal pour suivre MreB (Errington 2015).