

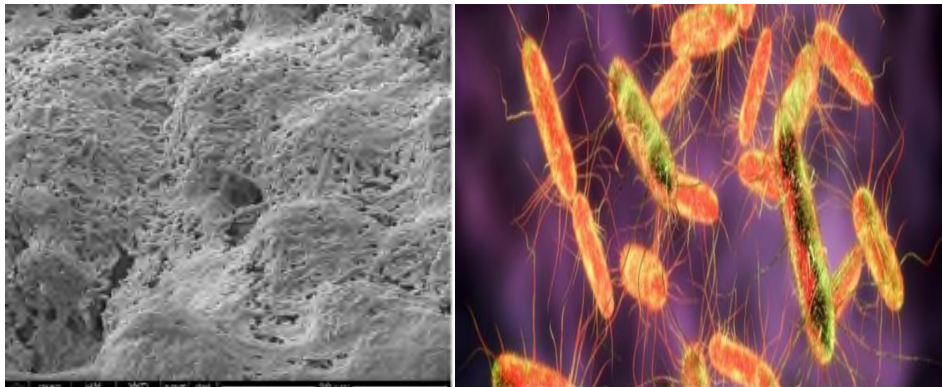
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie**

Cours de

Pathogénies des bactéries



**Mlle. YANAT Betitera
(Maître de conférences classe B)**

Année universitaire 2019/2020

Table des matières

Liste des figures et tableaux

Préface

Introduction

I. Notion de virulence et de pouvoir pathogène	1
II. Critères de virulence	2
II.1. Relation hôte-pathogène	2
II.2. Dose infectieuse.....	3
III. Postulat de Kock.....	4

Chapitre I. Facteurs de virulence

I. Pénétration dans l'organisme (voies de contamination)	8
II. Colonisation et adhésion.....	8
III. Invasion	22
III.1. Invasion extracellulaire.....	22
III.2. Invasion intracellulaire.....	23
III.3. Systèmes de sécrétion.....	26
IV. Pouvoir toxigène.....	40
V. Echappement aux mécanismes de défenses de l'hôte	59

Chapitre II. Évolution des bactéries pathogènes

I. Bases génétiques et moléculaires de la virulence	72
I. I.1. Support génétique de la virulence	72
I.1.1.1. Les îlots de pathogénicité.....	72
I.1.1.2. Les bactériophages	74
I.1.1.3. Les plasmides.....	75
I.2. Régulation des gènes de virulence	77
I.2.1. Le quorum sensing (QS).....	77
I.2.3. Les facteurs sigma	79
I.2.4. Les systèmes à deux composants	79
I.3. Progrès dans la compréhension de la pathogenèse des bactéries à partir du "Whole Genome Sequencing"	80
II. Résistance aux antibiotiques	82
II.1. Émergence des souches multirésistantes aux antibiotiques.....	82
II.2. Lien entre la résistance et la virulence	84
II.3. Coût biologique de la virulence et de la résistance	86

Chapitre III. Nouvelles stratégies pour combattre les bactéries pathogènes

I. Potentiel thérapeutique des sidérophores	88
II. Élaboration de vaccins	89
III. Inhibiteur de système de sécrétion	90
IV. Substances antibiofilm	90
V. Inhibiteur de toxines	91
VI. Application des outils CRISPR pour le développement d'antibiotiques intelligents.....	92

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1. La détermination de la DL ₅₀ d'un microorganismes pathogène.....	3
Figure 2. Postulats de Koch appliqués à la tuberculose	5
Figure 3. Modèle conceptuel de bactéries se fixant à l'épithélium intestinal	11
Figure 4. Adhésion bactérienne à la cellule-hôte chez <i>E. coli</i>	14
Figure 5: Structure du flagelle	15
Figure 6. Diagramme schématique de l'infection et de la pathogenèse à <i>Helicobacter pylori</i>	16
Figure 7. <i>P. aeruginosa</i> provenant d'expectorations d'un patient atteint de mucoviscidose ..	18
Figure 8. Les différentes étapes de formation et de développement du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	19
Figure 9. Micrographie SEM d'un implant récupéré à cinq jours montrant un nombre massif de cocci partiellement occlus par un matériau déshydraté	20
Figure 10. Modèle de développement du biofilm de <i>S. aureus</i>	21
Figure 11. Bactéries intracellulaire obligatoires et facultatives	24
Figure 12. Représentation schématique des différents mécanismes dépendant des systèmes de sécrétion de type IV.....	32
Figure 13. Représentation schématique des systèmes de sécrétion	39
Figure 14. Les associations possibles entre A et B des toxines AB.....	44
Figure 15. Le mode d'action des exotoxines bactériennes de type AB	45
Figure 16. La leucocidine chez <i>S. aureus</i>	47
Figure 17. Cycle d'infection intracellulaire de <i>L. monocytogenes</i> productrice de la toxine LLO formant des pores sur la vacuole	48
Figure 18. Mécanisme moléculaire du blocage de la neuroexocytose par les neurotoxines botuliques et tétanique	50
Figure 19. Manifestations cliniques du tétanos (a) et du botulisme (B)	50
Figure 20. Représentation schématique du mécanisme d'intoxication des cellules épithéliales par la toxine CNF1 des <i>E. coli</i> uropathogènes (UPEC).	52
Figure 21. Contribution de la toxine pertussique (PT) et de la toxine adénylate cyclase (ACT) à la pathogénicité de <i>Bordetella pertussis</i>	54
Figure 22. Mécanismes moléculaires de la virulence de <i>B. anthracis</i>	55
Figure 23. Mécanismes d'action des Shiga-toxines STEC (<i>E. coli</i> producteur de Shiga-toxine	56
Figure 24. Modèle d'interaction des superantigènes avec l'antigène HLA de classe II et avec la chaîne Vβ du récepteur du lymphocyte T.....	58
Figure 25. Quatre facteurs de virulence bien caractérisés chez les patients classiques et hypervirulents des souches de <i>K. pneumoniae</i>	61
Figure 26. Représentation schématique des multiples mécanismes de résistance développés par les bactéries pour surmonter les peptides antimicrobiens de l'hôte.....	63
Figure 27. Mécanismes antimicrobiens développés par <i>M. tuberculosis</i> au sein du phagosome.....	65
Figure 28. Trafic de sidérophores chez les bactéries Gram-positives et Gram- négatives.....	70
Figure 29. Relation des fonctions SPI de <i>S. enterica</i>	74
Figure 30. Réseau QS hiérarchique chez <i>P. aeruginosa</i> et régulation des facteurs de virulence	78
Figure 31. Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	83
Figure 32 . Expression de l'ARN précurseur et de l'ARN Traceur par les gènes CRISPR puis traitement de ces ARN par la protéine Cas et l'ARNase pour former les ARN-guides et le	

complexe nucléoprotéique de surveillance de la cellule	93
Figure 33. Concept du système CRISPR-Cas9 comme stratégie antimicrobienne.....	93

Liste des tableaux

Tableau I. Quelques bactéries d'intérêt médical.....	7
Tableau II. Facteurs de virulence impliqués dans la dissémination des bactéries pathogènes dans le corps d'un hôte mammifère	25
Tableau III. Quelques propriétés générales d'endotoxines et d'exotoxines typiques.....	42
Tableau IV. Classification des exotoxines bactériennes selon leur mode d'action	43
Tableau V. Stratégies d'échappement au système immunitaire des bactéries intracellulaires.....	66
Tableau VI. Eléments génétiques mobiles associés à la pathogénicité chez <i>E. coli</i> 157:H7.....	76
Tableau VII. Facteurs pouvant influencer l'évolution future de la virulence et de la résistance aux antibiotiques.....	81

PRÉFACE

Afin de comprendre le concept de pathogénèse, il est important d'avoir une vision claire et de comprendre ce qu'est un pathogène. Les agents pathogènes sont des micro-organismes, y compris des bactéries qui possèdent les tendances génétiques et phénotypiques à provoquer des maladies chez l'Homme et les animaux, et leurs facteurs de virulence jouent un rôle essentiel dans les interactions hôte-pathogène qui conduisent à la morbidité et à la mortalité. Les bactéries peuvent causer une multitude d'infections différentes, allant de la gravité à la fulmination. Un nombre limité d'espèces bactériennes sont responsables de la majorité des maladies infectieuses chez les individus en bonne santé. En raison du succès de la vaccination, des antibiotiques et des mesures efficaces de santé publique, jusqu'à récemment, les épidémies étaient considérées comme une chose du passé. En raison du développement d'organismes résistants aux antibiotiques, cette situation évolue rapidement.

La pathogénèse concerne à la fois le mécanisme de l'infection et le mécanisme par lequel la maladie se développe. La pathogénèse est un processus multifactoriel qui dépend du statut immunitaire de l'hôte, de la nature de l'espèce ou de la souche (facteurs de virulence) et du nombre d'organismes dans l'exposition initiale. Il faut comprendre que les mécanismes pathogènes de nombreuses maladies bactériennes sont mal compris, tandis que ceux d'autres ont été prouvés au niveau moléculaire. L'importance relative d'une maladie infectieuse pour la santé des humains et des animaux ne coïncide pas toujours avec la profondeur de notre compréhension de sa pathogénèse. Toutefois, l'avènement du séquençage du génome, en particulier des technologies de nouvelle génération, a vu une révolution dans l'étude de l'évolution des agents pathogènes au cours des ces dernières années.

Destiné aux étudiants Master 1 en microbiologie fondamentale et toute personne s'intéressant au domaine de la microbiologie médicale, l'objectif de ce cours est de fournir un aperçu des nombreux facteurs de virulence bactériens et, si possible, d'indiquer comment ils interagissent avec les mécanismes de défense de l'hôte et de décrire leur rôle dans la pathogénèse de la maladie en citant quelques exemples de bactéries pathogènes afin d'obtenir une compréhension globale de la virulence bactérienne, de son émergence, de son maintien et de son évolution.

Ce polycopié est axé autour de trois chapitres en ayant introduit auparavant quelques notions sur la virulence et le pouvoir pathogène. Le premier chapitre est consacré aux différents facteurs de virulences que peuvent posséder les bactéries pathogènes. Le second chapitre concerne l'évolution des bactéries pathogènes incluant notamment l'acquisition des éléments génétiques mobiles qui portent les gènes de virulence et les systèmes de régulation de ces gènes, ainsi que l'acquisition de plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques. Et enfin, le troisième chapitre porte sur les nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettront de combattre ces bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques en ciblant leurs facteurs de virulence.

INTRODUCTION

I. Notion de virulence et de pouvoir pathogène

La pathogénicité et la virulence sont des termes qui se réfèrent à la capacité d'un organisme à provoquer une maladie. **La pathogénicité** (notion qualitative) est la capacité d'un germe à provoquer des maladies et à infliger des dommages à son hôte et est déterminée par ses facteurs de virulence, tandis que **la virulence** (notion quantitative) est la mesure de la pathogénicité d'un organisme. Le degré de virulence est directement lié à la capacité de l'organisme à provoquer la maladie malgré les mécanismes de résistance de l'hôte; il est affecté par de nombreuses variables telles que le nombre de bactéries infectantes, la voie d'entrée dans le corps, les mécanismes de défense spécifiques et non spécifiques de l'hôte et les facteurs de virulence de la bactérie.

La capacité d'une bactérie à provoquer une maladie reflète sa pathogénicité relative. Sur cette base, les bactéries peuvent être organisées en trois groupes principaux:

- ❖ **Les agents pathogènes:** Lorsqu'ils sont isolés d'un patient dont le système immunitaire est normal, ils sont considérés comme des agents probables de la maladie (par exemple, lorsque la cause de la maladie diarrhéique est identifiée par l'isolement en laboratoire de *Salmonella spp.* À partir des matières fécales).
- ❖ **Les agents pathogènes opportunistes** sont ceux isolés chez des patients dont les mécanismes de défense de l'hôte ont été compromis. De nombreux agents pathogènes opportunistes telles que *Staphylococcus* à coagulase négative et *Escherichia coli* font partie intégrante du microbiote normal humain et sont généralement portés sur les surfaces de la peau et des muqueuses. Ils peuvent développer une maladie lorsqu'ils sont introduits dans des sites du corps humain où ils ne sont pas trouvés normalement (infections des voies urinaires avec *E. coli*) ou dans le cas d'utilisation d'antibiotiques à large spectre (déséquilibre du microbiote intestinal qui permet donc à *Clostridium difficile* de coloniser le tube digestif et de provoquer une colite pseudo-membraneuse).

- ❖ **Les agents non-pathogènes:** Certaines bactéries, telles que *Lactobacillus acidophilus*, sont considérées comme non pathogènes, car elles causent rarement ou jamais des maladies chez l'Homme. Leur catégorisation en tant que non-pathogènes peut, cependant, changer en raison de l'adaptabilité des bactéries et de l'effet néfaste de la radiothérapie moderne, de la chimiothérapie et de l'immunothérapie sur les mécanismes de résistance. En fait, certaines bactéries précédemment considérées comme non pathogènes sont maintenant connues pour causer des maladies. *Serratia marcescens*, par exemple, est une bactérie du sol commune qui cause la pneumonie, les infections des voies urinaires et la bactériémie chez les hôtes fragilisés.

II. Critères de virulence

II.1. Relation hôte-pathogène

Au milieu du 20^{ème} siècle, l'idée que la virulence était uniquement une propriété microbienne avait été largement abandonnée, et la plupart des autorités ont défini la virulence dans le contexte de la relation hôte-pathogène. En effet, la virulence des bactéries pathogènes ne peut être mise en évidence tant qu'il n'y a pas d'interaction mutuelle entre les agents pathogènes et les hôtes (humains et animaux). Les caractéristiques des surfaces microbiennes sont considérées comme étant des déterminants critiques de la virulence des micro-organismes. La spécificité de pathogènes bactériens envers divers lignées cellulaires et compartiments cellulaires de l'hôte conduisent à l'interaction hôte-pathogène qui génère une virulence potentielle. Dès lors, les voies métaboliques des agents pathogènes sont régulées durant le processus d'infection afin de s'adapter aux conditions dynamiques de l'environnement de l'hôte et qui sont également spécifiques aux hôtes. L'agent infectieux doit pouvoir traverser les barrières de protection qui abritent l'hôte de l'environnement, il doit être capable de survivre aux nombreux mécanismes de défense, cellulaire et humoral, qui l'attaquent dès qu'il atteint les tissus; il doit trouver un environnement propice à la multiplication; et enfin, il doit être capable de produire des maladies, c'est-à-dire de produire des substances ou conditions qui provoquent des troubles physiologiques et perturbations pathologiques.

II.2. Dose infectieuse

La virulence peut être mesurée expérimentalement en déterminant le nombre de bactéries nécessaires pour provoquer la mort, la maladie ou les lésions des animaux au cours d'une période définie après l'administration des bactéries par une voie désignée. Par conséquent, les calculs d'une dose létale affectant 50% d'une population d'animaux (DL50) ou d'une dose efficace provoquant un symptôme de maladie dans 50% d'une population d'animaux (ED50) sont utiles pour comparer la virulence relative de différentes bactéries (Fig1).

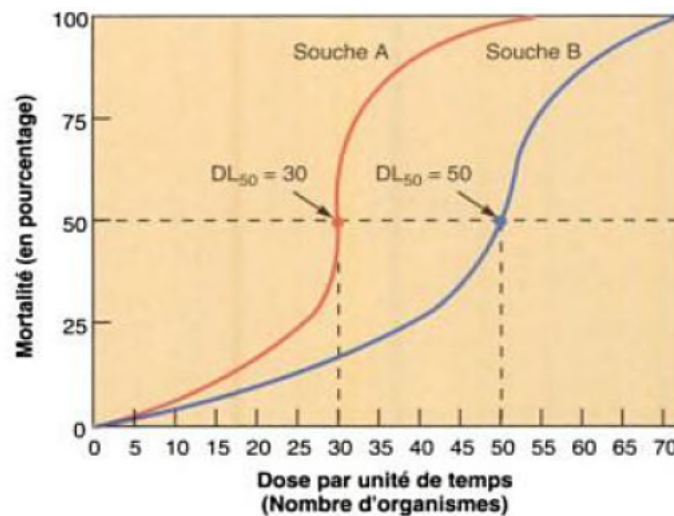


Figure 1. La détermination de la DL₅₀ d'un microorganismes pathogène.

On injecte différentes doses d'un agent pathogène spécifique à des animaux d'expérience utilisés comme hôte. On détermine le taux de mortalité qui est porté sur un graphique. Dans cet exemple, les courbes représentent la sensibilité des animaux à deux souches différentes A et B d'un agent pathogène. Pour la souche A, la DL₅₀ est égale à 30 et pour la souche B, elle est égale à 50. Il en résulte que la souche A est plus virulente que la souche B (Prescott et al., 2013)

Le nombre d'agents pathogènes nécessaires pour infecter un hôte, appelé **dose infectieuse**, varie considérablement d'un agent pathogène à l'autre et même entre des agents pathogènes étroitement apparentés. À une extrémité de l'échelle, des espèces telles que *Shigella* et les souches entérohémorragiques d'*E. coli* nécessitent une dose infectieuse de seulement une dizaine de cellules. En revanche, des espèces telles que *Vibrio cholera* et *Staphylococcus aureus* nécessitent 10^3 – 10^8 cellules dans l'inoculum pour infecter avec succès un hôte.

Il a été récemment prédit que la dose infectieuse dépendra du mode d'action des molécules que les agents pathogènes utilisent pour faciliter leur infection. Plus précisément, les agents pathogènes qui utilisent des molécules à action locale nécessiteront une dose infectieuse plus faible que ceux qui utilisent des molécules agissant à distance. L'action locale nécessite relativement peu de molécules et donc relativement peu de cellules infectantes. Alors que l'action lointaine exige que la population infectieuse d'agents pathogènes s'accumule et qu'il y ait des quantités suffisantes de molécules diffusibles pour atteindre sa cible que l'hôte ne puisse éliminer l'infection.

III. Postulat de Koch

Les critères de Koch concernant la relation de cause à effet de l'infection, communément appelés les «postulats de Koch» sont souvent considérés comme la première méthode fiable pour établir que l'agent pathogène est la cause d'une maladie. Tandis que Koch a développé ces critères dans la seconde moitié du XIXe siècle (1884), ils continuent de recevoir une attention considérable.

Les postulats de Koch sont communément représentés sous la forme suivante en trois parties:

1. L'agent pathogène est présent dans tous les cas de maladie.
2. L'agent pathogène n'est pas présent dans d'autres maladies ou de manière non pathogène.
3. Après avoir été complètement isolé et cultivé à plusieurs reprises en culture pure l'agent pathogène peut induire la maladie en étant introduit dans un modèle animal en bonne santé. D'autres formulations divisent le troisième postulat en deux ou ajoutent un postulat final exigeant que l'agent pathogène soit à nouveau isolé du modèle animal malade et qu'il puisse croître en culture pure (Fig2).

Ainsi, en se basant sur ses trois postulats, Koch et ses collaborateurs ont pu établir lors de leurs premières publications, la relation causale entre les espèces pathogènes et certaines maladies telles que l'anthrax (ou maladie du charbon) (*Bacillus anthracis*) en 1876-1877, la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) en 1882 et le choléra (*Vibrio cholerae*) en 1883.

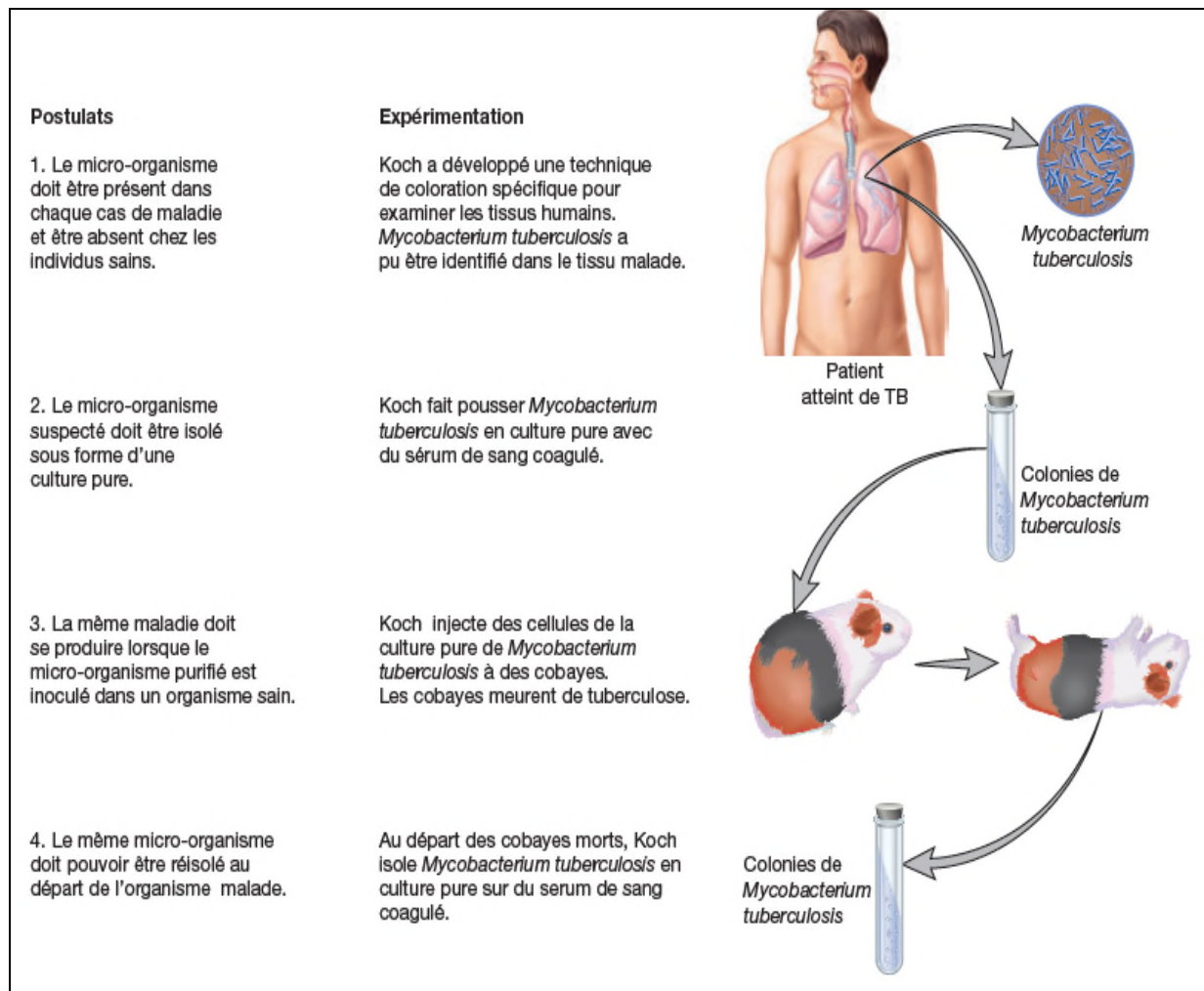


Figure 2. Postulats de Koch appliqués à la tuberculose (Prescott et al., 2013)

Bien que les critères établis par Koch pour prouver la relation de cause à effet entre un micro-organismes et une maladie particulière, aient une importance énorme en microbiologie médicale (Tableau I), il n'est pas toujours possible de les appliquer aux maladies humaines. Ainsi, certains organismes ne peuvent être cultivés en dehors de leur hôte; d'autres organismes pathogènes ne se développent que chez l'homme et leur étude nécessiterait des expériences sur des humains. En effet, certains chercheurs ont eu du mal à remplir ces postulats pour pouvoir établir le lien de causalité de *Borrelia recurrentis* pour la fièvre récurrente à poux où les animaux de laboratoire se sont révélés réfractaires à cette infection adaptée à l'Homme. De plus, les postulats de Koch demandent qu'un seul organisme soit présent dans tous les cas de maladie négligeant l'aspect polymicrobien dans certains cas.

De ce fait, des tentatives de mise à jour des postulats de Koch ont été introduites, variante moléculaire de ceux-ci introduisant l'identification, l'isolement et le clonage de gènes responsables de la pathologie soulignant l'importance des gènes de virulence portés par l'agent infectieux plutôt que celle de l'agent lui-même.

Ces postulats moléculaires sont résumés ainsi:

1. L'inactivation du ou des gènes associés au caractère virulent doit diminuer significativement le pouvoir pathogène.
2. Le remplacement du gène muté par le gène normal sauvage doit restaurer complètement le pouvoir pathogène.
3. Le gène doit être exprimé à certains moments de l'infection.
4. Des anticorps ou cellules du système immunitaire dirigés contre les produits de ce ou ces gène (s) doivent protéger l'hôte.

Les récentes découvertes sur les microorganismes et leur interaction avec l'hôte plaident pour une révision et une modification de l'original postulats. Plus précisément, les microorganismes endémiques qui induisent la maladie dans certaines conditions à savoir la dysbiose microbienne, caractérisée par un déséquilibre du microbiote intestinal, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) incluant la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse.

Tableau I. Quelques bactéries d'intérêt médical

BACTERIE PATHOGENE		MALADIE INFECTIEUSE ASSOCIEE
GRAM NÉGATIVE	Cocci aérobie	
	<i>Nisseria meningitidis</i>	méningite cérébrospinale
	<i>Nisseria gonorrhoeae</i>	blennorragie (gonorrhée)
	Spirochète	
	<i>Treponema pallidum</i>	syphilis vénérienne
	<i>Borrelia sp</i>	maladie de Lyme
	Bacille en spirale	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	infection intestinale
	<i>Helicobacter pylori</i>	Maladie ulcéreuse/cancer gastrique
	Bacille fermentaire	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	infection intestinale/urinaire/pulmonaire/peste/ autre
	Bacille non fermentaire	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infection opportuniste et nosocomiale respiratoire/infection des plaies/bactériémie/autre
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infection opportuniste nosocomiale urinaire/pneumonie/bactériémie/ autre
	Autre	
	<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra
	<i>Haemophilus influenzae</i>	infection pulmonaire/méningite
	<i>Pasteurella multocida</i>	infection respiratoire
	<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonie/infection intestinale
	<i>Brucella sp</i>	Brucellose (fièvre à complications ostéo-articulaires et neurologiques)
GRAM POSITIVE	Cocci anaérobie facultatif	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Fièvres puerpérales/Scarlatine maligne/angine/érysipèle
	<i>Streptococcus pneumonia</i>	pneumonie/méningite/angine
	<i>Staphylococcus aureus</i>	infection cutanéomuqueuse/intoxication alimentaire
	Bacille anaérobie strict	
	<i>Clostridium tétani</i>	tétanos
	<i>Clostridium botulinum</i>	botulisme
	<i>Clostridium perfringens</i>	intoxication alimentaire
	Bacilles	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	infection intestinale/ infection materno-infantile/ méningite cérébrospinale
	Actinobactéries et genre apparenté	
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	diphthérie
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculose
	<i>Nocardia asteroides</i>	Infection pulmonaire
BACTERIE SANS PAROI	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	infections respiratoires aiguës
INTRACELLULAIRE OBLIGATOIRE		
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Typhus
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	infection génitale/trachome
	<i>Mycobacterium leprae.</i>	lèpre

Chapitre I. Facteurs de virulence

Les étapes du processus de pathogénèse sont nombreuses, séquentielles et commence généralement par la transmission de l'agent infectieux à l'hôte, qui est suivie par la colonisation du site. Après la colonisation des sites tissulaires, les bactéries persistent et adhèrent au site de colonisation avant d'envahir le système hôte. Si les bactéries survivent au système immunitaire de l'hôte, le pathogène établira sa maladie spécifique sur l'hôte.

I. Pénétration dans l'organisme (voies de contamination)

La transmission doit fournir un aperçu de la voie par laquelle les agents pathogènes doivent avoir accès à l'hôte. Les voies de transmission peuvent être différentes selon les agents pathogènes bactériens:

- ❖ **Voie digestive:** Ingestion d'eau ou d'aliments souillés (ex. *V.cholerae*, *Salmonella Typhi*).
- ❖ **Voie respiratoire:** Inhalation d'aérosols contaminés (ex. *Legionella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*) ou expiration de microgoutelettes (*M. tuberculosis*).
- ❖ **Voie cutanée:** Inoculation par contact (plaie souillée) (ex. *Clostridium tetani*, *Staphylococcus aureus*)
- ❖ **Voie transcutanée:** Inoculation iatrogène (injection de cathéter), piqûre d'insecte vecteur de bactéries (ex. *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*).
- ❖ **Voie sexuelle:** Maladie sexuellement transmissible (ex. *Treponema pallidum*, *Chlamidia trachomatis*).

II. Colonisation et adhésion

Par la suite de la transmission, la colonisation qui est le stade initial de l'infection microbienne a lieu. Les portes d'entrée communes aux hôtes humains et animales sont les voies urogénitales, voies gastro-intestinales, voies respiratoires et les yeux. Les agents pathogènes bactériens qui attaquent ces sites doivent adhérer aux tissus des hôtes avant l'exposition aux mécanismes de défense pour leur permettre de les contourner en particulier sur les surfaces du corps. Ces surfaces comprennent la peau, les muqueuses (cavité buccale,

nasopharynx, urogénital) et des tissus plus profonds (tissu lymphoïde, gastrique et intestinal épithéliums, muqueuse alvéolaire, tissu endothélial).

L'adhérence est une colonisation initiale essentielle suivie d'une pénétration à travers les tissus afin d'éviter les mécanismes de défense innés de l'hôte qui peuvent éliminer efficacement les agents pathogènes bactériens non adhérents. Par exemple, la muqueuse du tube digestif est continuellement nettoyée par la libération de mucus des cellules caliciformes et par le flux péristaltique du contenu intestinal sur l'épithélium. De même, les cellules ciliées des voies respiratoires balayent le mucus et les bactéries vers le haut.

L'adhésion représente une étape cruciale pour les bactéries extracellulaires qui facilitent leur persistance chez l'hôte. Pour les bactéries intracellulaires, c'est une première étape essentielle qui précède leur internalisation dans les cellules hôtes. Cependant, pour que la fixation d'agents pathogènes bactériens soit réussie, les bactéries doivent;

1. Être en mesure d'accéder à certains nutriments essentiels tels que le fer pour la croissance
2. Posséder des *fimbriae* ou pili. Les agents pathogènes bactériens doivent avoir une ou plusieurs stratégies communes d'attachement ou d'adhésion qui sont les *fimbriae* et adhésines protéiques monomères.
3. Les récepteurs de *fimbriae* ou de pili de la plupart des agents pathogènes bactériens sont généralement constitués de résidus glucidiques, de glycoprotéines ou glycolipides. L'adhérence est une liaison assez fragile et très spécifique, souvent médiée par les adhésines, qui peuvent être bloquées par des anticorps, souvent spécifiques du type/localisation du tissu. Le rôle spécifique d'une adhésine particulière dans la maladie a été difficile à définir, puisqu'un seul pathogène exprime de nombreux facteurs d'adhésion.

II.1. Les Pili (ou *fimbriae*)

Les pili (également appelés «*fimbriae*») sont de gros biopolymères qui sont constitués de sous-unités assemblées via une micro-machinerie sophistiquée en structures de type hélice ancrées dans la membrane externe bactérienne. Ils représentent une première classe de structures impliquées dans la liaison des bactéries aux cellules hôtes. La base de ces structures, découverte initialement chez les bactéries Gram-négatives, est ancrée à la membrane externe

bactérienne, tandis que la pointe est généralement un facteur d'adhérence (adhésine) conférant la liaison spécifique de ces structures.

L'adhésine est une protéine qui se compose en deux domaines avec le domaine de la lectine se liant au sucre à l'extrémité. Ainsi, la protéine d'adhésine a environ deux fois le poids moléculaire des principales sous-unités de piline. En raison de sa position à l'extrémité du filament pileux, le domaine lectine de cette sous-unité est disponible pour se lier à la cellule cible. L'adhésine est la sous-unité la plus conservée de la structure pileuse, avec une spécificité précise pour les sucres situés à la surface des cellules cibles. L'adhésine de pointe définit ainsi le caractère microenvironnemental préféré de chaque souche bactérienne. Le deuxième domaine de l'adhésine est de type piline, composé d'un pli de type immunoglobuline avec six brins bêta. Un sillon hydrophobe dans le domaine est disponible pour un septième brin, qui est donné par les acides aminés N-terminaux de la première sous-unité de piline.

Il existe un grand nombre de types de pilus qui soutiennent la liaison et l'adhésion durable des bactéries, avec une variation due en grande partie aux adaptations qui facilitent l'adhésion dans le milieu environnemental préféré de chaque souche bactérienne. Par exemple, l'UPEC, qui sont les souches uropathogènes d'*E. coli* colonisant les voies urinaires et impliquées dans des infections rénales, présentent des pili associés à la pyélonéphrite (P) (codés par les gènes *pap*) à leur surface. La pointe de ces pili est constituée par un facteur d'adhérence appelé PapG, qui se lie aux glycosphingolipides de l'épithélium rénal. Certaines souches UPEC possèdent également des pili de type I à leur surface, qui ont une spécificité de liaison aux récepteurs D-mannosylés, comme les uroplakines de la vessie.

L'adhésion bactérienne est médiée par des récepteurs spécifiques situés à l'extrémité des pili qui se lient aux ligands correspondants qui sont exprimés sur les surfaces membranaires des cellules hôtes. Lorsque des bactéries sont attachées à ces cellules hôtes et exposées à l'écoulement de fluide, ces liaisons récepteur-ligand sont exposées à une force de traction. Cette force peut agir de manière destructrice sur la durée de vie de la liaison (c'est-à-dire la durée moyenne pendant laquelle l'interaction récepteur-ligand reste intacte) entraînant ainsi la rupture de la liaison et le détachement bactérien. La durée de vie du complexe de liaison récepteur-ligand, impliquant de faibles interactions non covalentes, dépend à son tour directement du type de liaison et de la force appliquée.

Par exemple chez *E. coli* exprimant des pili de type 1, généralement corrélée aux infections des voies urinaires dans la vessie, qui se lie à travers la protéine d'adhésine FimH qui est une liaison renforcée par cisaillement, ce qui implique que la durée de vie de la liaison croît initialement avec la force appliquée jusqu'à une certaine force seuil caractéristique, après quoi la liaison présente un comportement de glissement normal. Cette propriété de «capture-liaison» confère ainsi aux bactéries un comportement d'adhérence amélioré par cisaillement lorsqu'elles sont exposées à un écoulement de fluide, qui est censé conférer aux bactéries plusieurs avantages. Par exemple, lorsque le débit de fluide est faible, le mode d'adhésion faible peut aider les bactéries à coloniser de nouvelles surfaces, tandis que lorsque le flux de fluide est fort, le mode amélioré par cisaillement se traduit par une adhérence ferme empêchant le décollement bactérien. La propriété de liaison a également été montrée pour l'adhésine CfaE à la pointe des pili CFA/I, exprimée chez *E. coli* communément lié aux maladies diarrhéiques (Fig3).

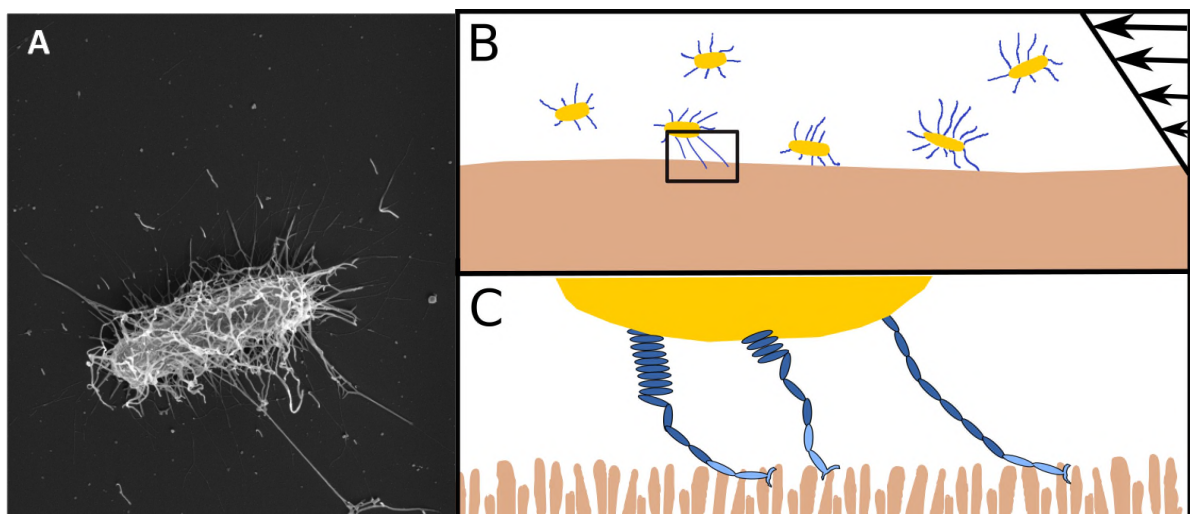


Figure 3. Modèle conceptuel de bactéries se fixant à l'épithélium intestinal

A) Micrographie en microscopie électronique à balayage d'un *E. coli* exprimant des pili à adhérence multiple. La barre de grossissement est de 1,0 μm B) Schéma de bactéries proches de l'épithélium intestinal et exposées à un flux de gradient. C) Bactéries attachées aux microvillosités via des pili partiellement déroulés (gauche et milieu) ou complètement déroulés (droite) (Barbercheck et al., 2018)

II.2. Pili de type IV

Ils constituent une autre classe de structures de surface adhésives polymères exprimée par différentes bactéries Gram-négatives. Ces pili sont composés de milliers d'exemplaires des principaux protéine piline qui est d'abord synthétisée dans le cytoplasme bactérien puis transféré à travers la membrane interne et traité protéolytiquement. Seules les formes transformées de piline sont compétentes pour la polymérisation. Les pili assemblés traversent la membrane externe par un canal formé par la protéine de sécrétine. Une fois formés, ces pili peuvent s'agréger latéralement pour former des faisceaux. Les pili de type IV ont la capacité de se rétracter à travers la paroi cellulaire bactérienne, tandis que la pointe du pilus reste attachée à sa surface cible, permettant un mode de motilité indépendant des flagelles qui est important pour une colonisation efficace des surfaces de l'hôte.

Dans le cas de *Neisseria meningitidis*, une bactérie trouvée dans le nasopharynx humain, mais qui peut parfois avoir accès à la circulation sanguine de l'hôte entraînant une septicémie et une méningite, les pili de type IV permettent l'attachement aux cellules endothéliales vasculaires. Une fois attachées, ces bactéries sont beaucoup plus résistantes aux contraintes de cisaillement et peuvent commencer à proliférer conduisant à la formation de microcolonies. Il est intéressant de noter que, dans certains cas, les bactéries peuvent modifier leurs pili (via une modification post-traductionnelle de sous-unités pili spécifiques) afin de déstabiliser le pilus interagissant avec les fibres, conduisant au détachement de ces bactéries de la microcolonie originale et faciliter leur diffusion à des sites d'infection éloignés dans d'autres sites ou dans le liquide céphalo-rachidien en cas de barrière hémato-encéphalique traversée. De plus, la sous-unité piline de *N. gonorrhoeae* est en constante évolution en raison de mutations génétiques du gène piline exprimé, ce qui conduit à des variations antigéniques.

En plus de son rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte, les pili de type IV ont également pour fonction la mobilité, la formation de microcolonies et de biofilms, la signalisation cellulaire, l'acquisition d'ADN par phénomène naturel de transformation ainsi que la liaison aux phages.

❖ Des pili ont également été observés chez des bactéries Gram-positives. Deux types de pili ont été décrits jusqu'à présent dans ces espèces. La première classe consiste en «**sortase-assembled pili** », dans lequel des sous-unités de piline successives sont liées par des liaisons isopeptidiques après translocation à travers la membrane de la bactérie. Cette liaison est

catalysée par les transpeptidases bactériennes appelés sortases permettant la formation de des polymères complètement covalents qui sont finalement liés au peptidoglycane de la paroi cellulaire. La deuxième classe consiste au «**Pili de type IV**», qui sont similaires aux pili de type IV des bactéries Gram négatives, même si le manque de membranes externes et les structures peptidoglycanes épaisses des bactéries Gram-positives impliquent des différences dans les mécanismes d'assemblage de ces filaments.

II.3. Adhésines afimbriales

Se sont des protéines qui servent de facteurs d'adhérence, mais ne forment pas la longue structure fimbriale polymérique. Les adhésines afimbriales sont généralement en contact plus intime avec la cellule hôte qui se produit sur une gamme plus étroite qu'avec les *fimbriae*. Les bactéries pathogènes Gram négatives (*Yersinia pseudotuberculosis*, *E coli* entéropathogène, *Neisseria spp*), Gram positives (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*) et les mycobactéries expriment des adhésines afimbriales.

Les adhésines polysaccharidiques sont généralement des composants de la membrane cellulaire bactérienne, de la paroi cellulaire ou de la capsule. Les acides téichoïques trouvés dans les enveloppes cellulaires de bactéries Gram positives servent d'adhésines pour *Staphylococcus spp* et *Streptococcus spp*. Les polysaccharides trouvés dans la paroi de *Mycobacterium spp* (glucane et mannane) sont également reconnus par les récepteurs des cellules hôtes (complément du récepteur 3 et du récepteur du mannose) pour favoriser l'adhésion.

❖ En plus des pili, une large gamme de facteurs de surface bactériens avec des propriétés adhésives ont été décrites. Ces adhésines reconnaissent diverses classes de molécules hôtes, y compris des protéines transmembranaires telles que les intégrines ou les cadhérines, ou des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine, la laminine ou l'élastine. Certaines de ces adhésines, après avoir permis la liaison des bactéries à la surface des cellules, sont également des éléments déclenchant l'internalisation des bactéries à l'intérieur des cellules hôte.

Bien que les interactions récepteur-ligand qui se produisent pour promouvoir l'adhésion peuvent être divisées en deux groupes généraux, interactions protéines-protéines et protéines-glucides, il est important d'être conscient de la variété des cibles que les microorganismes utilisent comme récepteurs de l'hôte. Les molécules qui servent de

récepteurs hôtes pour les pathogènes comprennent les protéines couvrant la membrane, les immunoglobulines de surface, les glycolipides, les glycoprotéines et les protéines matricielles extracellulaires (telles que la fibronectine et le collagène). Dans au moins un cas (*E coli* entéropathogène), l'agent pathogène injecte son propre récepteur protéique dans l'hôte. Une fois dans la membrane de la cellule hôte, le récepteur se lie à une adhésine afimbriale sur la surface des cellules pathogènes pour l'adhérence (Fig4). Il est également important de noter qu'il est courant qu'un seul pathogène peut exprimer (et utiliser) plus d'une adhésine. Cette stratégie se produit dans tous les types d'espèces bactériennes (Gram négatif, Gram positif et mycobactérie).

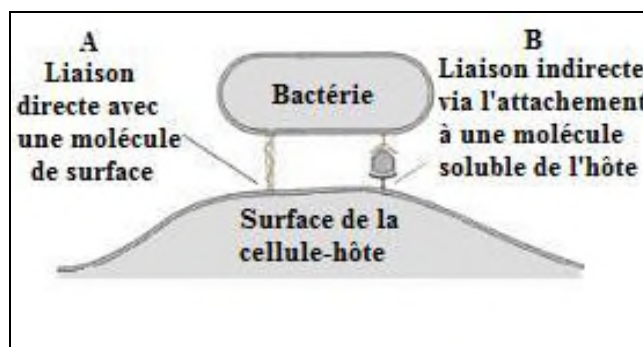


Figure 4. Adhésion bactérienne à la cellule-hôte chez *E. coli*.

La bactérie utilise un récepteur présent à la surface de la cellule (A) ou utilise l'interaction d'une molécule de l'hôte avec son récepteur cellulaire pour former un pont entre la bactérie et la cellule-hôte (B).

II.4. Les flagelles

Le flagelle bactérien est une machine moléculaire étonnamment complexe avec une diversité de rôles dans la pathogénèse, y compris l'atteinte du site hôte optimal, la colonisation ou l'invasion, le maintien au site d'infection et la dispersion post-infection. Des moteurs flagellaires de plusieurs mégadaltons s'auto-assemblent à travers la paroi cellulaire pour former un moteur rotatif réversible qui fait tourner une hélice hélicoïdale - le flagelle lui-même - pour entraîner la motilité de divers agents pathogènes bactériens.

Le flagelle est composé de trois parties (Fig 5) : le moteur ou corps basal, le crochet et un filament long de 5 à 10 μm . Le flagelle permet à la bactérie de se mouvoir vers des environnements plus favorables ou moins défavorables à sa croissance. Cependant, ils sont considérés depuis peu comme des adhésines. Les flagelles eux-mêmes ont des propriétés adhésives qui sont indépendante de leur motilité.

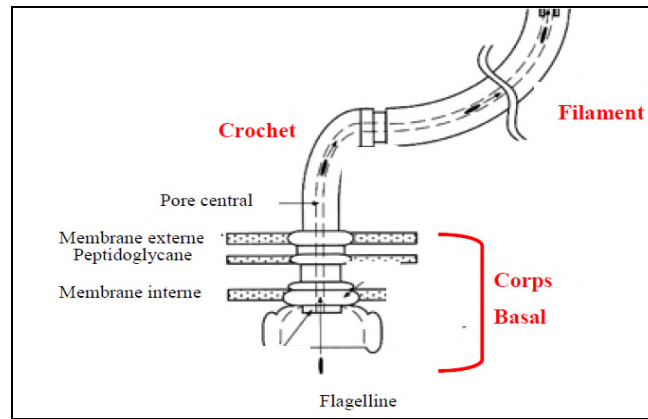


Figure 5: Structure du flagelle (Chaban et al. 2015)

Le flagelle est constitué de 3 régions : le corps basal, enchâssé dans la membrane bactérienne, le filament formé d'un polymère de flagelline et le crochet reliant le corps basal et le filament

Le moteur flagellaire répond au système de chimiorécepteur pour rediriger la nage "swimming" vers des environnements bénéfiques, permettant ainsi aux pathogènes flagellés de rechercher leur site d'infection. Sur leur site cible, des rôles supplémentaires de nage en surface et de mécano-détection sont médiés par les flagelles pour déclencher la pathogénèse. Pourtant, alors que ces fonctions liées à la motilité ont longtemps été reconnues comme des facteurs de virulence chez les bactéries, de nombreuses bactéries ont capitalisé sur la structure et la fonction flagellaires en l'adaptant à des rôles dans d'autres étapes du processus d'infection. Une fois sur leur site cible, le flagelle peut aider à l'adhérence aux surfaces, à la différenciation en biofilms, à la sécrétion de molécules effectrices, à une pénétration supplémentaire à travers les structures tissulaires ou à l'activation de la phagocytose pour entrer dans les cellules eucaryotes. Ensuite, au début de l'infection, l'expression flagellaire doit être adaptée pour faire face aux défenses du système immunitaire de l'hôte, soit par une expression réduite ou altérée, soit par une modification structurelle flagellaire. Enfin, après une phase de croissance réussie sur ou à l'intérieur d'un hôte, la dispersion vers de nouveaux sites d'infection est souvent induite par la motilité flagellaire. En examinant des exemples de tous ces processus de différents agents pathogènes bactériens, il devient rapidement clair que le flagelle est impliqué dans la pathogénèse bactérienne pour la motilité et bien plus encore¹⁴. Pour exemple, les flagelles jouent un rôle important dans la colonisation de la muqueuse gastro-intestinale de *Helicobacter pylori* (Fig 6). De ce fait, la mutagenèse de n'importe quel gène de la motilité et les systèmes de chimiotaxie abolissent la capacité de *H.pylori* à infecter l'estomac et à établir la colonisation.

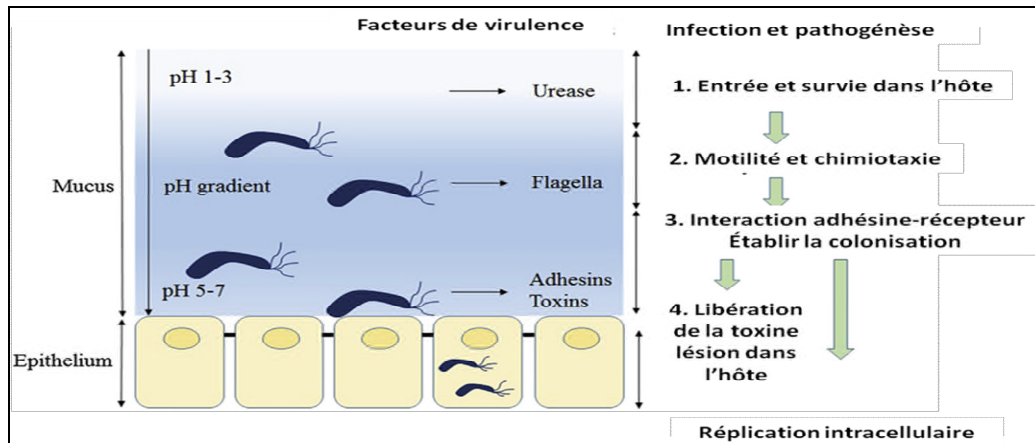


Figure 6. Diagramme schématisé de l'infection et de la pathogénèse à *Helicobacter pylori*

L'activité uréase et la motilité médiée par les flagelles de *H.pylori* facilitent sa survie et son mouvement vers le gel muqueux inférieur au-dessus de l'épithélium, suivi de plusieurs adhésines, y compris la protéine A de liaison à l'antigène sanguin, l'adhésine de liaison à l'acide sialique et d'autres protéines de la membrane externe interagissant avec récepteurs sur les cellules épithéliales de l'hôte. Après une colonisation réussie, les toxines, y compris le gène A associé aux cytotoxines, et la cytotoxine A vacuolante, sont impliquées dans les lésions du tissu hôte et la réplication intracellulaire.) (Kao et al., 2016)

II.5. Les biofilms

Au début de l'infection, l'adhésion des pili favorise l'adhésion aux cellules cibles. Au fur et à mesure que l'infection progresse ou lorsque les bactéries sont en contact avec des surfaces inorganiques, l'expression du pilus augmente souvent, conduisant à des interactions bactérie-bactérie qui favorisent la formation de biofilms, favorisant ainsi une colonisation accrue.

Le biofilm est une matrice constituée d'assemblages microbiens pouvant adhérer à des éléments biologiques ou non biologiques (surfaces inertes). La formation de biofilms constitue un mode de croissance qui permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile (niches industrielles ou hospitalières).

La matrice du biofilm est composée de substances polymères extracellulaires constituées d'exopolysaccharides (EPS), protéines (par exemple, fibrine), acides nucléiques et lipides. Outre la protection offerte par la matrice, les bactéries dans les biofilms peuvent utiliser plusieurs stratégies de survie pour échapper aux systèmes de défense de l'hôte. En restant dormantes et cachées du système immunitaire, elles peuvent provoquer plus tard une infection aiguë. Au sein du biofilm, les bactéries s'adaptent à l'anoxie environnementale et la limitation des nutriments en présentant un métabolisme, une expression des gènes et une

production de protéines modifiées, ce qui peut entraîner une baisse du métabolisme et une diminution du taux de division cellulaire. De plus, ces adaptations rendent les bactéries plus résistantes à l'antibiothérapie en inactivant les cibles antimicrobiennes ou en réduisant les exigences de la fonction cellulaire avec laquelle les antimicrobiens interfèrent. Lors d'une infection par biofilm, il y a activation simultanée des réponses immunitaires de l'hôte innée et acquise. Toutefois, aucune d'entre-elle n'est capable d'éliminer le biofilm pathogène, ce qui permet d'accélérer les lésions tissulaires collatérales. Par conséquent, les maladies liées au biofilm sont généralement persistantes, infections qui se développent lentement et qui sont rarement résolues par le système immunitaire et réagissent de manière incohérente aux traitements antimicrobiens.

Les connaissances actuelles sur la façon dont le biofilm peut contribuer à la pathogenèse de la maladie indique un certain nombre de mécanismes différents. Cela va du biofilm étant un simple réservoir de bactéries pathogènes, à jouer un rôle plus actif, par exemple, en contribuant à l'inflammation. Les observations indiquent également que les biofilms ne se produisent pas uniquement de manière extracellulaire, mais peuvent également se former à l'intérieur de cellules vivantes. De plus, la présence de biofilm peut contribuer au développement du cancer.

Bien que les constituants moléculaires impliqués dans le développement du biofilm bactérien varient selon les espèces bactériennes, un modèle de base largement reconnu se compose de trois étapes séquentielles: 1) l'attachement, 2) l'accumulation / maturation et 3) le détachement / dispersion. Pendant la phase de fixation, les cellules planctoniques adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques et prolifèrent en agrégations collantes appelées microcolonies (également appelées tours ou structures en forme de champignon). Au fur et à mesure que ces microcolonies se développent, les cellules bactériennes produisent une matrice extracellulaire qui sert d'échafaudage essentiel pour établir cette architecture tridimensionnelle. En atteignant une densité cellulaire spécifique, un mécanisme est déclenché pour initier la dégradation de la matrice extracellulaire qui libère les cellules intégrées dans le biofilm pour disperser et relancer le développement du biofilm sur les sites distaux.

Nous proposons deux exemples d'espèces pathogènes produisant des biofilms à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

II.5.1. Exemple 1: Production de biofilm par *P. aeruginosa*

❖ Infections liées au biofilm

La formation de biofilm par *P. aeruginosa* est impliquée dans les cas d'infections chroniques et aiguës et a pour conséquence la complication des maladies des voies respiratoires telle que la mucoviscidose (ou fibrose kystique) (Fig 7). D'autres infections associées au biofilm de *P. aeruginosa* comprennent l'infection chronique des plaies, l'otite moyennes chronique, la rhinosinusite, l'infection des voies urinaires associée au cathéter, la kératite liée aux lentilles de contact et les pneumonies associées à la ventilation (VAP).

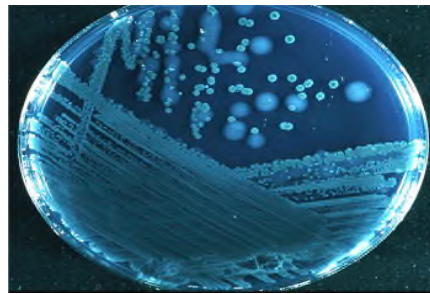


Figure 7. *P. aeruginosa* provenant d'expectorations d'un patient atteint de mucoviscidose

Colonies mucoïdes (grandes) et non mucoïdes (petites). Le variant mucoïde sur-produit de l'alginate, qui est la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Les colonies mucoïdes ne se trouvent que chez les patients l'infection chronique par biofilm et l'alginate des colonies mucoïdes est donc un antigène spécifique du biofilm (Vestby et al., 2020)

❖ Composition et étapes de formation du biofilm

Les exopolysaccharides (EPS) Psl, Pel et alginate sont des constituants majeurs de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* impliqués dans l'adhésion de surface (Fig 8). Le rôle différentiel de chaque EPS a été analysé à chaque étape de développement de biofilms. Les différents EPS et ADNe ont montré qu'ils contribuent de manière interactive à l'architecture du biofilm. La présence de divers EPS exposant différentes propriétés physiochimiques confèrent une stratégie de survie pour augmenter la flexibilité et la stabilité des biofilms sous diverses conditions.

Le polysaccharide Psl est un élément clé au stade précoce de la formation du biofilm lorsque les cellules explorent les surfaces pour l'adhésion. Il est ancré autour des cellules dans un arrangement hélicoïdal initier la formation de biofilm en améliorant la migration cellulaire, l'interaction cellule-cellule et l'adhérence de la surface cellulaire, alors que dans les biofilms matures, il est situé à la périphérie des macrocolonies en forme de champignon. Psl peut exister sous forme de fibre matrice nécessitant les pili de type IV pour la migration de cellules. Il protège les cellules contre la phagocytose et le stress oxydatif pendant l'infection.

Des études récentes ont suggéré que Psl peut fournir un rôle protecteur instantané contre les agents anti-biofilm et un large éventail d'antibiotiques en particulier au stade précoce du développement du biofilm. Par conséquent, Psl fournit un avantage dans la survie lors de la pathogénèse. Semblable à Psl, Pel est important pour initier et maintenir l'interaction cellule-cellule dans les biofilms. Pel et/ou Psl sont les principaux polysaccharides structuraux de la matrice chez les souches de *P. aeruginosa* non mucoïdes.

L'alginate est un polysaccharide chargé négativement et qui se compose d'acides L-guluronique (G) et D-mannuronique (M) liés entre eux par des liaisons β -1,4. Durant son transfert périplasmique, il subit quelques modifications telles qu'une acétylation et une épimérisation. Chez *P. aeruginosa*, la synthèse de l'alginate répond à certains facteurs environnementaux rencontrés notamment chez les patients atteints de mucoviscidose.

L'ADNe a des rôles multiples dans la formation de biofilms tels que la contribution à la formation de gradients de cations dans la matrice *via* l'interaction chélatante de l'ADN anionique avec des cations tels que Mg^{++} , Ca^{2+} , Mn^{++} et Zn^{++} , comme source de nutriments pendant la dormance de la bactérie, facilitant les contractions de motilité et la coordination des mouvements cellulaires et conférant une résistance aux antibiotiques.

Parmi les constituants du biofilm protéique, les deux flagelles et les pili de type IV sont importants lors de la maturation du biofilm. Cependant, ces appendices cellulaires ne sont généralement pas considérés comme des composants matriciels classiques des biofilms. Les pili de type IV sont importants pour l'adhérence et favorisent la fixation initiale de cellules aux surfaces au stade précoce de la formation de biofilm. Ensemble avec l'ADNe, les flagelles et les pili de type IV permettent la migration nécessaire pour la formation de la tige et de la coiffe (Cap) formant des structures en forme de champignons spécifiques du biofilm mature.

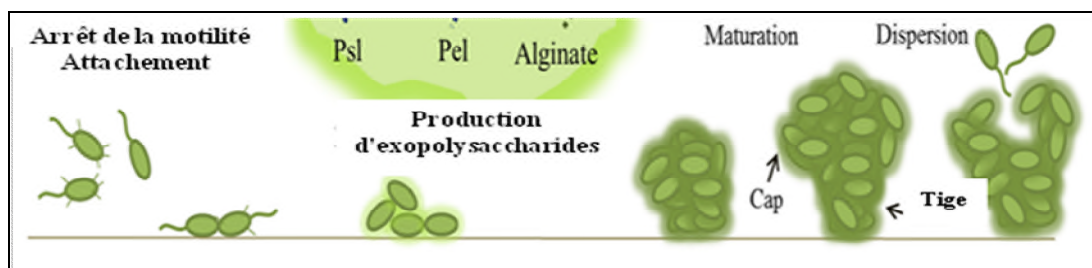


Figure 8. Les différentes étapes de formation et de développement du biofilm chez *P. aeruginosa* (Moormeier et Bayles, 2017)

II.5.2. Exemple 2: Production de biofilm par *S. aureus*

❖ Infections liées au biofilm

L'agent pathogène producteur de biofilm, *S. aureus*, est devenu connu pour causer des infections chroniques en raison de sa capacité à résister au traitement thérapeutique en formant des biofilms sur des dispositifs médicaux à demeure, y compris des valves cardiaques artificielles implantées, des cathéters et des prothèses articulaires. En effet, les infections liées au biofilm sont associées à une morbidité et une mortalité accrues, les dispositifs médicaux infectés nécessitant souvent une ablation chirurgicale et des durées d'hospitalisation plus longues.

❖ Composition et étapes de formation du biofilm

S. aureus peut produire un biofilm multicouche intégré dans un glycocalyx ou une couche de slime avec une expression protéique hétérogène partout (Fig 9). Les premières études ont décrit le composant solide du glycocalyx comme étant principalement composé d'acides teichoïques (80%) et de protéines staphylococciques et celles de la cellule hôte. Dans des études ultérieures, un antigène polysaccharidique spécifique appelé antigène polysaccharidique intercellulaire (PIA) a été isolé. Le PIA est composé de résidus de N-acétylglucosamine liés à la b-1,6 (80 à 85%) et d'une fraction anionique avec une teneur inférieure en résidus de D-glucosaminyle non N-acétylés contenant du phosphate et du succinate lié à un ester. Un autre composant important du biofilm staphylococcique est l'ADN extracellulaire (ADNe). Ceci est étayé par la découverte *in vitro* que la clairance précoce et immature du biofilm pourrait être atteinte par un traitement à la DNase.

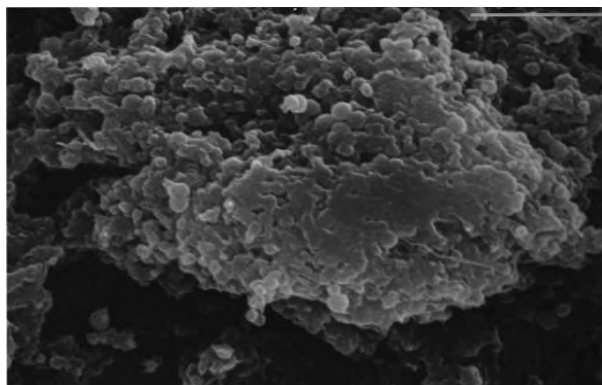


Figure 9. Micrographie SEM d'un implant récupéré à cinq jours montrant un nombre massif de cocci partiellement occlus par un matériau déshydraté. Barre = 5 μ m.

Il a été démontré que le développement du biofilm de *S.aureus* se déroule selon un processus de développement en cinq étapes comprenant: 1) l'attachement, 2) la multiplication, 3) l'exode, 4) la maturation et 5) la dispersion (figure 10). Pour initier la formation de biofilm sur des matériaux biotiques, les cellules planctoniques de *S. aureus* s'attachent d'abord à une surface en utilisant une variété de protéines ancrées à la paroi cellulaire spécifiques pour différents substrats de la matrice hôte. Une partie de ce groupe bien caractérisé de protéines fixées en surface sont les composants de surface microbiens reconnaissant les molécules de matrice adhésive (MSCRAMM) qui ont des spécificités de liaison différentes pour les composants de la matrice hôte tels que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la cytokératine.

Il a été largement démontré que la dispersion des biofilms de *S. aureus* est sous le contrôle d'Agr quorum sensing, et comme d'autres systèmes de détection quorum, le système Agr dépend de la densité cellulaire et de l'accumulation de molécules signal appelées autoinducteurs.

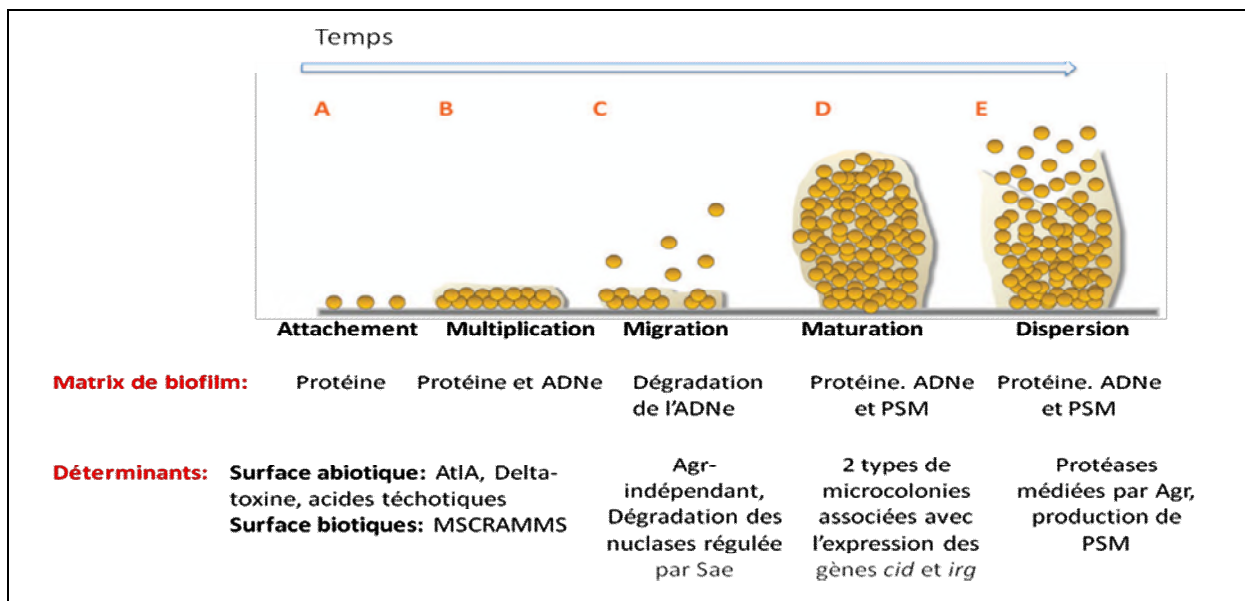


Figure 10. Modèle de développement du biofilm de *S. aureus* (Moradali et al., 2017)

AtIA, autolysine A; MSCRAMM, composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de matrice adhésive; eDNA, ADN extracellulaire; PSM, modules solubles dans les phénols; Agr, régulateur de gène accessoire.

III. Invasion

Une fois adhérents à la surface de l'hôte, certains agents pathogènes gagnent en profondeur l'accès à l'hôte pour perpétuer le cycle d'infection. Il s'agit de l'invasion, elle fait référence à la capacité du pathogène de se propager à d'autres endroits de l'hôte, en envahissant les cellules ou les tissus de l'hôte. C'est généralement à ce stade que la maladie ou les signes / symptômes évidents de maladie se manifestent. Alors que les structures physiques peuvent encore jouer un rôle dans l'invasion, la plupart des agents pathogènes bactériens produisent un large éventail de produits chimiques, en particulier des enzymes qui affectent les cellules et les tissus de l'hôte (Tableau II). Les bactéries présentes dans la circulation sanguine, une condition connue sous le nom de bactériémie, peuvent se propager rapidement à divers endroits de l'hôte. Cela peut entraîner une infection systémique massive connue sous le nom de septicémie, qui peut entraîner un choc septique et la mort, car l'hôte est submergé par le pathogène bactérien et ses produits.

L'invasion peut être divisée en deux types: extracellulaire et intracellulaire. En outre, certaines bactéries, comme *Corynebacterium diphtheriae* ou *Clostridium tetani*, une fois attachées à une surface muqueuse, exercent leurs effets pathogènes sans pénétrer dans les tissus de l'hôte. Ceux-ci produisent des molécules biologiquement actives telles que les toxines, qui provoquent les dommages tissulaires sur les sites locaux ou distants.

III.1. L'invasion extracellulaire

Elle permet aux pathogènes d'accéder à des niches dans les tissus où ils sont capables de proliférer, de se disséminer vers d'autres sites dans le corps, exprimer des toxines et initier les réponses inflammatoires.

Il s'agit d'une stratégie utilisée par le streptocoque β -hémolytique du group A et *S. aureus*. Ces espèces sécrètent plusieurs enzymes qui dégradent les molécules des cellules hôtes et contribuent à leur propagation dans les tissus (Tableau II). *P. aeruginosa* sécrète une enzyme, l'élastase, qui dégrade les molécules extracellulaires et facilite l'invasion des tissus associée à une kératite, une nécrose des tissus brûlés et des mucoviscidose.

Il y a de plus en plus de preuves qui suggèrent que les agents pathogènes envahissants extracellulaires peuvent également entrer dans les cellules hôtes et utiliser à la fois les voies extracellulaire et intracellulaire pendant l'infection.

III.2. L'invasion intracellulaire

Elle se produit lorsqu'une bactérie pénètre réellement dans les cellules d'un tissu hôte et survit dans cet environnement. L'adaptation des bactéries à un cycle de vie intracellulaire permet à la bactérie d'éviter le milieu extracellulaire hostile (pH acide, stress physique, défenses de l'hôte), d'accéder à un environnement riche en nutriments, et de faciliter la propagation du pathogène aux tissus hôtes voisins. Un certain nombre de bactéries à Gram négatif et positif et des mycobactérie ont démontré leur capacité à entrer dans les cellules hôtes à la fois phagocytaires et non phagocytaires. Certains agents pathogènes ont un cycle de vie intracellulaire obligatoire qui nécessite absolument une cellule de mammifère pour sa croissance. Beaucoup de ces agents pathogènes bactériens intracellulaires ne sont pas phagocytés par le système immunitaire et s'échappent également des vésicules dans le cytoplasme cellulaire où elles se procurent des éléments nutritionnels et se multiplient rapidement avant de se propager aux cellules adjacentes. Ceux-ci incluent *Chlamydia spp*, *Rickettsia spp* et *Mycobacterium leprae*. D'autres pathogènes sont facultativement intracellulaires, utilisant leur capacité à entrer et à survivre dans les cellules hôtes comme moyen de prolifération ou se propager à d'autres tissus. De plus, certaines bactéries intracellulaires peuvent être intravacuolaires (*Legionella pneumophila*) ou intracytosoliques (*Listeria monocytogenes*) (Fig11).

La disponibilité de récepteurs spécifiques sur les cellules hôtes définit le type de cellules hôtes impliquées. En conséquence, certains agents pathogènes peuvent envahir un large éventail de cellules tandis que d'autres ont un potentiel invasif beaucoup plus restreint. Les récepteurs pour certains agents pathogènes invasifs ont été identifiés.

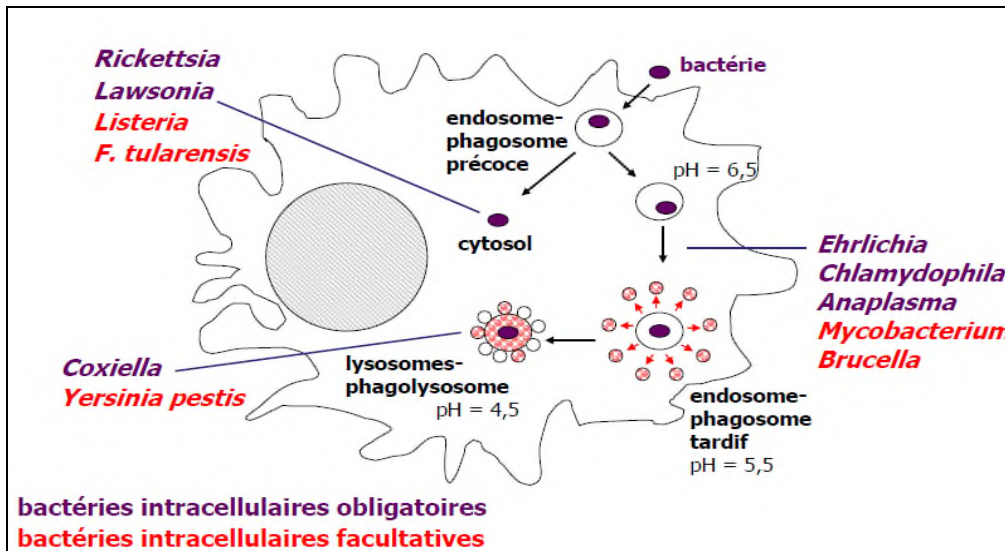


Figure 11. Bactéries intracellulaire obligatoires et facultatives

Les gènes d'invasion présents dans plusieurs pathogènes différents ont été identifiés codant pour un système de sécrétion de type III qui sert à injecter des protéines de signalisation du pathogène dans la cellule hôte. Les protéines injectées activent ensuite les voies de signalisation des cellules hôtes qui permet le réarrangement de l'actine et fait en sorte que le cytosquelette soit recruté pour l'internalisation de l'agent pathogène. C'est le cas de *Salmonella spp* et *Shigella spp*. Ce type d'interaction met en évidence le phénomène de diaphonie biochimique entre l'hôte et l'agent pathogène qui est essentiel pour la pénétration des cellules hôtes.

Tableau II. Facteurs de virulence impliqués dans la dissémination des bactéries pathogènes dans le corps d'un hôte mammifère (Prescott et al., 2013)

Substance	Organisme impliqué	Mécanisme d'action
Coagulase	<i>S. aureus</i>	Coagule le fibrinogène dans le plasma. Le caillot protège la bactérie contre la phagocytose et l'isole des autres défenses du corps
Protéine A		Localisés dans la paroi. Les immunoglobulines G (IgG) se fixent sur la protéine A par leurs extrémités Fc empêchant ainsi l'interaction du complément avec les IgG fixées
Désoxyribonucléase (avec du Ca ⁺⁺ et Mg ⁺⁺)	staphylocoques, streptocoque du groupe A, <i>Clostridium perfringens</i>	Diminue la viscosité des exsudats donnant ainsi plus de mobilité à l'agent pathogène
Hémolysine	staphylocoques, streptocoques, <i>C. perfringens</i> , <i>E. coli</i>	Lyse les érythrocytes en provoquant une anémie et en affaiblissant les défenses de l'hôte: libère du fer qui est disponible pour la croissance microbienne
Hyaluronidase	staphylocoques, streptocoque du groupe A,B,C et G et clostridies	Hydrolyse l'acide hyaluronique, un constituant de la substance fondamentale intracellulaire rassemblant les cellules et rend ainsi possible le passage des bactéries pathogènes dans les espaces intracellulaires.
Leucocidines	Staphylocoques, pneumocoques, streptocoques	Exotoxines formant des pores sur les leucocytes: provoquent la dégranulation des lysosomes dans les leucocytes ce qui réduit la résistance de l'hôte
Streptokinase (fibrinolysine, staphylokinase)	staphylocoques, streptocoques du groupe A, C et G	Une protéine qui se fixe au plasminogène et active la production du plasmine, digérant ainsi la fibrine des caillots: ceci permet à la bactérie de quitter la zone du caillot.
Protéine de l'immunoglobuline A (IgA)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Hydrolyse l'IgA en fragments Fab et Fc
Collagénase	<i>Clostridium sp</i>	Dégrade le collagène formant la charpente des tissus conjonctifs; permet à la bactérie de se répandre
Lécithinase ou phospholipase		Détruit la lécithine (phosphatidyl choline), un composant de la membrane plasmique pour permettre la propagation des bactéries
Elastase et protéases alcaline	<i>P. aeruginosa</i>	Hydrolyse la laminine associée aux membranes basales
Porine	<i>Salmonella typhimurium</i>	inhibe la phagocytose par les leucocytes en activant le système de l'adénylate cyclase
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et ammoniaque (NH ₃)	<i>Mycoplasma sp</i> , <i>Ureaplasma sp</i>	sont des déchets métaboliques. Ils sont toxiques et endommagent l'épithélium du système respiratoire et urogénital
Catalase peroxydase (KatG) et Superoxyde dismutase (SodA et SodC)	<i>M. tuberculosis</i>	Permettent la survie à l'intérieur d'un phagosome.

III.3. Les systèmes de sécrétion

La virulence bactérienne est liée à la synthèse de macromolécules (majoritairement des protéines) jouant souvent des rôles cruciaux dans différents processus physiologiques, dans le transfert horizontal de gènes et / ou interactions hôte-pathogène (adhésion, pathogénicité et survie).

Chez les bactéries pathogènes à Gram négatif, ces molécules sont exportées dans l'environnement, qu'il soit ou non la cellule eucaryote elle-même. Afin de traverser l'enveloppe bactérienne, ces protéines doivent franchir deux obstacles : la membrane interne (MI) et la membrane externe (ME), toutes deux hydrophobes, donc imperméables aux composés hydrophiles. Les bactéries ont ainsi développé des systèmes de sécrétion. Les systèmes de sécrétion peuvent transporter des protéines à partir du cytoplasme bactérien dans le périplasme (les systèmes Sec et Tat), dans l'espace extracellulaire, ou directement dans les cellules cibles.

En revanche, peu de systèmes de sécrétion spécialisés sont connus chez les bactéries à Gram positif. Une exception constitue les systèmes de sécrétion dits de type VII ou T7SS, qui ont été décrits pour la première fois chez *Mycobacterium*, où ils servent de sécrétion spécialisée machineries consacrées à l'exportation de sous-ensembles particuliers de substrats protéiques à travers l'enveloppe cellulaire mycobactérienne complexe et hautement hydrophobe.

Les systèmes de sécrétion diffèrent selon les types de substrats protéiques qu'ils transportent, en particulier si les protéines sont pliées, et si elles ont un peptide signal.

III.3.1. Systèmes de sécrétion Sec et Tat: du cytoplasme au périplasme

La plupart des bactéries à Gram négatif, codent pour la translocase Sec et les voies de translocation de Twin-arginine (Tat) pour déplacer les protéines du cytoplasme à travers la membrane interne vers le périplasme.

❖ **Le système de sécrétion Sec** est commun aux bactéries à Gram négatif, aux bactéries à Gram positif, et les eucaryotes. Les protéines sécrétées par le système Sec sont généralement dépliées, ont un Peptide signal N-terminal, et sont amenées au système de sécrétion Sec par la molécule chaperone SecB. Il permet le passage des protéines vers le périplasme mais il est aussi un des systèmes qui permet l'insertion des protéines dans la MI. Ce système multiprotéique se compose des deux complexes SecYEG et SecDFYajC localisés

au niveau de la MI de la bactérie. De plus, le système comprend la protéine cytoplasmique SecA qui permet un apport d'énergie par l'hydrolyse de l'ATP nécessaire pour le fonctionnement de la machinerie.

❖ **Le système de sécrétion Tat** déplace les protéines repliées à travers la membrane cytoplasmique chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les substrats de cette voie de translocation présentent une séquence signal N-terminale originale contenant deux arginines consécutives. Pour cette raison, ce système a été nommé Tat pour Twin Arginine Translocation²⁴. Cette voie est critique car toutes les protéines ne peuvent pas être sécrétées dans leur état déplié, car certaines protéines qui contiennent des modifications post-traductionnelles, telles que les facteurs redox, sont synthétisées dans le cytoplasme. Les matériaux nécessaires à ces modifications ne seraient pas disponibles extracellulairement ou dans le périplasme et, ainsi, ces protéines doivent être repliées et modifiées dans le cytoplasme avant la sécrétion dans leur état tridimensionnel.

Les systèmes de sécrétion peuvent être répartis en deux catégories selon le nombre d'étapes nécessaire pour l'acheminement de la protéine sécrétée. En effet, la sécrétion peut se faire en une seule étape (du cytoplasme au milieu extracellulaire) ou bien en deux étapes (étape périplasmique). Les systèmes de sécrétion ayant cette caractéristique peuvent être dépendants de Sec ou de Tat. A l'inverse, les systèmes de sécrétion qui permettent le passage de molécules en une seule étape sont dits Sec-indépendants.

III.3.2. Sécrétion en une seule étape: du cytoplasme hors de la cellule (Systèmes sec indépendants)

Les systèmes Sec indépendants sont donc les systèmes permettant la sécrétion de protéines en une seule étape. A ce jour, cette catégorie comporte quatre types de systèmes de sécrétion :

- les systèmes de sécrétion de Type I (T1SS)
- les systèmes de sécrétion de Type III (T3SS)
- les systèmes de sécrétion de Type IV(T4SS)(variable)
- les systèmes de sécrétion de type VI (T6SS)
- les systèmes de sécrétion de Type VII (T7SS) (Gram positif)

III.3.2.1. Système de sécrétion de type I ou T1SS

Les T1SS sont essentiellement des transporteurs ABC complexés avec d'autres composants pour transporter les protéines de différentes tailles à travers les deux membranes de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif. La protéine ABC (liaison ATP cassette) de la membrane interne fournit l'énergie nécessaire pour la sécrétion. Une protéine de fusion membranaire (MFP) est associée à une porine (similaire à TolC) de la membrane externe permettant l'exportation de substrats.

De nombreuses protéines de virulence sont exportées par les T1SS, en particulier les protéines appartenant aux diverses familles de protéines RTX (Repeats-in-Toxin) telle que l' α -hémolysine (HlyA) chez *E. coli*. Autres exemples d'enzymes extracellulaires sécrétées par le T1SS l'adénylate cyclase chez *Bordetella pertussis* et des protéases chez *P. aeruginosa*.

III.3.2.2. Système de sécrétion de type III ou T3SS

Un mécanisme de sécrétion de protéines particulièrement associé aux agents pathogènes est l'injectisome T3SS. Ces derniers comprennent deux classes: les T3SS flagellaires responsables de l'assemblage des flagelles et les non-flagellaires ou injectisome T3SSs, qui livrent les protéines du cytoplasme bactérien directement dans le cytoplasme de cellules cibles eucaryotes. Les deux structures couvrent les membranes bactériennes intérieure et extérieure, et les deux systèmes partagent un noyau commun de neuf protéines structurales. L'activité des systèmes de sécrétion de type III est réglée à la fois aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel.

❖ Les T3SS flagellaires

Les protéines sécrétées par le T3SS flagellaire sont livrées dans l'espace extracellulaire ou attachées à la surface bactérienne, et non pas directement injectées dans la cellule hôte, car le T3SS flagellaire n'a pas le pore de translocation.

❖ Les injectisomes T3SS

Le composant structurel du T3SS est une seringue (appareil à aiguille) qui est composé de 20 à 30 protéines qui sont relativement bien conservées parmi les différents agents pathogènes formant une base, une aiguille extracellulaire, un complexe de pointe et un translocon. L'ensemble de ces appareils commence par la formation d'un corps basal

contenant deux séries d'anneaux couvrant les deux membranes bactériennes interne et externe.

Le corps basal projette un conduit creux en forme de seringue (ou aiguille) à travers lequel les protéines sécrétées dites "effecteurs" passent vers la cellule hôte eucaryote. Ces effecteurs s'associent généralement aux protéines chaperonnes dans le cytoplasme bactérien, qui les livrent au T3SS, où ils sont dépliés et sécrétés dans les cellules cibles. À son extrémité, le T3SS se trouve un complexe protéique qui agit comme un échafaudage pour la formation d'un canal dans la membrane plasmique eucaryote. Les effecteurs, délivrés à travers les pores, sont souvent des analogues structuraux des protéines des eucaryotes; ce qui conduit les bactéries à usurper les fonctionnalités des protéines hôtes qui conduit à moduler une multitude de processus biologiques cellulaires au profit des bactéries qui les codent afin de faciliter l'infection.

Le T3SS peut être divisé en quatre sous-familles:

a) la famille Inv-Mxi-Spa, qui comprend le T3SS de *Salmonella spp.* (codé par la *Salmonella* au niveau de l'îlot de pathogénicité 1, ou SPI-1), *Shigella* et *Burkholderia*. L'aiguille a des dimensions nanométriques ~ 50 nm de long, ~ 7 nm de large et un diamètre de lumen de 1,5 nm à 2,5 nm.

b) la famille Ysc, qui comprend le système Ysc de *Yersinia spp.*, le système Psc de *P. aeruginosa* et le système Asc d'*Aeromonas spp.* Le prolongement s'appelle une aiguille. Celle-ci fait entre 40 et 80 nm de long et à un diamètre interne de 7 nm.

c) la Famille Ssa-Esc, qui comprend le SPI-2 de *S. enterica*, *E. coli* entéropathogène (EPEC) et entérohémorragique (EHEC) (protéine EspA). Le filament est d'une longueur de plus de 600 nm et d'un diamètre interne de 12 nm possédant une certaine flexibilité. il est responsable de l'adhérence de la bactérie à la surface cellulaire.

d) la famille Hrp-1 et Hrp-2 des bactéries phytopathogènes, et d'autres bactéries comme les Desulfovibrionales, Chlamydiales, Myxococcales et Rhizobiales. Le prolongement cellulaire se dénomme pilus et atteint plusieurs µm de long avec un diamètre interne de 6-8 nm.

Ces différences structurales entre les différents prolongements seraient dues à la difficulté d'accès de la bactérie à la cellule hôte. En effet, il faut un prolongement assez long et flexible pour les EPECs et les bactéries phytopathogènes pour traverser respectivement la paroi des cellules épithéliales de l'intestin (mucus) et la paroi des cellules végétales.

On peut aussi retrouver deux T3SS de différentes familles dans la même bactérie mais ayant des fonctions différentes (SPI et SPII de *S. Typhimurium*).

De plus, les T3SS favorisent le mode de vie intracellulaire de certains pathogènes en permettant leur croissance à l'intérieur d'une vacuole comme c'est le cas de *S. enterica* serovar Typhimurium (agent de la salmonellose) ou leur colonisation dans le cytosol de l'hôte cas de *S. flexneri* (agent de la dysenterie bacillaire).

III.3.2.3. Système de sécrétion de type IV ou T4SS

Les T4SS représentent une superfamille très diversifiée de systèmes de sécrétion destinés au transport de manière direct dans la cellule de l'hôte sans aucun contact avec l'extérieur de la cellule. Ces systèmes sont trouvés dans de nombreuses espèces bactériennes (bactéries à Gram négatif et positif). Cette diversité est représentée au niveau fonctionnel par une étonnante capacité collective des T4SS à 1) reconnaître et transloquer des substrats d'ADN simple brin (ss) (machines de conjugaison) à des récepteurs bactériens, 2) livrer des protéines effectrices (systèmes translocateurs effecteurs) à une cible eucaryote les cellules, 3) échanger de l'ADN avec le milieu, 4) contribuer au développement du biofilm et 5) livrer une toxine destructrice aux voisins bactériens (Fig12).

De nombreuses bactéries pathogènes déploient des T4SS comme déterminants de la virulence facilitant leur colonisation et leur propagation dans l'hôte eucaryote. La plupart, sinon toutes les espèces porteuses du T4SS, utilisent alternativement ces machines pour disséminer des éléments génétiques mobiles, souvent porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques pour une meilleure survie dans les environnements cliniques.

Les T4SS sont destinés au transport de protéines seules, de complexes macromoléculaires ou de complexes ADN–protéines directement dans la cellule de l'hôte sans aucun contact avec l'extérieur de la cellule. Ils partagent une origine ancestrale commune avec la machinerie de conjugaison bactérienne. Ils permettent d'effectuer une variété d'activités essentielles pour la réplication et l'échappement au système immunitaire.

Les T4SS sont des complexes multiprotéiques et sont largement classifiés en type IVA (T4ASS) ou IVB (T4BSS) dépendant de leur similitude dans la composition structurale au complexe VirB/D4 du phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* conduisant à la formation de la tumeur du collet ou du système de transfert par conjugaison du plasmide IncI auto-transférable respectivement. Récemment, un nouveau sous-groupe du système de sécrétion T4SS a été décrit chez des bactéries à Gram positif à savoir *Streptococcus suis*. Il s'agit du système de type IV-C.

- **Pathogènes produisant le système de Type IVA: *Bordetella*, *Brucella*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, et *Helicobacter pylori***

Ce type de système de sécrétion est très similaire à celui de *A. tumefaciens*. Sa composition structurale est codée par un opéron contenant 11 gènes.

- *Bartonella* (dont *B. henselae* responsable de la maladie des griffes du chat) possède deux T4ASS: le système VirB dont ses effecteurs (Beps) sont vraisemblablement responsables des effets cellulaires lors de l'interaction de la bactérie avec les cellules endothéliales de l'hôte; et le système TrW, nécessaire à l'infection des érythrocytes.

- Chez *B. pertussis*, le système Ptl permet le transport de la toxine pertussique vers l'extérieur de la bactérie.

- Très récemment, la structure de la membrane externe d'un T4ASS éloigné du système VirB/VirD4 d'*A. tumefaciens*, à savoir Cag T4SS a été identifiée chez *H. pylori*. En effet, ce complexe est considérablement plus grand (~ 41 nm contre ~ 18 nm pour les T4SS de type VirB / VirD4) et est composé d'au moins cinq sous-unités (CagT de type VirB7, CagX de type VirB9, CagX de type VirB10, CagY de type VirB10, Cag3, CagM). Néanmoins, le complexe du noyau de la membrane externe Cag adopte une architecture en forme d'anneau qui ressemble généralement à ceux des T4SS de type VirB / VirD4. chez *H. pylori* les molécules effectrices sécrétées par le système Cag serait à l'origine de réarrangements du cytosquelette de la cellule. Après phosphorylation par les tyrosines kinases cellulaires, CagA participe à l'adhérence de la bactérie.

- **Pathogènes produisant le système de Type IVB: *Legionella* et *Coxiella***

- *Legionella pneumophila* contient 27 gènes codant pour le T4BSS nommé le système de sécrétion Dot/Icm (Dot pour Defective in organelle trafficking; Icm pour Intracellular multiplication) codé par le plasmide auto-transférable IncI. Le système Dot/Icm peut sécréter à la fois l'ADN et les protéines effectrices. Ce système, comme dans le cas de *Brucella*, joue un rôle essentiel dans la multiplication intracellulaire de la bactérie.

- *Coxiella burnetii* (responsable de la fièvre Q chez les animaux) possède le système de sécrétion Dot/Icm T4SS très similaire à celui de *L. pneumophila* avec, toutefois, quelques différences incluant l'absence des protéines IvgA et IcmR.

Malgré leurs différentes compositions structurales, ces systèmes ont en commun un pore central qui traverse la membrane et le périplasma de la surface des bactérie Gram négatives. Les analyses structurales et biochimiques de ces systèmes notamment chez *A. tumefaciens* ont permis d'identifier trois groupes fonctionnels de protéines VirB:

- ❖ le pilus sur la surface bactérienne (VirB2 et VirB5) qui permettrait le contact entre la bactérie et la cellule hôte, induisant soit l'assemblage du système de transport dans la zone de contact, soit le recrutement dans cette même zone des complexes assemblés au préalable;
- ❖ le canal transmembranaire ou core (VirB1, VirB3 et VirB6 à VirB10) traversant les membranes internes et permettant le transfert du complexe sécrété vers l'extérieur .
- ❖ trois ATPases (VirB4, VirB11 et VirD4) sur le côté cytoplasmique de la membrane interne assurant l'apport énergétique nécessaire pour l'assemblage du complexe ainsi que le transport de substrats à travers le pore.

Les composants de la machinerie de transport sont codés par l'opéron virB. De nombreux T4SS ont des « coupling proteins » (T4CP) associées servant au recrutement des effecteurs.

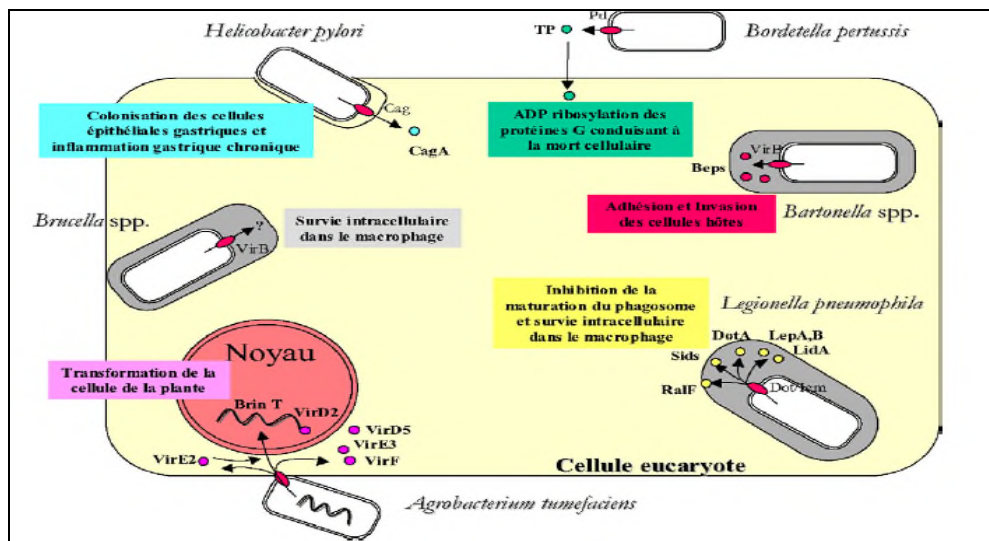


Figure 12. Représentation schématique des différents mécanismes dépendant des systèmes de sécrétion de type IV (Lavigne et al., 2006)

Les trois sous-familles de T4SS sont indiquées. Les systèmes de conjugaison libèrent l'ADN dans la bactérie cible ou d'autres cellules par un contact cellule-cellule. L'ADN simple brin est entraîné par des protéines pilotes. Les systèmes « compétence et libération d'ADN » échangent l'ADN avec le milieu extracellulaire indépendamment de tout contact avec des cellules cibles. La sécrétion d'effecteurs délivre l'ADN ou des protéines aux cellules eucaryotes durant l'infection. Les systèmes de sécrétion d'effecteurs participent grandement aux différentes possibilités du processus infectieux des bactéries pathogènes.

ADNdb, ADN double brin ; ADNsb, ADN simple brin.

III.3.2.4. Système de sécrétion de type VI ou T6SS: Du cytoplasme bactérien à une cellule cible

Le système de sécrétion de type VI (T6SS) est un mécanisme récemment découvert chez les bactéries à Gram négatif incluant *P. aeruginosa* et *Vibrio cholerae* (sécrétion des protéines Hcp; Hemolysin-Coregulated Protein) qui cible les protéines des cellules procaryotes et eucaryotes. Comme pour le système de sécrétion de type III, le T6SS transfère les substrats directement dans les cellules réceptrices de manière dépendante du contact. Les T6SS sont des appareils de translocation effecteurs, homologue à la structure de la queue trouvée dans les bactériophages, composé d'au moins 13 protéines appelées composants de base (TssA-M, pour la sécrétion de type six). Les systèmes de sécrétion de type VI sont ancrés à l'enveloppe cellulaire par un complexe de noyau membranaire, qui sert comme station d'accueil et de plate-forme pour l'assemblage de la plaque de base et empêche les dommages aux cellules de la membrane pendant l'injection effectrice.

Les T6SS participent à une grande variété de fonctions, notamment la virulence et l'activité antibactérienne (production d'antibiotiques ou de bactériocines), mais également à l'absorption des ions métalliques, comme celle du fer, du manganèse et du zinc, ce qui confère un avantage au cours des compétition bactérienne. Fonctionnellement, les T6SS se divisent en quatre catégories: (a) ciblage des cellules bactériennes, (b) ciblage des cellules eucaryotes, (c) ciblage des cellules bactériennes et eucaryotes, et (d) autre. Le dernier comprend les systèmes impliqués dans des processus tels que la conjugaison, la régulation des gènes et l'adhésion cellulaire.

Le T6SS possède également deux autres systèmes de sécrétion T6SS1 et T6SS2 et est plus actif à température élevée et dans des conditions de faibles concentrations en sel. Ce système de sécrétion est très efficace dans le transport des protéines, et il fournit aux cellules une protection à la fois défensive et offensive contre d'autres bactéries qui utilisent également le T6SS. Une étude récente suggère qu'une augmentation de la densité cellulaire augmente la concentration des composants T6SS dans les bactéries. Ce système de sécrétion pourrait donc servir de signal dans la communication inter-bactérienne comme c'est le cas de la voie du quorum sensing qui contrôle la formation de biofilm chez certaines bactéries.

Identifiés à l'origine comme un déterminant de la virulence, des résultats récents indiquent que la majorité des T6SS sont utilisés comme outils antibactériens dans la

compétition interbactérienne. Les effecteurs T6SS qui possèdent des activités antibactériennes connues comprennent les peptidoglycanes hydrolases, les phospholipases, les nucléases et les toxines porogènes, et ils peuvent agir soit dans le cytosol, soit dans le périplasma de la cellule bactérienne réceptrice, en fonction de leur cible. Notamment, les gènes codant pour les protéines d'immunité qui protègent contre l'auto-intoxication se trouvent directement à côté de leurs effecteurs antibactériens apparentés.

III.3.2.5. Système de sécrétion de type VII (T7SS) chez les bactéries Gram positives

Peu de systèmes de sécrétion spécialisés sont connus chez les bactéries à Gram positif. Une exception constitue les systèmes de sécrétion dits de type VII (T7SS), qui ont été décrits pour la première fois chez le complexe *M. tuberculosis* dénommé ESX-1 (early-secreted antigenic target). Ce système est responsable de la sécrétion des facteurs de virulence EsxA, EspB et EspA à travers l'enveloppe cellulaire mycobactérienne complexe et hautement hydrophobe. Le système ESX-1 est un facteur de virulence majeur chez les mycobactéries. En effet, il joue un rôle important dans le cycle d'infection des macrophages des mycobactéries pathogènes. L'absence de ce système est responsable de l'atténuation du vaccin BCG de la souche vivante *M. bovis*.

Les substrats du T7SS ne contiennent pas de séquences de signaux classiques et donc ne dépendent pas des systèmes Sec ou Tat pour la sécrétion, on pourrait donc supposer que T7SS est un processus en une seule étape. En effet, la taille du complexe T7SS lui permet de couvrir à la fois la membrane interne et la membrane externe. Les quatre sous-unités qui le constitue sont toutes insérées dans la membrane interne.

Les systèmes ESX ont maintenant été identifiés dans un certain nombre de bactéries dans l'ordre Corynebacterales. De plus, des substrats analogues et certains composants de ces systèmes ont également été identifiés dans un certain nombre d'organismes Gram positifs dépourvus de mycomembranes, y compris les agents pathogènes *S. aureus*, *B. anthracis* et *L. monocytogenes*.

À ce jour, cinq T7SS ont été identifiées chez les mycobactéries, nommées ESX-1 à ESX-5, bien que toutes les mycobactéries n'hébergent pas les cinq systèmes. En fait, seuls ESX-3 et ESX-4 se trouvent dans toutes les espèces mycobactériennes. Curieusement, bien que ESX-4 semble être le système le plus ancien, la sécrétion de ESX-4 n'a pas encore été démontrée et il manque plusieurs gènes trouvés dans la plupart des autres systèmes. La sécrétion de ESX-2 n'a pas non plus été démontrée.

La plupart des substrats T7SS peuvent être divisés en deux familles: les protéines Esx, qui se trouvent chez les firmicutes et les actinobactéries, ainsi que les protéines PE et PPE, qui sont plus spécifiques aux mycobactéries. Il a été démontré que ces familles sont sécrétées sous forme d'hétérodimères pliés, ce qui suggère qu'il s'agit d'une caractéristique conservée des substrats T7SS.

Chez *M. tuberculosis*, les substrats sécrétés par ESX-3 sont essentiels à l'acquisition du fer et à la croissance *in vitro*, tandis que ESX-1 et ESX-5 sont essentiels pour la virulence mais pas pour la croissance dans le milieu. Ainsi, ces systèmes jouent apparemment des rôles divers selon les espèces de mycobactéries. Cette diversité de fonctions est probablement également vraie dans leurs rôles chez d'autres bactéries.

III.3.3. Sécrétion en deux étapes: du périplasma hors de la cellule (Systèmes sec dépendants)

Les bactéries Gram-négatives possèdent plusieurs stratégies pour le transport de protéines du périplasma à travers la membrane externe, après être retenues sur la surface bactérienne ou excrétées dans l'environnement.

Ces systèmes appelés "Sec-dépendant" comportent quatre systèmes de sécrétion :

- les systèmes de sécrétion de Type II (T1SS)
- les systèmes de sécrétion de Type V (T5SS) (incluant les autotransporters et les systèmes de sécrétion à deux partenaires).
- les systèmes de sécrétion de Type VIII (T8SS)
- . les systèmes de sécrétion de Type IX (T9SS)

III.3.3.1. Système de sécrétion de type II ou T2SS

Le système de sécrétion de type II (T2SS) a été décrit pour la première fois chez *Klebsiella oxytoca*. Ce système est considéré comme un processus en deux étapes; c'est-à-dire, les protéines à sécréter sont d'abord transportées à travers la MI et dans le périplasma par la voie Sec ou Tat puis, après pliage en conformation tertiaire (et dans certains cas, subissant une oligomérisation), sont transportées à travers la ME.

Le système T2SS est composé de 12 protéines «centrales», désignées par T2SS C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et O. Il existe quatre sous-complexes:

(1) une «sécrétine» ME, qui est un pentadécamère de la protéine T2SS D qui fournit un pore à

travers la membrane;

(2) une plateforme de la MI composée de T2SS C, F, L et M, avec T2SS C fournissant une connexion à la sécrétine ME;

(3) une ATPase cytoplasmique, qui est un hexamère de T2SS E recruté sur la plateforme MI;

(4) un périplasme couvrant un pseudopilus qui est un filament hélicoïdal de la principale pseudopiline T2SS G coiffée par le pseudopilines mineures T2SS H, I, J et K.

(5) T2SS O qui est une peptidase de MI qui clive et méthyle les pseudopilines avant leur incorporation dans le pseudopilus.

Collectivement, les agents pathogènes humains qui expriment le T2SS sont responsables de diverses maladies, allant de la pneumonie (*Acinetobacter baumannii*, *L. pneumophila*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*) à la gastro-entérite et à la diarrhée (*E. coli*, *V. cholerae* et *Yersinia enterocolitica*), aux bactéries retrouvées dans la circulation sanguine (*Aeromonas hydrophila*, *B. pseudomallei* et *V. vulnificus*), dans les voies urinaires (*E. coli*) et dans les voies génitales (*Chlamidia trachomatis*). En outre, ces bactéries comprennent à la fois des pathogènes extracellulaires et intracellulaires. Ces faits impliquent que T2SS facilite la maladie de diverses manières et ne se limite pas à un agent pathogène particulier ou un site d'infection. Et ce par le fait est que de nombreux types d'enzymes hydrolytiques et de toxines sont sécrétées par le T2SS; tels que les enzymes ADP-ribosylantes, enzymes dégradant les glucides, enzymes lipolytiques, nucléases, phosphatases, peptidases et protéases porogènes. Des exemples particulièrement bien connus de substrats dépendants de T2SS sont la toxine cholérique produite par *V. cholerae*, l'exotoxine A de *P. aeruginosa* et la toxine thermolabile (LT) de *E. coli* entérotoxigène.

III.3.3.2. Système de sécrétion de type V ou T5SS

Les substrats du système de sécrétion de type V (T5SS) sont différents des autres systèmes qui traversent la membrane bactérienne à l'aide d'un appareil de sécrétion dédié ou d'un canal membranaire, le T5SS se sécrètent lui-même. Ces protéines ou groupes de protéines portent leur propre domaine β , qui s'insère dans la membrane externe et forme un canal par lequel le reste de la protéine ou une protéine distincte est transporté. Parce que la sécrétion de protéines par les T5SS ne se produit que dans la membrane externe, ces protéines doivent d'abord être transloquées à travers la membrane interne et dans le périplasme dans un

état déplié par l'appareil Sec. Par conséquent, les protéines T5SS portent une séquence signal Sec N-terminale qui est clivée au fur et à mesure qu'elles passent dans le périplasme.

Les substrats T5SS les plus connus sont les protéines de virulence, servant de toxines et de protéines de liaison aux récepteurs. Certains exemples de substrats T5SS qui jouent un rôle important dans la pathogenèse comprennent l'immunoglobuline A protéase de *N. gonorrhoeae*, qui clive les anticorps de l'hôte, la protéine IcsA de *S. flexneri*, qui favorise la motilité intracellulaire à base d'actine et sert également d'adhésine et YadA de *Y. enterocolitica*, qui aide à promouvoir la translocation des substrats T3SS dans les cellules hôtes et aide à la médiation de la résistance à l'attaque par le système du complément hôte.

Les T5SS peuvent être séparés en trois classes, selon le nombre de protéines impliquées dans le processus de sécrétion. Ces classes comprennent:

❖ La sécrétion d'autotransporteur

Les autotransporteurs contiennent des composants qui leur permettent de se sécréter. Plus spécifiquement, les autotransporteurs contiennent 3 à 4 domaines: un domaine translocateur à l'extrémité C-terminale qui forme le canal de la membrane externe, un domaine de liaison, un domaine passager qui contient la partie fonctionnelle de la protéine d'autotransporteur, et parfois, un domaine de protéase qui clive hors du domaine passager une fois qu'il a traversé le canal.

Après la sécrétion de la protéine autotransporteur dépliée à travers la MI, le domaine du translocateur s'assemble dans la ME, formant un tonneau β à 12 brins, généralement à l'aide d'un certain nombre de facteurs accessoires, y compris le chaperon périplasmique Skp et le complexe Bam. Le domaine de liaison flexible mène ensuite le domaine des passagers à travers le canal vers l'extérieur de la cellule. Une fois que le domaine transporteur a atteint l'extérieur de la cellule, il est libéré par son propre domaine protéase ou reste attaché au domaine translocateur et fait saillie à l'extérieur de la cellule.

❖ La sécrétion à deux partenaires

Alors que la majorité des substrats T5SS sont sécrétés via le mécanisme d'autotransporteur, quelques-uns dépendent de différents polypeptides pour le transport à l'extérieur des cellules. Dans un processus appelé sécrétion à deux partenaires, une paire de

protéines participe au processus de sécrétion, dans lequel un partenaire porte le domaine du feuillet- β , tandis que l'autre partenaire sert de protéine sécrétée.

Une sécrétion à deux partenaires a été observée dans une grande variété de bactéries à Gram négatif et est principalement responsable du transport de grandes protéines de virulence, telles que l'hémagglutinine filamenteuse de *B. pertussis* et les adhésines de poids moléculaire élevé HWM1 et HWM2 de *Haemophilus influenzae*.

❖ La sécrétion par la voie chaperon usher (Vc)

Une troisième sous-catégorie de T5SS comprend des protéines sécrétées à l'aide de deux autres protéines: la protéine usher, qui forme le canal du feuillet- β dans la ME et le chaperon, une protéine périplasmique qui facilite le repliement de la protéine sécrétée avant la livraison à travers le canal. Ce système est dédié à la sécrétion et l'assemblage d'appendices de surface tels que les pili P d'*E. coli* uropathogène mais interviendrait aussi dans la formation de la capsule bactérienne.

III.3.3.3. Système de sécrétion de type 8 (T8SS)

Le système de sécrétion de type 8 (T8SS), a été découvert au début des années 2000. Il n'a été trouvé que dans certaines espèces d'agents pathogènes chez les animaux.

Diverses souches de bactéries sont capables de produire une classe unique d'amyloïdes fonctionnels appelés curli, qui sont essentiels pour la formation de biofilm, l'adhésion des cellules hôtes et la colonisation des surfaces inertes. Les curli sont sécrétés via le T8SS, et ils partagent des caractéristiques biochimiques et structurales avec les fibres amyloïdes qui ont été impliquées dans des maladies délétères chez l'homme.

Chez *E. coli*, ce système est composé des produits de sept gènes spécifiques de curli (csg) codés par deux opérons transcrits séparément, csgBAC et csgDEFG. Les protéines de la sous-unité curli CsgA et CsgB traversent la membrane interne via la voie sécrétoire générale Sec, après quoi CsgE, CsgF et CsgG orchestrent la translocation de CsgA et CsgB à travers la membrane externe où elles s'assemblent en polymères curli.

III.3.3.4. Système de sécrétion de type IX (T9SS)

Récemment, un nouveau système de sécrétion de type IX (T9SS) a été découvert. Il s'agit d'un complexe protéique trouvé seulement dans certaines espèces du phylum des Bacteroidetes.

Le T9SS joue deux rôles, selon le mode de vie des bactéries. Il fournit soit un moyen de mouvement (appelés motilité glissante) pour les bactéries environnementales pacifiques ou une arme pour les agents pathogènes. Les espèces les mieux étudiées de ces deux groupes sont *Flavobacterium johnsoniae*, un microorganisme commensal souvent présent dans l'eau et le sol, et *Porphyromonas gingivalis*, un agent pathogène oral humain qui est un agent causal majeur de la parodontite. Chez *P. gingivalis* et certains autres parodontopathogènes, le T9SS sécrète des protéines, en particulier les facteurs de virulence, à travers la ME. Des protéines destinées pour la sécrétion portent un domaine C-terminal conservé qui les dirige vers le translocon de la ME. Au moins 18 protéines sont impliquées dans ce processus encore énigmatique, avec certaines se sont engagés dans la modification post-traductionnelle des protéines sécrétées du T9SS. La variété de celles-ci, même au sein d'une seule espèce est grande et comprend de nombreuses adhésines et enzymes hydrolytiques utilisées pour la fixation et la dégradation de grands composés organiques sous forme de protéines, de cellulose et de chitine.

La figure 13 décrit les différences structurales et fonctionnelles des systèmes de sécrétion.

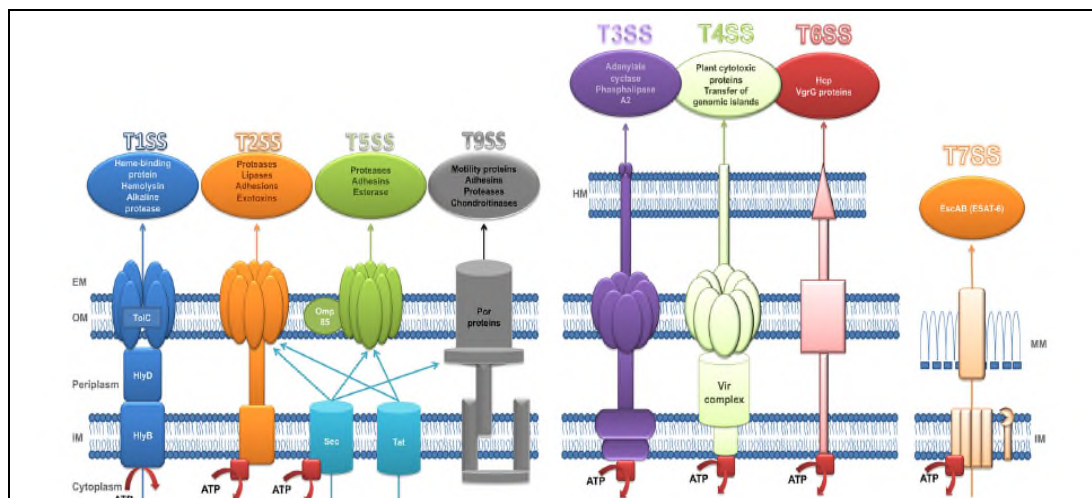


Figure 13. Représentation schématique des systèmes de sécrétion (Pena et al., 2019)

Le T1SSI est illustrée par la sécrétion d'hémolysine A (HlyA) dans *E. coli* où TolC, HlyD et HlyB sont les trois composants qui constituent le canal de transport de HlyA vers l'espace extracellulaire. Sec (voie de sécrétion générale) et Tat (translocation de double-arginine voie) transférer les substrats de T2SS et T5SS à travers la membrane interne. Sec participe également au transport de substrats T9SS à travers de inner membrane. T9SS est également appelé Por Sécrétion System (PoSS). T4SS est représenté par le système VirB /D d'*A. tumefaciens*.

Le T7SS est basé sur un système chez les mycobactéries. Les carrés rouges représentent les ATPases. HM, membrane hôte; EM, milieu extracellulaire; OM, membrane externe; IM, membrane interne; MM, mycomembrane. Les substrats sécrétés par chaque système sécrétoire sont inclus dans un cercle en haut de la figure

IV. Pouvoir toxinogène

IV.1. Définition des toxines bactériennes

La première description de la production d'une molécule provoquant des dommages aux cellules eucaryotes par une bactérie date de 1888 lorsque Emile Roux et Alexander Yersin ont identifié le diphtérie «toxine». Le mot «toxine» utilisé par Roux et Yersin probablement dérive du mot grec «toxicon»(Τοξικον), signifiant « poison ». Au 19^e siècle, le tétanos et les toxines du botulisme ont également été décrites par Faber en 1890 et par Van Ermengen en 1898 respectivement. Et beaucoup d'autres étaient décrites au cours du 20^e siècle.

Les toxines bactériennes, produites par des bactéries principalement comme facteurs de virulence, sont les plus puissantes poisons produits dans la nature et sont connus pour conserver un niveau d'activité très élevé après dilution (molécule très puissante). Ces molécules sont capables de réaliser certaines des tâches les plus remarquables, telles que la formation de nanomachines étonnantes, le ciblage spécifique, l'apprentissage et utilisant des processus cellulaires ou des modifications de composants cellulaires. De plus, l'intoxication processus lui-même implique des étapes très sophistiquées. Ces qualités uniques suscitent un immense intérêt pour les biochimistes, les biotechnologistes, les ingénieurs en protéines, les scientifiques et les pharmacologistes à utiliser ces molécules pour une meilleure compréhension des processus biochimiques ou pour concevoir de futurs.

IV. 2. Classification des toxines bactériennes

Les bactéries pathogènes produisent deux types de toxines, les lipopolysaccharides (LPS) et les toxines protéiques. Les LPS sont des toxines associées aux cellules libérées après la perturbation de la cellule (**endotoxines**), tandis que les toxines protéiques sont synthétisées à l'intérieur des cellules puis libérées dans les cellules cibles (**exotoxines**) (Tableau III).

IV.2.1. Les endotoxines

Le LPS est situé sur la face externe des bactéries à Gram négatif. Il est susceptible de jouer plusieurs rôles dans la pathogenèse des infections bactériennes à Gram négatif. Agissant comme une barrière de perméabilité, il n'est perméable qu'aux molécules hydrophiles de faible poids moléculaire. Ces toxines sont généralement disponibles pour action seulement après la mort et la lyse des bactéries auxquelles elles appartiennent. Le LPS agit comme barrière au lysozyme et à de nombreux agents antimicrobiens. Cela empêche également la

destruction des cellules bactériennes par les composants sériques et les cellules phagocytaires. De plus, le LPS joue un rôle important en tant que structure de surface dans l'interaction du pathogène avec son hôte. Il peut être impliqué dans l'adhérence ou au changements antigéniques qui déterminent le cours et l'issue d'une infection.

La chaîne O-spécifique est la partie du LPS qui est principalement responsable de sa reconnaissance immunitaire. Des variations mineures de la structure du O-polysaccharide permet de faire d'énormes différences dans la virulence des infections bactériennes. La perte d'antigène O entraîne la perte de virulence. Il existe ce qu'on appelle le LPS lisse ou « LPS-smooth » et LPS rugueux ou «LPS rough». Ces LPS se caractérisent par la présence ou l'absence d'antigène O respectivement, suggérant que cette portion est importante pendant l'interaction hôte-pathogène. La perte des parties les plus proximales du noyau chez les mutants, rend les souches sensibles à une gamme de composés hydrophobes, y compris les antibiotiques, les détergents, les acides biliaires, etc. Cette zone contient un grand nombre des groupes chargés et est considéré comme important dans le maintien de la perméabilité et des propriétés de la ME bactérienne.

❖ **Les fragments lipidiques A** sont les composants qui produisent tous les dommages causés par l'infection. Ses effets nocifs sont multiples et varient en fonction de l'espèce animale, du lieu de l'infection et de l'espèce bactérienne (= choc septique ou endotoxinique). Les lipides A (le composant toxique du LPS) et les chaînes latérales polysaccharidiques (la partie non toxique mais immunogène du LPS) agissent comme des déterminants de la virulence chez les bactéries à Gram négatif⁴¹. Le lipide A, qui est toxique à partir de quantités de quelques picomoles, se fixe sur une protéine fixatrice du LPS, la LBP (« LPS binding protein »). Le complexe lipide A-LBP se fixe ensuite aux macrophages sur des récepteurs spécifiques incluant: i) le récepteur CD14 ; et ii) le récepteur TLR-4 (« Toll-Like Receptor 4 »), Une fois le lipide A fixé sur les macrophages, ces derniers vont sécréter des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8), le TNF α (« Tumour Necrosis Factor alpha »), le PAF (« Platelet-Activating Factor »). À hauteur de leurs cellules cibles respectives, ces différentes cytokines vont activer, après fixation sur des récepteurs spécifiques, la production des médiateurs de l'inflammation, comme les prostaglandines et les leukotrines. Les cascades du complément et de la coagulation (via l'activation du facteur XII) sont également initiées, Dans le cas d'infections sévères avec des bactéries Gram négatives, une production en excès de ces différents

médiateurs, comme conséquence d'une libération en grande quantité de LPS/lipideA suite à la mort et à la lyse des bactéries, ainsi qu'une hyperactivation du système du complément, peuvent produire des dommages irréversibles dans différents organes avec l'apparition de décompensations multiples et de choc endotoxique, menant au coma et à la mort.

Tableau III. Quelques propriétés générales d'endotoxines et d'exotoxines typiques
(Galmiche et Boquet, 2001)

Propriétés	Endotoxine	Exotoxine
Nature chimique	Lipopolysaccharide	protéine
Localisation	Partie de la membrane externe	extracellulaire
Dénaturation par chauffage	Non	Oui (Généralement)
Antigénique	Oui	Oui
Forme toxoïde	Non	Oui
Puissance	Relativement basse	Relativement élevée
Spécificité	Bas niveau	Haut niveau
Activité enzymatique	Non	Oui (Généralement)
Pyrogénicité	Oui	Occasionnellement

IV.2.2. Les exotoxines

Les exotoxines bactériennes ont été nommées au moment de leur identification selon de nombreux et divers critères:

- Signe clinique ou lésion (dermonécrotique toxine, toxine tétanique, toute toxine mortelle),
- Organe ou tissu cible (entérotoxine, pneumotoxine),
- Noms de genre bactérien ou espèces (streptolysine, perfringolysine, listériolysine) ou de cellules cibles *in vitro* ou *in vivo* (Verocytotoxines, leucotoxine, hémolysine) ou de pionniers en sciences biomédicales (toxines Shiga),
- Une circonstance ou un événement lié à la maladie (toxine botulique, ce qui signifie saucisse).
- Propriétés physico-chimiques (thermostable ou thermolabile)
- En lettre grec ou latin (toxines α , β , ϵ , ι , exotoxine A), et bien d'autres critères.

Il est donc commun pour la même toxine à transporter deux ou trois noms différents. Toutefois, les toxines bactériennes sont assez souvent classées selon leur structure et leurs mode d'action (Tableau IV).

Tableau IV. Classification des exotoxines bactériennes selon leur mode d'action (Salyers et Whitt, 2002)

	Autre appellation	Activité	Rôle dans la cellule	Rôle chez l'hôte	Exemple
Classe I	Superantigène ou immunotoxine	Interaction avec le CMH II	Production de cytokine par les lymphocytes T	Apparition de fièvre et choc toxique	Syndrome de choc toxique staphylococcique, entérotoxine de <i>S. aureus</i>
Classe II	Toxine à activité membranaire				
Sous-classe 1		Hydrolyse des phospholipides de la membrane cytoplasmique	Lyse cellulaire	Gangrène, lyse tissulaire, extension de l'infection	Toxine alpha de <i>C. perfringens</i>
Sous-classe 2		Formation de pores sur la membrane cytoplasmique	Lyse cellulaire et/ou du phagosome	Destruction des macrophage, passage transcellulaire	Hémolysine de <i>L. monocytogenes</i>
Classe III	Toxine intracellulaire de type AB				
Sous-classe 1		ADP-ribosylation de la cible avec hyper- ou inactivation	Arrêt de la synthèse des protéines et mort cellulaire, surproduction d'AMP cyclique	Production de tissu nécrotique et de fausses membranes, hypersécrétion d'eau et d'électrolytes et diarrhée	Toxine diphtérique, entérotoxine de <i>V. cholerae</i>
Sous-classe 2		Clivage d'un ARN ribosomal	Arrêt de la synthèse des protéines et mort cellulaire	Encore non élucidé	Vérocytoxine de <i>S. dysenteriae</i> et <i>E. coli</i>
Sous-classe 3		Protéolyse	Hydrolyse des synaptobrevines, constituants protéiques des vésicules présynaptiques responsables de la libération des neurotransmetteurs ou inhibiteurs	Perturbation de la transmission de l'influx nerveux moteur	Toxine de <i>C. tetani</i> et <i>C. botulinum</i>
Autres classes	Toxines peptidiques	Interaction avec un récepteur membranaire spécifique	Activation de la production de la GMP cyclique	Hypersécrétion d'eau et d'électrolytes	Entérotoxine thermostable de type a de <i>E. coli</i>

IV. 3. Mode d'action des toxines

Les toxines bactériennes sont de puissants facteurs de virulence qui perturbent les fonctions de la cellule de l'hôte en modifiant l'activité des protéines intracellulaires grâce à plusieurs stratégies uniques. Ce faisant, des changements se produisent non seulement dans le substrat, mais ils influencent également la conformation de l'enzyme.

❖ Toxine AB

Il s'agit d'un groupe de toxines à mode d'action intracellulaire qui injectent des enzymes toxiques dans des cellules de l'hôte distantes une fois qu'ils ont pénétré dans les cellules par endocytose médiée par les récepteurs. Ils sont appelés toxines AB en raison de la présence d'une chaîne polypeptidique généralement organisée en deux domaines :

- **Un domaine A** contient l'activité enzymatique (toxique). Cette activité varie d'une toxine à l'autre et peut être une activité ADP ribosylante (toxine cholérique, toxine pertussique et toxine diphtérique), une activité protéolytique (toxine tétanique ou toxine botulinique), une activité N-glycosidase (ToxA et ToxB de *C. difficile* ou toxines dimériques Shiga (Stx) de *S. dysenteriae* et d'*E. coli*) ou une activité adénylate cyclase (toxine EF de *B. anthracis* ou la toxine CyaA de *Bordetella pertussis*).
- **Un domaine B** qui est responsable de l'interaction avec les cellules de l'hôte et qui varie d'une toxine à l'autre et est responsable des spécificités tissulaires. Selon la toxine, il existe plusieurs associations possibles entre les deux sous-unités A et B (Fig14).

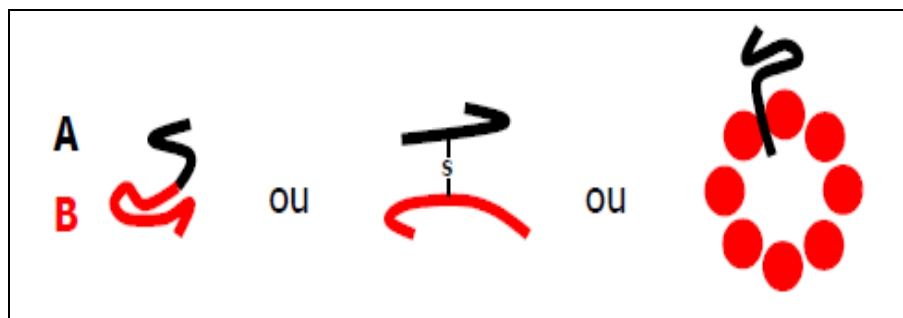


Figure 14. Les associations possibles entre A et B des toxines AB.

A = partie enzymatique qui agit sur des protéines intracellulaires.

B = liaison à un récepteur cellulaire spécifique et capacité d'internalisation cellulaire

Deux stratégies semblent avoir été exploitées par ces toxines pour permettre l'introduction de leurs activités toxiques dans les cellules (Fig15):

- **Toxine à cheminement court:** Elle est illustrée par l'action de la toxine diphtérique (DT) produite par *Corynebacterium*. Elle regroupe également les neurotoxines clostridiales (toxines tétanique et botuliniques), les toxines de *B. anthracis* et le facteur cytotoxique nécrosant d'*E. coli* (CNF1)). Dans ce mécanisme, la toxine inclut dans sa structure un domaine polypeptidique qui lui permet de subir une translocation à travers la membrane. La DT injecte sa sous-unité A à partir d'un compartiment endosomal, donc juste après son entrée dans la cellule.
- **Toxines à cheminement long:** Stratégie utilisée par les toxines AB pour injecter leur activité catalytique dans le cytoplasme décrite dans le cas des toxines de *S. dysenteriae* (toxine de shiga ou toxines apparentées), de la toxine cholérique (TC), et de l'exotoxine A de *P. aeruginosa* (ETA). Ce type de toxine fait appel à un appareil de translocation des protéines inhérent à la cellule. Ces toxines ne contiennent pas leur propre système de translocation membranaire. Elles utilisent le translocon, un appareil de translocation des protéines qui réside dans le réticulum endoplasmique. Après leur endocytose, ces toxines sont transportées jusqu'au réticulum endoplasmique par une étape de transport rétrograde. Le transport rétrograde de l'appareil de Golgi au réticulum endoplasmique peut être effectué par des intermédiaires vésiculaires Erd2p+ ou tubulaires Rab6+ dans les cas respectifs de la TC et des toxines de shiga.

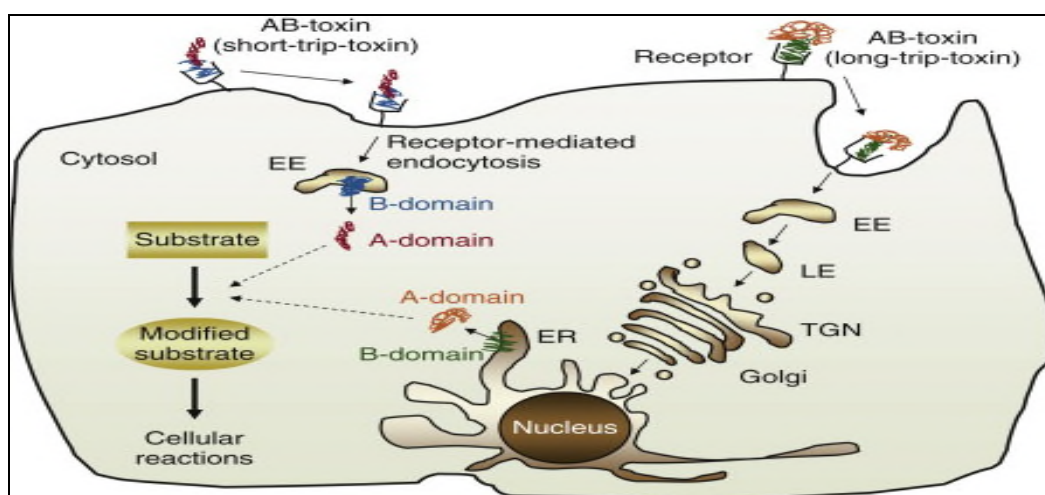


Figure 15. Le mode d'action des exotoxines bactériennes de type AB

EE: Endosomes acidifiés précoces; LE: endosomes tardifs; TGN: le réseau trans-Golgi; ER: réticulum endoplasmique (Galmiche et Boquet (2001))

Ces différentes toxines A-B intracellulaires partagent donc des traits similaires dans leurs structures générales et interaction avec les cellules cibles, mais diffèrent par leur précision, les mécanismes de toxicité et les molécules cibles.

Sur la base de la cible et de l'action des toxines bactériennes, les groupes spécifiques suivants peuvent être identifiés:

- a) Toxines perturbant l'intégrité de la membrane.
- b) Toxines ciblant les composants du cytosquelette d'actine
- c) Toxines ciblant l'ubiquitine et la signalisation de type ubiquitine.
- d) Toxines affectant les messagers secondaires et les composants de signalisation.
- e) Toxines ciblant les mécanismes de traduction cellulaire.
- f) Toxines ciblant l'ADN et induisant un stress endoplasmique du réticulum.
- g) Toxine activant le système immunitaire "superantigène"

IV.3.1. Toxines perturbant l'intégrité de la membrane

Il s'agit d'un groupe de toxines qui perturbent la membrane et l'intégrité de la bicouche lipidique en formant des pores de tailles différentes et une sélectivité moléculaire ou en raison de leur activité phospholipase. Les toxines interagissant avec le cholestérol et les hémolysines RTX sont les principales toxines formant des pores.

Les toxines interagissant avec le cholestérol sont des molécules de 50 à 60 kDa produites par de nombreuses bactéries à Gram positif, en particulier des genres *Streptococcus* (streptolysine O, pneumolysine), *Listeria* (listériolysine), *Clostridium* (perfringolysine), *Staphylococcus* (α -staphylolysine). Elles possèdent un motif consensus carboxy-terminal de 11 acides aminés comprenant une cystéine conservée. Elles s'oligomérisent dans la membrane en des complexes de très haut poids moléculaire.

Les toxines RTX sont en revanche produites par de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cette famille de toxines possède pour représentant le mieux connu l' α -hémolysine d'*E. coli* et tire son nom de la présence dans leur séquence C-terminale, d'un nombre variable de glycine et répétitions riches en aspartate de neuf acides aminés qui pourraient contribuer à fixer la toxine à la membrane plasmique. Beaucoup de ces motifs RTX sont impliqués dans les interactions hôte-pathogène telles que la formation de pores, l'activité protéase, l'activité lipase et autres. La plupart des agents pathogènes à motifs RTX nécessitent du calcium pour effectuer leur activité. En l'absence de calcium, ces protéines existent sous forme intrinsèque.

Les leucotoxines porogènes sont constituées de deux composants protéiques différents qui s'assemblent pour former des pores. Quatre leucotoxines à deux composants ont été isolées chez des souches de *S. aureus* associées à des infections humaines: Panton-Valentine Leucocidine (PVL), gamm -Hémolysine (HlgA, HlgC, HlgB), leucotoxine ED (LukE, LukD) et Leucotoxine AB / GH (LukAB / LukGH). Ces toxines porogènes sont constituées de deux protéines différentes classés «S» et «F». Le composant S confère une spécificité de type cellulaire en se liant aux récepteurs cellulaires (Fig16). Le PVL est une cytotoxine qui affecte les leucocytes et provoque une nécrose tissulaire et a été associée aux furoncles, aux abcès cutanés et aux infections cutanées nécrotiques sévères et dans de graves pneumonies nécrosantes mortelles. Cette toxine est fortement associée aux souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) acquises dans la communauté (environ 85%).

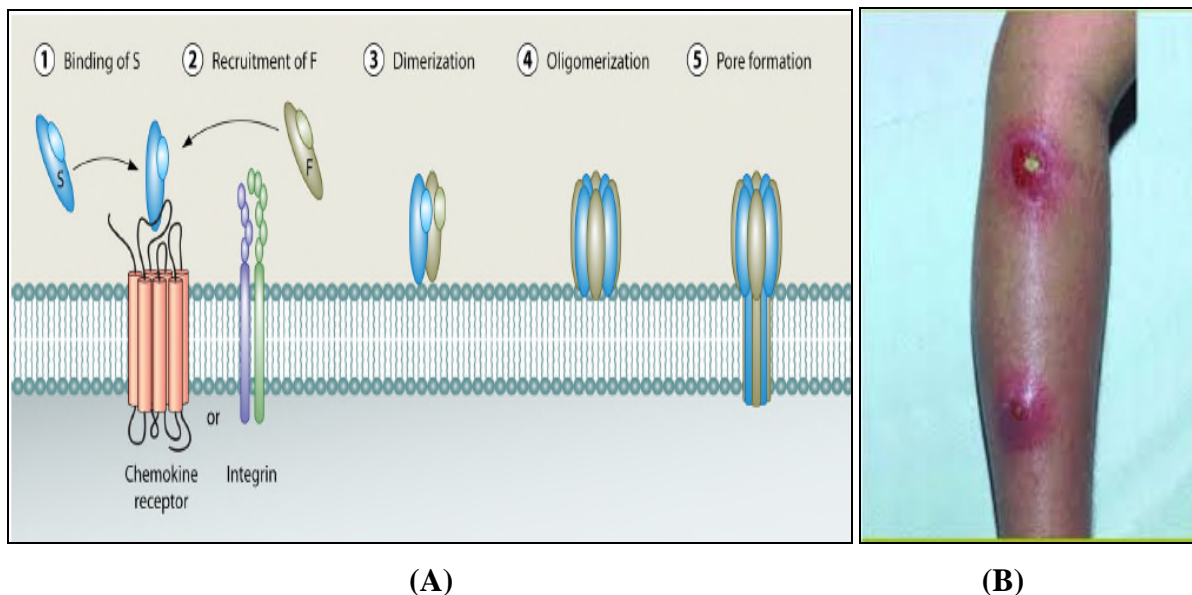


Figure 16. La leucocidine chez *S. aureus* (Alonzo et Torres, 2014)

A. Modèle de formation de pores de leucocidine (1) reconnaissance de la toxine des récepteurs cellulaires à la surface des cellules hôtes cibles. Sur la plupart des cellules hôtes, la sous-unité «S» reconnaît un récepteur protéinique (soit un récepteur de chimiokine [LukED et PVL] ou une intégrine [LukAB / HG]) pour faciliter la liaison de haute affinité à la surface cellulaire. (2) La sous-unité S reconnaît alors et recrute la sous-unité «F», (3) conduisant à une dimérisation à la surface de la cellule hôte. (4) La dimérisation est suivie de la formation d'oligomères. Les oligomères de toxine s'assemblent dans une structure pré-pore octamérique contenant des sous-unités S et F alternées. (5) Suite à l'oligomérisation, un changement structural majeur se produit dans les domaines de tige des sous-unités S et F, conduisant à l'insertion de la membrane et à la formation d'un pore qui enjambe la bicouche lipidique de la cellule hôte. **B. Deux lésions nodulaires très inflammatoires, ulcérées au centre et suppuratives**

Les effets des toxines qui forment des pores sont fonction de la taille des pores et de leur perméabilité sélective pour les ions ou les facteurs cytosoliques. Une activité importante de ces toxines pourrait être le déclenchement d'une réponse inflammatoire. L' α staphylolysine induit la formation de pores de très faible diamètre. Dans les monocytes, cette perméabilisation de la membrane active la caspase 1, ou ICE protéase, une protéine qui joue un rôle dans la maturation de l'interleukine- 1β et les phénomènes inflammatoires. Lorsqu'elle est produite par la bactérie invasive *L. monocytogenes*, la listériolysine permettrait à la bactérie de s'échapper de sa vacuole d'internalisation pour permettre sa réplication dans le cytoplasme. Outre son activité pour l'invasion bactérienne, la listériolysine s'est récemment révélée capable d'activer le facteur NF κ B et l'expression des molécules d'adhérence en surface de cellules endothéliales (Fig17).

De même, les toxines RTX possèdent de multiples effets sur les cellules. L' α -hémolysine produite par les souches d'*E. coli* uropathogènes provoque des oscillations de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , ces oscillations étant peut être impliquées dans l'induction de la production de cytokines proinflammatoires.

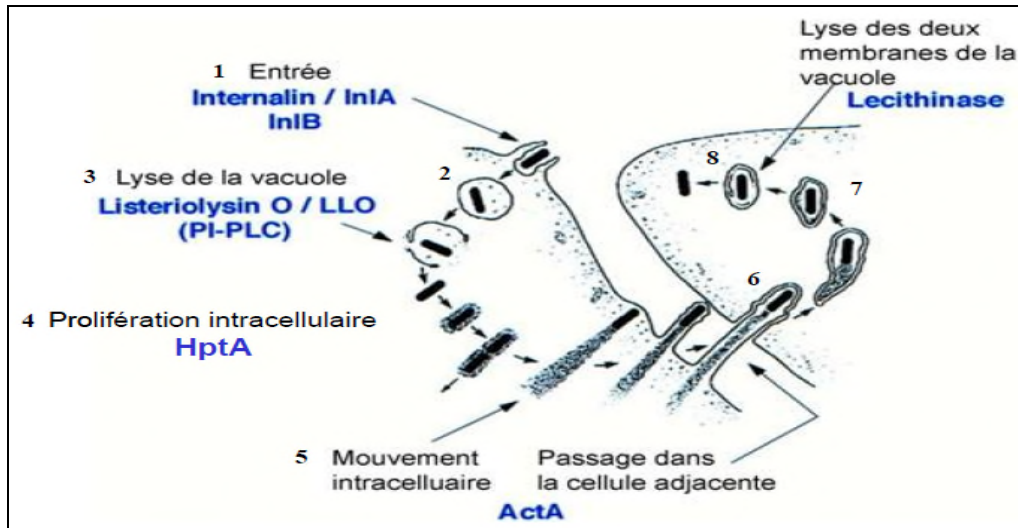


Figure 17. Cycle d'infection intracellulaire de *L. monocytogenes* productrice de la toxine LLO formant des pores sur la vacuole (Vazquez-Boland et al., 2001)

IV.3. 2. Toxines ciblant les composants du cytosquelette d'actine

Un grand nombre de toxines bactériennes puissantes, notamment celles produites par plusieurs *Clostridium spp.*, comme *C. difficile*, et certaines bactéries Gram-négatives pathogènes, telles que les souches uropathogènes d'*E. coli*, catalysent les modifications post-traductionnelles des composants de la cellule du cytosquelette d'actomyosine qui confère aux cellules hôtes leur forme et la dynamique des membranes. Cette fonction est obligatoire pour que les cellules contrôlent correctement leur adhésion au substrat matriciel, la monocouche intercellulaire et l'intégrité de la barrière, ainsi pour que les cellules immunitaires vont subir une migration et effectuer une phagocytose. Ce type de toxine permet donc la perturbation des barrières de l'épithélium de l'hôte, pour une dissémination bactérienne efficace, et pour empêcher à la fois la migration des cellules immunitaires vers le site de l'infection et d'avoir une action bactéricide.

Plusieurs toxines clostridiennes ont pour mode d'action la perturbation du cytosquelette d'actomyosine par réticulation directe d'ADP-ribose sur le résidu d'arginine-177 de l'actine. Les monomères d'actine ADP ribosylés sont extrêmement toxiques. Ils agissent de manière dominante une fois incorporés en filaments d'actine en bloquant l'addition de nouveaux monomères. Cela produit un démontage des filaments d'actine, entraînant une rétraction cellulaire et une destruction. La propriété de démonter l'actomyosine du cytosquelette est partagé par plusieurs toxines clostridiennes qui modifient les protéines Rho, groupe de régulateurs clés en amont de l'organisation du cytosquelette d'actomyosine et dynamique appartenant à la superfamille des petits GTPases Ras. Plusieurs toxines de glucosylation catalysent l'addition de glucose sur un résidu clé de thréonine de plusieurs petits GTPases.

Le téτανos et le botulisme sont des maladies paralysantes causées par des toxines produites par les bactéries *Clostridium tetanii* et *botulinum*. Dans les cellules eucaryotes, ces toxines possèdent un même mode d'action. Elles préviennent la transmission synaptique en bloquant la fusion des membranes des vésicules contenant le neuromédiateur avec la membrane plasmique (Fig18). Une différence notable existe toutefois entre téτανos et botulisme. Les différents sérotypes de toxine botulinique agissent sur les fibres nerveuses périphériques cholinergiques, et ils réalisent une « dénévation chimique » du muscle qui provoque une paralysie flasque. La toxine téτανique effectue, en revanche, un long trajet qui l'amène dans le système nerveux central (SNC). Ce trajet est effectué, après reconnaissance des terminaisons nerveuses périphériques, grâce à une série d'étapes de transcytose, c'est-à-dire de transport axonal rétrograde. La toxine téτανique (téτανospasmine) est une

métalloprotéase dont le fonctionnement dépend du Zn^{2+} , et qui est capable de cliver la synaptobrevine. Elle bloque finalement la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA (acide gamma aminobutyrique) et glycine par les interneurons médullaires. A l'opposé du tableau clinique réalisé par le botulisme, le tétanos est provoqué par l'activation simultanée des groupes musculaires possédant des effets antagonistes, et il en résulte une paralysie spastique (Fig19).

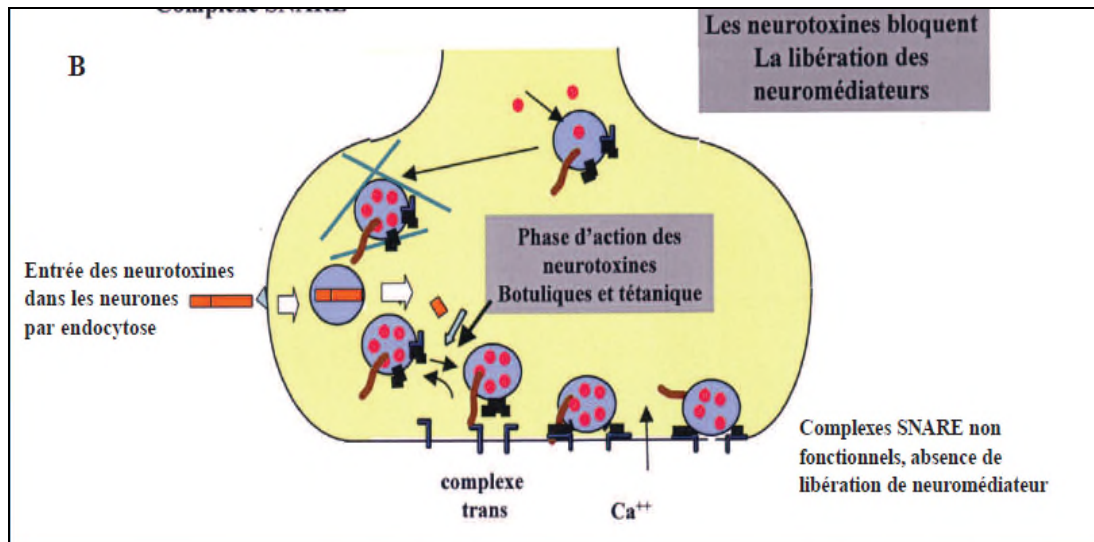


Figure 18. Mécanisme moléculaire du blocage de la neuroexocytose par les neurotoxines botuliques et tétanique (Popoff, 2004).

Les neurotoxines botuliques et tétanique clivent spécifiquement une des trois protéines du complexe SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) qui ont un rôle déterminant dans le processus de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique et donc dans la libération de neuromédiateur dans la fente synaptique (cartouche).



(A) Enfant atteint de spasmes musculaires en raison du tétanos (paralysie spastique)



(B) Séquelles de paralysie faciale paralyse flasque

Figure 19. Manifestations cliniques du tétanos (a) et du botulisme (B)

IV.3.3. Toxines ciblant l'ubiquitine et la signalisation de type ubiquitine

Un moyen efficace d'interférer avec la fonction des protéines est de catalyser leur protéolyse. Les études récentes indiquent que certaines toxines bactériennes aggravent la dégradation des protéines cellulaires par le système ubiquitine / protéasomal (UPS). Les modifications post-traductionnelles des protéines par l'ubiquitine et des molécules de type ubiquitine, comme SUMO ou NEDD8, contrôlent l'acheminement et l'activité d'un grand nombre de protéines et sont ciblées par de nombreux facteurs de virulence.

L'ubiquitylation est une réaction qui consiste en la fixation covalente de l'ubiquitine, un polypeptide de 8 kDa, aux résidus de lysine sur la protéine cible. Cela implique une cascade de réactions de transfert entre les protéines porteuses de l'ubiquitine. Parmi ces facteurs, les enzymes E3 ubiquitine ligase qui confèrent la spécificité à la réaction en se liant distinctement à un panel de protéines cibles. Des molécules supplémentaires d'ubiquitine peuvent ensuite être attachées à l'une des sept lysines de la molécule d'ubiquitine précédemment réticulée, conduisant à la formation de différents types d'assemblages de chaînes mono-, multi- ou polyubiquitines, notamment les chaînes polyubiquitine lysine-48 (K48) pour le ciblage du substrat permettant la destruction protéasomique. Plusieurs toxines, en catalysant l'activation permanente des protéines Rho exacerbent la régulation cellulaire médiée par le système ubiquitine / protéasomique de ces GTPases. Cela représente un exemple remarquable de la façon dont les toxines peuvent être utiles pour démêler de nouvelles régulations cellulaires et déterminer dans ce cas les E3 ubiquitine ligase qui sont responsables de l'ubiquitylation de la protéine Rho.

La petite GTPase Rac1 contrôle des processus cellulaires essentiels, au nombre desquels la migration, la phagocytose, le cycle et l'apoptose. La dérégulation de l'activité de Rac1 est impliquée dans des pathologies humaines graves comme certains déficits immunitaires, cancers et maladies mentales. Rac1 est aussi la cible de nombreux facteurs de virulence bactériens. Des études récentes ont permis de découvrir un nouveau mode de régulation des protéines Rho, notamment Rac1, par ubiquitylation et dégradation protéasomique, et d'identifier certains des acteurs de cette régulation cellulaire, avec la découverte de l'activité E3 ubiquitine ligase de HACE1 (*HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase 1*) vis-à-vis de Rac1. Cette découverte repose sur l'étude de la toxine bactérienne CNF1 (facteur cytotoxique nécrosant-1), produite par des souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC), agents responsables de cystites, de pyélonéphrites, et fréquemment de bactériémies. CNF1 se fixe sur un récepteur à la surface des cellules pour

pénétrer dans les compartiments intracellulaires à partir desquels elle transfère son domaine enzymatique dans le cytoplasme. Elle y catalyse la déamidation des GTPases Rho, dont Rac1. La déamidation spécifique d'une glutamine de Rac1 - en position 61 - en acide glutamique, confère à cette GTPase une activation constitutive et des propriétés classiques de mutant dominant positif. Cette modification de Rac1 par CNF1 facilite l'invasion des cellules de l'hôte par les bactéries. L'internalisation des UPEC dans les cellules épithéliales pourrait, ainsi, leur offrir une niche protectrice contre l'attaque par des cellules effectrices de la réponse immunitaire. De plus, l'étude de CNF1 a permis d'établir que les formes ainsi activées de Rac1 et des GTPases Rho subissent un processus d'ubiquitinylation entraînant leur adressage au protéasome et leur dégradation (Fig 20).

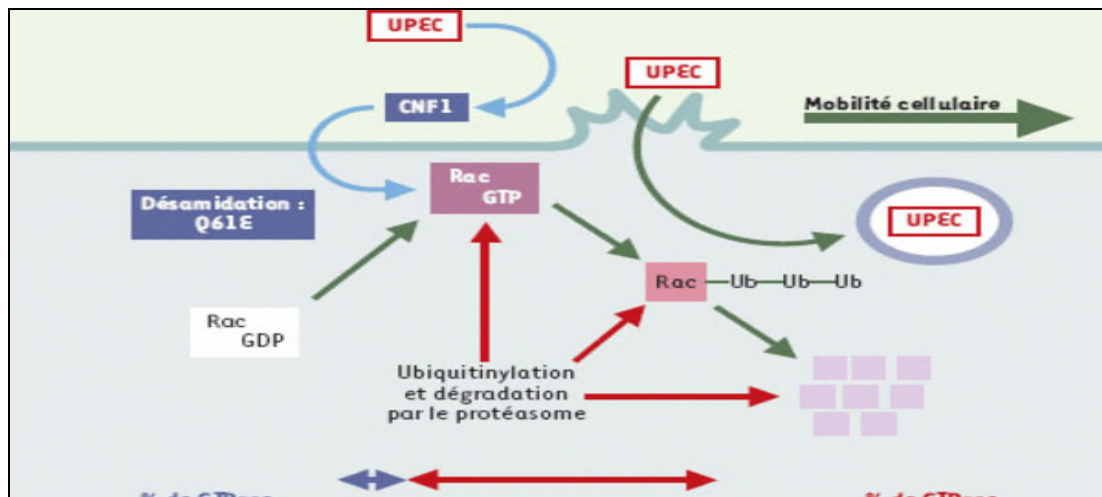


Figure 20. Représentation schématique du mécanisme d'intoxication des cellules épithéliales par la toxine CNF1 des *E. coli* uropathogènes (UPEC) (Landraud et al., 2003)

L'étude de CNF1 (cytotoxic necrotizing factor) a permis de mettre en évidence l'existence d'un système de vigilance cellulaire capable de produire l'ubiquitinylation et la dégradation par le protéasome des protéines Rho en réponse à leur activation soutenue. L'activation transitoire des protéines GTPasiques Rho (Rho, Rac et CDC42) due à leur rapide ubiquitinylation et à leur dégradation par le protéasome produite en réponse à la toxine est représentée sur le graphique. La résultante de l'activation-dégradation des protéines Rho produit leur activation modérée et confère aux cellules hôtes des capacités de migration et de phagocytose.

De plus, certaines toxines ciblent des molécules de type ubiquitine-like. Par exemple, la listeriolysin O agit sur les cellules hôtes distantes pour stimuler la dégradation d'Ubc9, une enzyme clé dans la modification des protéines par SUMOylation. Bien que les toxines bactériennes n'interfèrent qu'indirectement avec la régulation du système ubiquitine/protéasomique des protéines des cellules hôtes, plusieurs effecteurs bactériens catalysent une modifications post-traductionnelles directe d'ubiquitine et de molécules ubiquitine-like. En

effet, les effecteurs Cif de *E. coli* entéropathogène sécrétés par le système de sécrétion de type III désamorcent la protéine ubiquitine-like NEDD8.

IV.3.4. Toxines affectant les messagers secondaires et les composants de signalisation

L'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) est un médiateur crucial de la signalisation cellulaire et est donc impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires biologiques et physiologiques des protéines telles que la protéine kinase A et le facteur d'échange Rap1 EPAC. La production d'AMPc conduit à une reprogrammation de la transcription des macrophages vers un programme génétique avec des similitudes étroites aux récepteurs couplés aux protéines G anti-inflammatoires, pour l'induction de la résolution de l'inflammation, un phénomène nécessitant une signalisation cellulaire active. Les toxines induisant le flux d'AMPc (notamment la toxine cholérique) sont utilisées pour manipuler les réponses immunitaires, une caractéristique qui est également à l'étude pour les toxines Rho-activatrices, pour développer des immunoadjuvants puissants pour la vaccination.

Plusieurs bactéries pathogènes ont développé des toxines qui affectent le flux cellulaire de l'AMPc, comme c'est le cas du groupe de toxines ciblant les protéines G hétérotrimériques, telles que la toxine cholérique de *V. cholerae* et de la toxine de la coqueluche produite par *B. pertussis* (Fig21). Ceci concerne également la toxine oedématogène de *B. anthracis*. La toxine de l'anthrax est une toxine de type A-B, composée de trois parties: le domaine de liaison médié par le récepteur, l'antigène protecteur (PA) et deux domaines enzymatiques: le facteur létal (FL) et le facteur oedématogène (EF). Le PA joue un rôle important dans la formation des pores sur membrane endosomale déclenchée par un pH bas et par des changements conformationnels. Le EF est une adénylate cyclase dépendante du calcium et de la calmoduline, convertissant l'ATP en AMPc, entraînant une élévation du taux d'AMPc intracellulaire et conduisant à un œdème sous-cutané (anthrax). Le LF est une métalloprotéase dépendante du zinc, ciblant les protéines kinases MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinases), et aboutissant à l'apoptose (Fig 22).

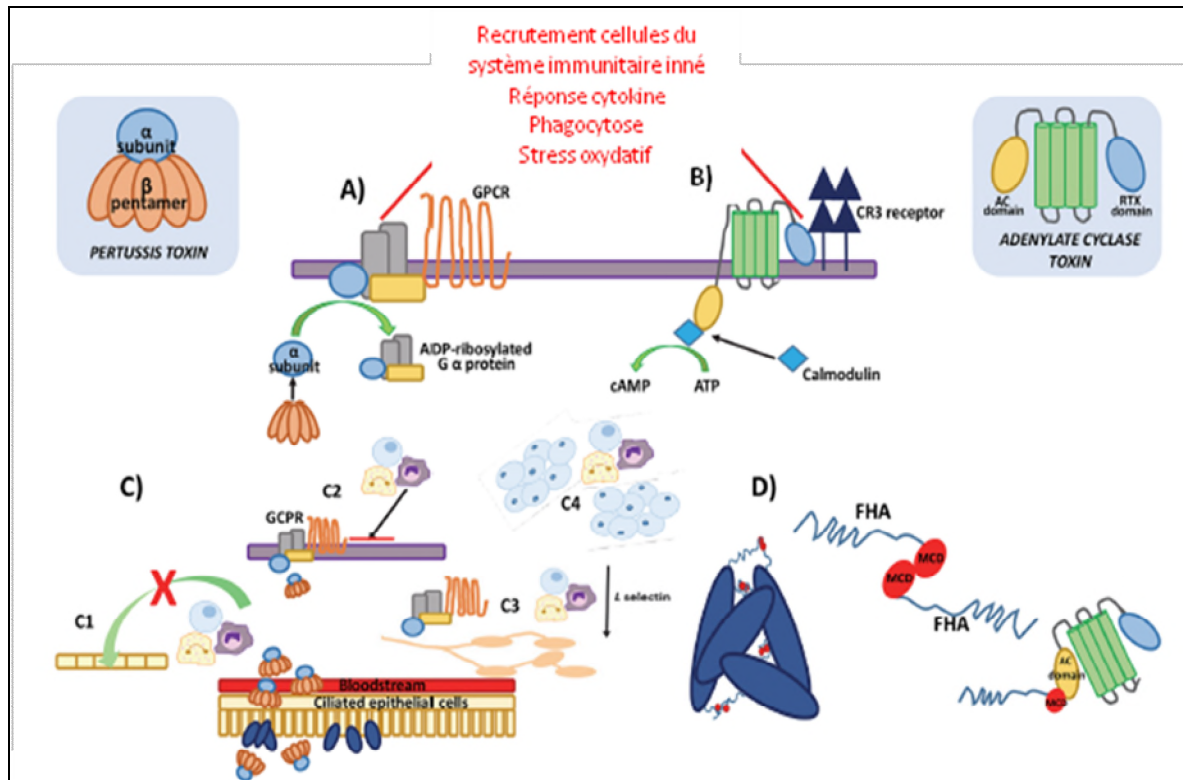


Fig21. Contribution de la toxine pertussique (PT) et de la toxine adénylate cyclase (ACT) à la pathogénicité de *Bordetella pertussis* (Rudkin et al., 2017)

B. pertussis, l'agent causal de la coqueluche (communément appelée coqueluche), produit 2 toxines bien caractérisées, la toxine pertussis (PT) et la toxine adénylate cyclase (ACT). ACT a une activité cyclase directe, tandis que PT est une adénosine diphosphate (ADP) -ribosyltransférase qui modifie la sous-unité alpha de la liaison nucléotidique de la guanine hétérotrimérique (G) protéines des cellules hôtes. Une conséquence de la signalisation aberrante qui en résulte l'activation incontrôlée de la cellule hôte. Ainsi, ces deux toxines peuvent causer des niveaux élevés d'AMPc dans les cellules hôtes. **(A)** PT est endocytosé dans une cellule et, après traitement intracellulaire par le réticulum endoplasmique, la sous-unité alpha est libérée dans le cytosol. **(B)** ACT interagit avec la surface cellulaire récepteur du complément (CR3) sur les macrophages et les neutrophiles, affectant la présentation de l'antigène et le recrutement du système immunitaire adaptatif en aval réponse. **(C)** PT relâché dans le II a été démontré que la circulation sanguine des cellules se développant sur des cellules pulmonaires épithéliales ciliées contribue au développement de la leucocytose. **(D)** ACT inhibe la formation de biofilm en interférant avec Interactions entre l'hémagglutinine filamenteuse et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA-FHA) entre les cellules.

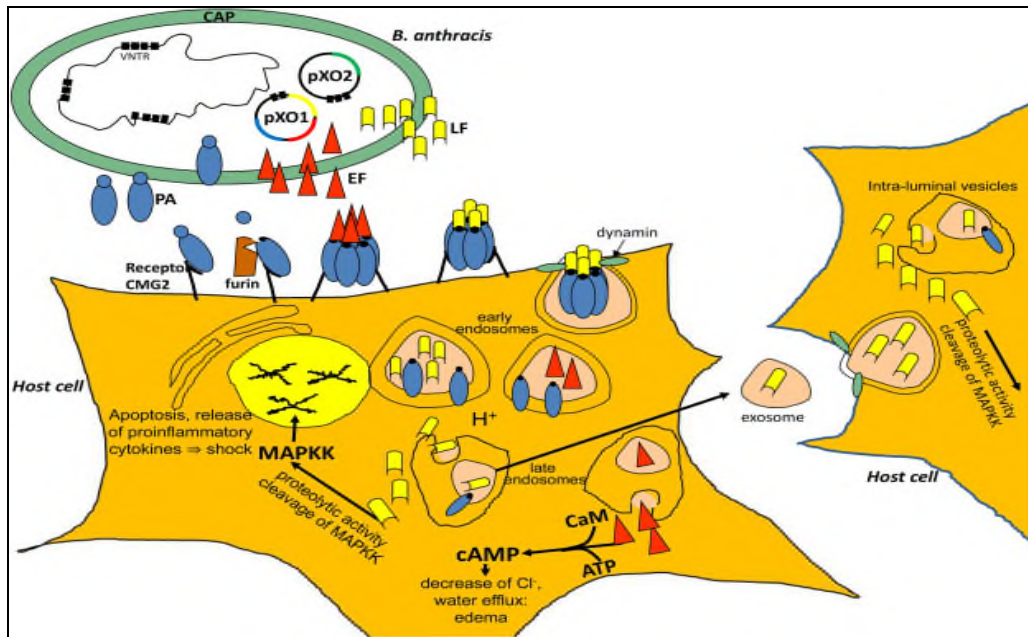


Figure 22. Mécanismes moléculaires de la virulence de *B. anthracis* (Pilo et Frey, 2018)

CAP, capsule; PA, antigène protecteur; EF, facteur œdémogène; LF, facteur létal; VNTR, répétition en tandem à nombre variable; MAPKK protéine kinase kinase activée par un mitogène; CaM, calmoduline; AMPc, adénosine cyclique 3'5'monophosphate; CMG2, gène 2 de la morphogenèse capillaire

IV.3.5. Toxines ciblant les mécanismes de traduction cellulaire

Un moyen efficace de tuer les cellules hôtes consiste à l'inhibition de la synthèse des protéines. Plusieurs bactéries pathogènes partagent la capacité d'inhiber la traduction des protéines par modification post-traductionnelle des facteurs de traduction, comme, par exemple, le facteur d'élongation-2 (EF2), qui est ADP-ribosylé par la toxine diphtérique de *C. diphtheriae* et l'exotoxine A de *P. aeruginosa*. La cible de ces deux toxines un résidu d'histidine modifié par modification post-traductionnelle des facteurs EF2 appelé diphthamide, qui n'est présent que chez les eucaryotes et les archées.

Le groupe de toxines Stx et Shiga-like N-glycosidase de *S. dysenteriae* et les souches d'*E. coli* entérohémorragiques suppriment une adénine de l'ARN ribosomal 28S. Les toxines stx jouent un rôle clé dans l'induction du syndrome de l'urémie hémolytique et à des doses sublétales induisent des réactions inflammatoires. Une propriété remarquable de ces toxines est leur capacité à pénétrer dans les cellules en déclenchant une déformation de la membrane à forte concentration et subir un transport rétrograde vers le réticulum endoplasmique, où le domaine catalytique sort du cytosol en détournant la machinerie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (Fig23).

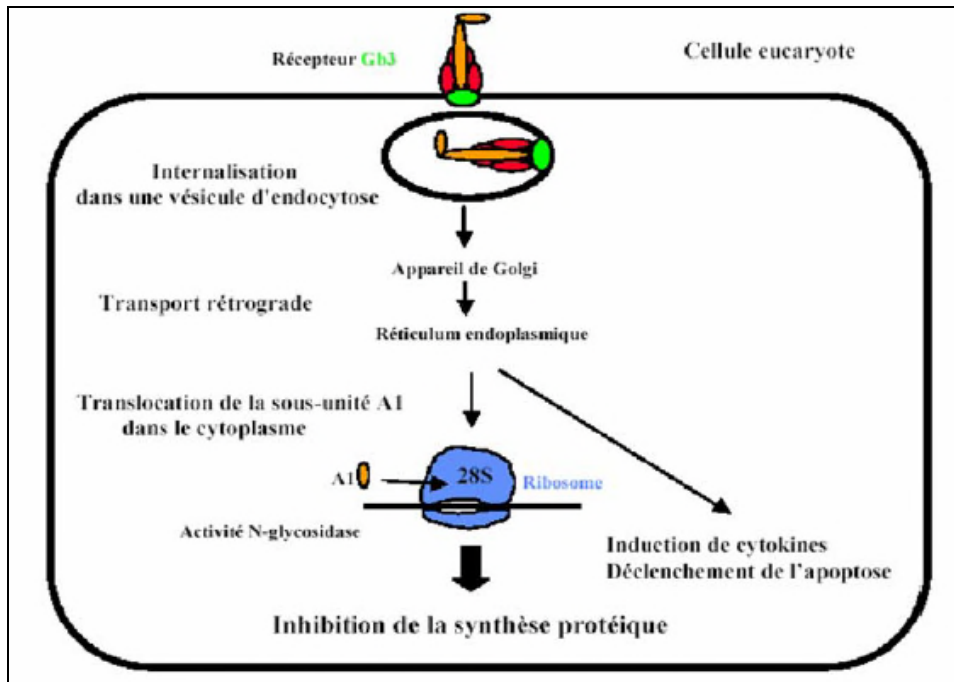


Figure 23. Mécanismes d'action des Shiga-toxines STEC (*E. coli* producteur de Shiga-toxine) (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012)

IV.3.6. Toxines ciblant l'ADN et induisant un stress endoplasmique du réticulum.

En plus de jouer des rôles clés pendant l'infection, dans certains cas, les toxines bactériennes peuvent représenter des facteurs de risque de cancer. Par exemple, l'activité génotoxique des toxines cytolétales distendantes (CDT) produites par *Haemophilus ducreyi* CDT, un groupe de toxines produites par un grand nombre de bactérie pathogène à Gram négatif, représente probablement un facteur de risque pour la cancérogenèse.

Ces CDT sont composés de trois sous-unités (CdtA, CdtB et CdtC). Le catalyseur de la sous-unité CdtB partage les résidus d'acides aminés conservés avec le site actif de la désoxyribonucléase de mammifère (DNase) I aux résidus qui contribuent au clivage des la liaison phosphodiester de l'ADN et à l'intérieur d'un motif pentapeptide. Par conséquent, CdtB d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* porte une activité enzymatique phosphatidylinositol 3,4,5- triphosphate et 5-phosphatase. Les conséquences de ces des deux activités biochimiques produite par CdtB sur les dommages de l'ADN peuvent varier selon les types de cellules entre l'arrêt du cycle cellulaire (en phase G2 de la mitose) ou la mort cellulaire.

IV.3. 7. Les superantigènes

Les superantigènes (SAGs) sont un groupe de toxines protéiques sécrétées produites par certaines bactéries pathogènes, y compris *S. aureus*, *Streptococcus sp.*, *Mycoplasma arithidite* et *Yersinia pseudotuberculosis*. Ces toxines déclenchent dans le système immunitaire une cascade complexe de réactions qui risquent d'aboutir au choc toxique. Elles stimulent *in vitro* et *in vivo* la prolifération épithéliale et la différenciation d'une très large proportion des cellules T (10-30%), contrairement aux antigènes conventionnels qui stimulent moins de 0,01 à 0,0001% des lymphocytes. Ces molécules, efficaces à des concentrations extrêmement faibles (10^{-9} M), font partie des mitogènes les plus puissants des cellules T.

Les mécanismes de leur toxicité impliquent:

- 1) une prolifération lymphocytaire accompagnée de la synthèse de lymphokines (interleukines- 1 et - 2 , cachectines),
- 2) le relargage de leucotriènes produites par les cellules mastocytaires.

Paradoxalement, cette stimulation massive mais incontrôlée du système immunitaire entraînerait une immunosuppression dont la bactérie tire avantage.

Les SAGs se lient au complexe majeur d' histocompatibilité II (CMH II) et stimulent l'interaction peptide-indépendante CMH II / récepteur des cellules T (TCR) et l'activation immunitaire. Un deuxième groupe de SAGs sont les toxines de type superantigène SSL, qui possèdent une grande partie de la structure de domaine conservée des SAGs, mais ne se lient pas au CMH II ou n'activent pas les cellules T, mais ciblent le système immunitaire inné⁴⁶. SAGs et SSLs contiennent deux structures conservées aux domaines N-terminal (contenant le domaine de liaison au récepteur TCR) et C-terminal. Le domaine N-terminal contient un pli oligonucléotide-OB conservé, tandis que le domaine C-terminal contient un feuillet β . Le pli OB et le feuillet β sont étroitement enroulés, ce qui contribue à la stabilité des protéines lors du chauffage, une propriété des SAGs.

L'affinité des SAGs pour le CMH II est de 10 à 100 fois supérieure à celle des protéines TCR. Cette interaction est suffisante pour activer jusqu'à 20% des cellules T. La plupart des SAG, Cependant, ont une spécificité accrue au TCR qui est défini par des interactions spécifiques avec les zones hyper-variables des TCR (Fig24).

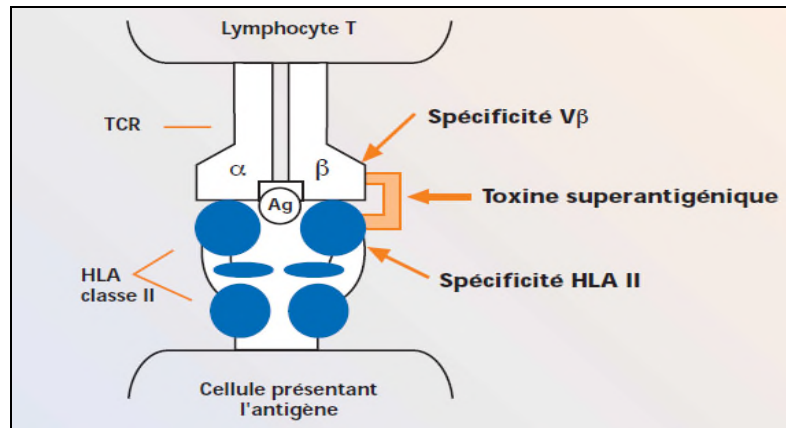


Figure 24. Modèle d'interaction des superantigènes avec l'antigène HLA de classe II et avec la chaîne V β du récepteur du lymphocyte T (Genestier et Lina, 2001).

Une autre action des SAg est de bloquer directement l'interaction du TCR avec le peptide, gardant les dimères TCR et CMH II physiquement séparés là où les SAg se coincent entre les deux récepteurs (classe II), ne permettant qu'un contact minimal (chaîne α du TCR et chaîne β du CMH II), bloquer physiquement l'interaction peptidique (classe I) ou se lier pour provoquer un angle entre TCR et CMH II / interface peptidique (classe V).

Il y a plus de 23 toxines SAg staphylococciques décrites, en particulier la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) (classe I) et les entérotoxines staphylococciques (SEA à SEE, SEG à SEJ, SEL à SEQ et SER à SET) et 11 toxines staphylococciques de type superantigène (SSL) (SEIK à SEIQ, SEIU à SEIX). Les SAg libérés agissent de manière systémique, déclenchant un grand nombre de lymphocytes T pour produire des quantités massives de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ et TNF), provoquant ainsi la manifestation de symptômes (par exemple, forte fièvre, éruption cutanée, desquamation, vomissements, diarrhée, hypotension, et peut fréquemment entraîner défaillance d'organes multiples). Après cette tempête de cytokines, un manque de réponse des lymphocytes T où les lymphocytes T ne parviennent pas à proliférer ou à sécréter IL-2 est suivi, ou ils peuvent subir la mort cellulaire. Ceci suggère que les SAg sont des immunogènes puissants, provoquant et neutralisant la réponse des anticorps.

V. Echappement au système immunitaire

Les bactéries peuvent utiliser plusieurs stratégies de survie pour échapper aux systèmes de défense de l'hôte certaines déjà mentionnées auparavant (ex. biofilm). Ces stratégies apparemment redondantes de l'attaque bactérienne assure la déficience précoce en plusieurs étapes des réponses immunitaires de l'hôte montées contre le pathogène et garantissant le contrôle de l'interaction hôte-pathogène offrant une fenêtre de temps et d'opportunité pour la croissance bactérienne et la colonisation au sein de l'hôte.

V.1. Stratégies pour échapper à l'action des neutrophiles

V.1.1. Inhibition du recrutement des neutrophiles

Un certain nombre d'agents pathogènes bactériens produisent des molécules qui ont la capacité d'amortir le recrutement des neutrophiles. Certaines de ces molécules ciblent les chimioattractants tels que les interleukines (IL)-8, IL-1 α , et IL- β , CXCL1 (GRO α), CXCL2 (MIP2 α), CXCL5 (ENA78) et le facteur TNF.

S. pyogenes produit des peptidases sécrétées appelées ScpA et ScpC / SpyCEP qui dégradent respectivement C5a et IL-8, et l'estérase Sse sécrétée par le streptocoque, qui inactive le facteur d'activation des plaquettes. Chez *S. aureus*, l'activation et la chimiotaxie des neutrophiles peuvent être inhibées par les protéine inhibitrices du chimiotactisme (CHIPS), qui se lie au récepteur C5a et au récepteur du formyl peptide (FPR), bloquant ainsi l'interaction du ligand.

V.1.2. Inhibition de la phagocytose

L'une des stratégies les plus courantes pour les bactéries pathogènes pour masquer les antigènes de surface est la production d'une capsule polysaccharidique enveloppante.

V.1.2.1. La capsule

Elle offre aux bactéries une protection contre la réponse immunitaire de l'hôte ainsi que les antibiotiques. Il a également été démontré que certaines capsules ont des effets immunomodulateurs. Bien que ces capsules ont une composition chimique et des effets immunomodulateurs différents, elles servent à protéger les bactéries de la réponse inflammatoire de l'hôte (c'est-à-dire activation du complément et destruction médiée par les phagocytes) ainsi que la production de toxines ciblant la fonction des cellules immunitaires

innées en modulant les voies centrales de la cellule de l'hôte (par exemple, réponse inflammatoire, dynamique du cytosquelette et signalisation de l'AMPc).

Cette «phagocytose frustrée» conduit à une inflammation accrue induisant les macrophages et les neutrophiles à produire plus de cytokines inflammatoires afin de tenter d'éliminer les bactéries. Cette réponse inflammatoire entraîne une augmentation des dommages des tissus car plus de neutrophiles et de macrophages sont recrutés sur le site de l'infection.

Il y a de nombreux exemples de bactéries encapsulées qui ont été décrits comme inhibant la phagocytose des neutrophiles, y compris:

- Les pneumocoques (*S. pneumoniae*) possèdent un polysaccharide capsulaire identifié comme l'un de ses principaux facteurs de virulence. Ils utilisent 24 gènes biosynthétiques pour produire leurs capsules. Il y a au moins 90 types capsulaires différents, bien qu'un seul sous-ensemble de 23 types provoquent plus de 90% des maladies invasives dans le monde.

- Les méningocoques (*N. meningitidis*) possèdent des polysaccharides capsulaires dont les différences de structure chimique permettent de déterminer les sérogroupes. La capsule des sérogroupes B, C, Y et W-135 est composée entièrement d'acide polysialique ou d'acide sialique lié à du glucose ou du galactose, tandis que la capsule du séro groupe A est composée du N-acétyl mannosamine-1-phosphate.

- La capsule chez *P. aeruginosa* est composée d'alginate (mannuronique acétylé et acide guluronique). Les enzymes contribuant à la synthèse de l'alginate ont été élucidées et on en sait beaucoup sur la régulation génétique de la surproduction d'alginate. L'unique caractéristique de la capsule *P. aeruginosa* est que toutes les souches ont la capacité génétique de produire de l'alginate mais on le trouve le plus souvent dans les isolats de patients atteints de mucoviscidose. De plus, les souches encapsulées provoquant une bactériémie sont moins sensibles à la destruction par le sérum humain frais contenant des composants du complément et sont par conséquent appelés résistants au sérum.

- Les souches de *K. pneumoniae* HV produisent une hypercapsule qui consiste en un revêtement bactérien d'exopolysaccharidiques mucoviscqueux qui est plus robuste que celle de la capsule typique. Toutes deux constituées de polysaccharides capsulaires spécifiques à la souche appelés antigènes K (c.-à-d. K1 et K2, jusqu'à K78) et codées par des gènes situés sur

un opéron chromosomique, *cps*, où les séquences des gènes sont conservées. Cette hypercapsule peut contribuer de manière significative à la pathogénicité de *K. pneumoniae* HV (Fig25).

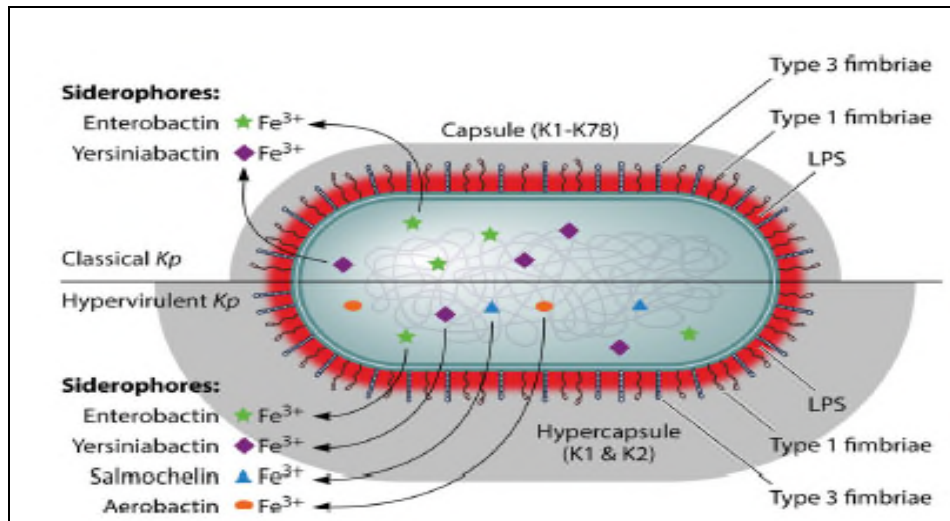


Figure 25. Quatre facteurs de virulence bien caractérisés chez les patients classiques et hypervirulents des souches de *K. pneumoniae* (Kp) (Paczosa et Mecsas, 2016)

V.1.2.2. Echappement au système du complément

V.1.2.2.1. Imitation des protéines régulatrices du complément

La seule bactérie connue à utiliser ce mécanisme est *Borrelia Burgdorferi*. l'agent responsable de la maladie de Lyme qui est l'une des principales infections émergentes transmises par les arthropodes dans le monde. *B. burgdorferi* exprime sur sa membrane une protéine "CD59-like" qui se lie à C8b et C9 en complexe et inhibent la formation de MAC (complexe d'attaque membranaire). Avec un poids moléculaire de 80 kDa, cette protéine est beaucoup plus grande que le CD59 humain, mais il existe quelques similitudes structurales puisque l'anticorps polyclonal anti-CD59 est capable de reconnaître le type CD59.

V.1.2.2.2. Inactivation des protéines du complément par dégradation enzymatique (sécrétion des protéases)

Les protéases dérivées de pathogènes ciblent un large éventail de substrats, y compris la molécule C3 du complément central, les protéines impliquées dans l'initiation en cascade, telles que C1q et les immunoglobulines, ainsi que les composants terminaux, tels que C5. *P. aerogenosa* sécrète deux protéases puissantes, l'élastase (PaE) et une protéase alcaline

(AprA), qui dégradent les composants du système du complément humain, essentiellement le C3 et le C1q. le ciblage de C3 en tant que molécule centrale du complément entraîne une altération fonctionnelle des trois voies d'activation du complément, interférant en fin de compte avec la formation de MAC et facilitant la survie des bactéries. AprA interfère également avec l'opsonisation des bactéries avec C3b, bloquant essentiellement la phagocytose et la destruction de *P. aeruginosa* par les neutrophiles humains, et peut réduire la formation de C5a. Ce dernier est accompli par un clivage efficace de C2 par AprA, ce qui contourne les voies classiques et les voies de la lectine sans affecter la voie alternative.

V.1.2.2.3. Blocage de C4b

S. aureus a une palette de mécanismes d'évasion dont l'un est de réduire l'activité des voies classique et de lectine du complément en utilisant une protéine appelée protéine d'adhérence extracellulaire (Eap). Eap lie C4b et bloque l'assemblage de la C3 convertase C4b2a.

V.1.3. Inhibition de l'activité bactéricide

Les neutrophiles utilisent des produits dépendants de l'oxygène (ROS ou espèces réactives de l'oxygène) et indépendants de l'oxygène (AMP ou peptides antimicrobiens) comme processus pour tuer les micro-organismes ingérés.

- Plusieurs bactéries pathogènes sont capables de produire de nombreux enzymes antioxydants pour détoxifier les ROS et réduire les dommages causés par le stress oxydatif. Par exemple, les superoxydes dismutases telles que SodA et SodM produits par *S. aureus* sont des enzymes qui catalysent la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène peut être davantage décomposé en eau et en oxygène par les catalases (par exemple, *S. aureus* KatA et *E.coli* KatE et KatG).
- Les cellules de l'hôte produisent des AMP cationiques qui présentent un plus haut degré d'attraction pour les cellule bactérienne chargées plus négativement que ceux de l'hôte eucaryote. L'un des mécanismes de résistance à l'AMP les plus couramment employés se fait par l'altération de la charge de surface avec des molécules cationiques, favorisant ainsi la répulsion électrostatique. Les bactéries Gram-négatives

généralement modifient la charge de surface en remodelant le lipide A et l'ajout de phosphatidyléthanolamine et de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose. Les bactéries à Gram positif modifient souvent les acides teichoïques de la paroi cellulaire par D-alanylation pour réduire la charge de surface négative et améliorer la répulsion électrostatique et la résistance à l'AMP. Les bactéries peuvent également réduire les effets délétères des AMP par l'utilisation de pompes à efflux (Fig 26).

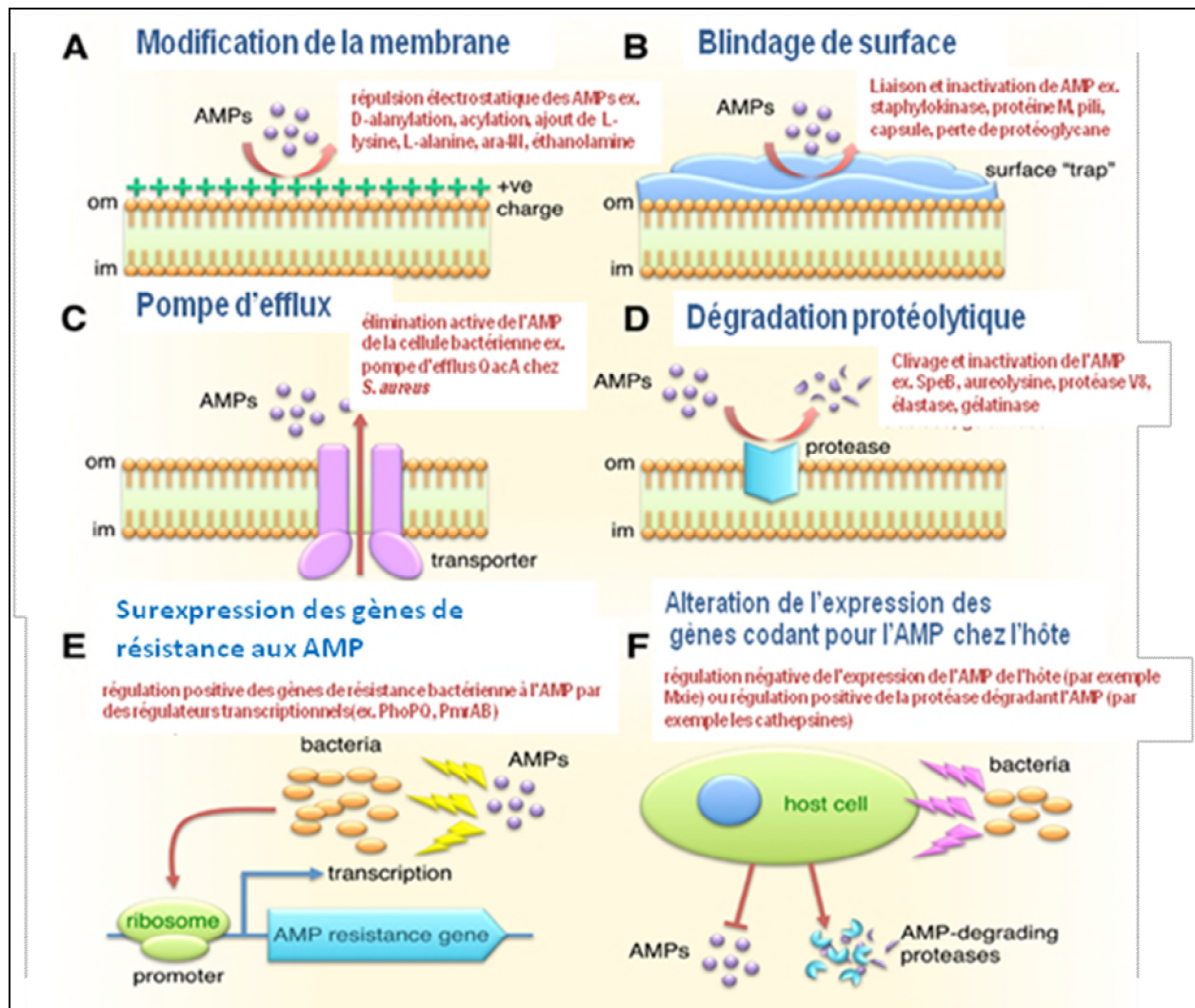


Figure 26. Représentation schématique des multiples mécanismes de résistance développés par les bactéries pour surmonter les peptides antimicrobiens de l'hôte (Cole et Nizet, 2016)

V.1.4. Activation/Inhibition de l'apoptose

Lors d'une infection bactérienne, l'ingestion de pathogènes par les neutrophiles incite les cellules à subir l'apoptose dans un processus appelée «mort cellulaire induite par phagocytose» (PICD). La PICD dépend fortement de ROS, de Mac-1 (CD11b /CD18) et de la signalisation du récepteur Fcy. La mort cellulaire programmée non lytique est très avantageuse pour l'hôte, car il permet l'élimination en toute sécurité des neutrophiles effacés contenant les bactéries tuées et favorise la résolution de l'infection.

Les agents pathogènes bactériens à multiplication extracellulaire induisent l'apoptose des neutrophiles après phagocytose. En effet, certains agents pathogènes bactériens ont développé des moyens d'exploiter la PICD à leur avantage. Par exemple, *P. aeruginosa* sécrète la phénazine exotoxine et la pyocyanine, qui accélèrent rapidement l'apoptose des neutrophiles. L'apoptose prématurée des neutrophiles interfère avec la capacité du système immunitaire pour éliminer les bactéries envahissantes.

V.2. Multiplication intracellulaire

Comme décrit précédemment, plusieurs bactéries virulentes fondent leur caractéristiques pathogènes dans un mode de vie intracellulaire pendant l'infection. L'internalisation peut être nécessaire pour l'induction des cytokines inflammatoires et produisent des lésions tissulaires par l'induction de réponses nécrotiques ou apoptotiques. Les agents pathogènes intracellulaires qui sont tropiques pour les neutrophiles peuvent agir en bloquant au niveau des mitochondries de la cellule hôte le relargage de cytochrome c, un signal cellulaire d'apoptose, ou en modulant l'expression de gènes d'apoptose et/ou de survie cellulaire. Ces mécanismes ont été décrits chez les bactéries intracellulaires pathogènes telles que les *Salmonella*. Dans certains exemples bien caractérisés, les bactéries peuvent se déplacer d'une cellule à l'autre sans contact avec le milieu extracellulaire, évitant ainsi le système immunitaire (Tableau V).

V.2.1. Inhibition de la maturation du phagosome

Le phagosome est un compartiment cellulaire dans lequel les micro-organismes pathogènes peuvent être tués et digérés. Les phagosomes fusionnent avec les lysosomes dans leur processus de maturation, formant des phagolysosomes. Certains agents pathogènes bactériens intracellulaires résident à l'intérieur des phagosomes et se divisent ou se

développent à l'intérieur du phagolysosome formé ou s'échappent dans le cytoplasme avant que le phagosome fusionne avec le lysosome. De nombreuses mycobactéries manipule le macrophage hôte pour empêcher les acides nitreux des lysosomes de fusionner avec les phagosomes et de créer des phagolysosomes. Par conséquent, l'un des principaux mécanismes suscités par des mycobactéries intracellulaires pour survivre et se répliquer à l'intérieur des cellules hôtes doivent arrêter le processus normal de maturation des phagosomes, qui permet la survie bactérienne dans un compartiment intracellulaire non acidifié.

L'intervention des protéines Rab permettent d'éviter la fusion du phagosome tardif avec le lysosome, et ainsi maintenir les mycobactéries dans un phagosome précoce. La fusion des phagosomes avec les lysosomes peut aussi être inhibée par *M. tuberculosis* en retenant la protéine TACO (tryptophan aspartate rich coated protein, également appelée coronin-1) à l'intérieur du phagosome. Enfin, la protéine kinase G (PknG) empêche la fusion phagosome-lysosome via un mécanisme encore non établi (Fig 27).

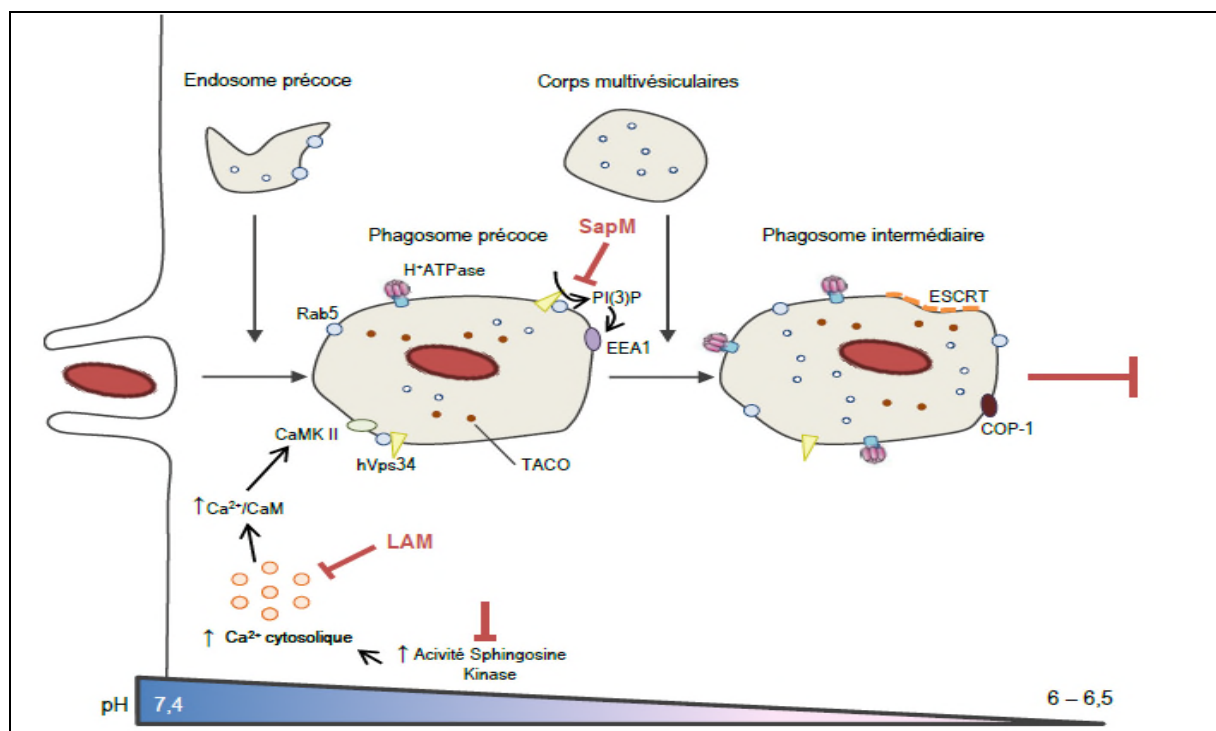


Figure 27. Mécanismes antimicrobiens développés par *M. tuberculosis* au sein du phagosome (Forrellad et al., 2013)

V.2.2. Evasion du phagosome

Certains pathogènes qui utilisent la phagocytose pour accéder à l'espace intracellulaire des cellules hôtes sont capables d'échapper au phagosome après phagocytose afin de se multiplier dans le cytoplasme des cellules immunitaires de l'hôte. Ainsi, *L. monocytogenes* sécrète une cytolysine, la listeriolysine, ainsi que deux 52 phospholipases capables de lyser la membrane du phagosome. Les bactéries du genre *Shigella* sont également des pathogènes intracellulaires capables d'échapper au phagosome grâce aux systèmes de sécrétion de type III qui induisent la lyse des vacuoles acides observable grâce au recrutement d'une galectine 3 servant de marqueur. En effet, la galectine 3 est recrutée au niveau de la membrane des vacuoles immédiatement après leur lyse. La galectine 3 est une protéine de la famille des lectines, abondante dans les macrophages et les cellules épithéliales et ayant de nombreuses fonctions. Cependant, son rôle dans le mécanisme d'évasion des vacuoles de lyse par les pathogènes intracellulaires n'est pas encore élucidé.

Tableau V. Stratégies d'échappement au système immunitaire des bactéries intracellulaires (Mitchell et al., 2016)

Défi	Stratégies utilisées par les bactéries intracellulaires	
	Intravacuolaire	Cytosolique
Voie phagolysosomale	Évitement, blocage et adaptation	Évasion dans le cytosol
Accès aux nutriments	Détourner le trafic de vésicules hôtes pour promouvoir la biogenèse des vacuoles et l'acquisition de nutriments	Accès direct aux nutriments cytosoliques
Microenvironnement	Les bactéries intravacuolaires créent et agrandissent leur espace de réplication à l'aide de divers effecteurs	Le cytosol constitue un environnement spacieux et favorable
Reconnaissance innée	Le compartiment vacuolaire fournit une cachette de la détection innée cytosolique	Les bactéries cytosoliques sont directement exposées à la machinerie de détection cytosolique et doivent diminuer l'expression de PAMP pour retarder la reconnaissance
Autophagie	Maintien de l'intégrité de la vacuole Inhibition de l'initiation de l'autophagie Inhibition du flux d'autophagie	Inhibition de l'initiation de l'autophagie Inhibition du flux d'autophagie Prévention de la reconnaissance autophagique
Mort de la cellule hôte	Amortissement des voies pro-apoptotiques Activation des voies pro-survie	Interférence avec l'activation de l'inflammasome Amortissement des voies pro-apoptotiques Activation des voies pro-survie

V.3. Stratégies contre les immunoglobulines

V.3.1. Inhibition de la reconnaissance de l'immunoglobuline

S. aureus produit des facteurs de virulence qui inhibent l'opsonisation par immunoglobulines. La protéine A, codée par le gène *spa*, est l'un des facteurs de virulence les mieux caractérisés produits qui inhibe la phagocytose des neutrophiles. La protéine A est une protéine sécrétée de 42-kDa peut rester liée à la surface cellulaire staphylococcique ou elle peut être libérée sous une forme soluble. La protéine A se liera à la région Fc de l'IgG. Sur la surface cellulaire, la protéine A lie les IgG dans la mauvaise orientation pour exercer son activité antibactérienne, et la protéine A soluble agglutine et inactive partiellement les IgG.

V3.2. Déguisements antigéniques

Certains agents pathogènes peuvent cacher leurs antigènes uniques aux anticorps opsonisants ou au complément. Les bactéries peuvent être capables de s'enrober de protéines hôtes telles que la fibrine, la fibronectine ou même des molécules d'immunoglobuline. De cette manière, ils sont capables de cacher leurs propres composants de surface antigéniques du système immunologique.

S. aureus produit une coagulase liée aux cellules et un facteur d'agrégation qui provoquent la coagulation et le dépôt de la fibrine à la surface cellulaire. Il est possible que cela déguise les bactéries du point de vue immunologique de sorte qu'elles ne soient pas facilement identifiées comme antigènes et cibles pour une réponse immunologique.

La protéine A produite par *S. aureus* et la protéine G analogue produite par *Streptococcus pyogenes*, lient la partie Fc des immunoglobulines, recouvrant ainsi les bactéries d'anticorps et annulant leur capacité opsonisante par la désorientation.

La couche de fibronectine de *Treponema pallidum* fournit un déguisement immunologique pour le spirochète.

V.3.3. Interférence locale avec l'activité des anticorps

Les agents pathogènes peuvent interférer de plusieurs manières avec l'action antibactérienne des molécules d'anticorps. Certains agents pathogènes produisent des enzymes qui détruisent les anticorps.

Neisseria gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mutans*, qui peuvent se développer à la surface du corps, produisent des protéases IgA qui inactivent les IgA sécrétoires en clivant la molécule au niveau de la région charnière, en détachant la région Fc de l'immunoglobuline.

V.3.4. Variation antigénique

Une façon dont les bactéries peuvent tromper les forces de la réponse immunologique est de changer périodiquement les antigènes, c'est-à-dire de subir une variation antigénique. Les antigènes peuvent varier ou changer chez l'hôte au cours d'une infection, ou un organisme peut exister dans la nature sous la forme de plusieurs types antigéniques (sérotypes). La variation antigénique est un mécanisme important utilisé par les microorganismes pathogènes pour échapper aux activités neutralisantes des anticorps.

Certains types de variations antigéniques au cours d'une infection résultent d'inversions ou de conversions de gènes spécifiques au site ou de réarrangements de gènes dans l'ADN des micro-organismes. C'est le cas de certains agents pathogènes qui modifient les antigènes au cours de l'infection en passant d'un type fimbrial à un autre, ou en changeant les extrémités fimbriales. Cela rend la réponse immunitaire humorale originale obsolète en utilisant de nouvelles *fimbriae* qui ne se lient pas aux anticorps précédents. C'est le cas pour *N. gonorrhoeae* qui peut modifier les antigènes fimbriaux au cours d'une infection. Cette expression finement contrôlée des gènes des pili et des protéines de surface modifie le schéma d'adhérence aux différentes cellules hôtes et augmente la résistance à la phagocytose et à la lyse immunitaire.

Les «rechutes» de fièvre récurrente provoquées par le spirochète, *Borrelia recurrentis*, sont le résultat d'une variation antigénique par l'organisme. La maladie se caractérise par des épisodes de fièvre qui récidivent (vont et viennent) pendant des semaines ou des mois. Après l'infection, les bactéries se multiplient dans les tissus et provoquent une maladie fébrile jusqu'à l'apparition d'une réponse immunologique une semaine ou deux plus tard. Les bactéries disparaissent alors du sang en raison de la phagocytose, de la lyse, de l'agglutination, etc. médiées par les anticorps, et la fièvre diminue. Ensuite, un mutant antigéniquement distinct apparaît chez l'individu infecté, se multiplie et, en 4 à 10 jours, réapparaît dans le sang et il y a une autre attaque fébrile. Le système immunologique est stimulé et répond en conquérant le nouveau variant antigénique, mais le cycle continue de telle sorte qu'il peut y

avoir jusqu'à 10 épisodes fébriles avant la guérison finale. A chaque attaque, un nouveau variant antigénique du spirochète apparaît et un nouvel ensemble d'anticorps se forme chez l'hôte. Ainsi, ce changement d'antigènes au cours de l'infection contribue de manière significative à l'évolution de la maladie.

V.4. Les sidérophores bactériens

Dans l'organisme, le fer intracellulaire est en quantité limitée. Il est lié à des protéines (la ferritine, la transferrine et la lactoferrine). Le fer est un nutriment essentiel pour les bactéries dont la virulence dépend de leur capacité à assimiler le fer de l'hôte. De ce fait, les bactéries ont développé différentes stratégies de capture du métal (ex. production d'hémolysine), qui dépendent de sa disponibilité dans l'environnement, de sa nature (ionique, héminique), et de son degré d'oxydation.

Parmi ces stratégies, la production et la sécrétion de sidérophores (du grec *pherein* et *sideros* signifiant « porter le fer »). Il s'agit de molécules de faible poids moléculaire (200 à 2 000 Da), secrétées par les bactéries dans leur environnement et capables de chélater avec une très haute affinité le fer ferrique Fe^{3+} . Les complexes sidérophore- Fe^{3+} sont ensuite récupérés par la bactérie grâce à des transporteurs membranaires spécifiques. Dans la bactérie, la dissociation du fer de son chélateur nécessite en général une réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (le sidérophore ayant une plus forte affinité pour la forme ferrique Fe^{3+} (Fig 28).

Il existe une très grande diversité de siderophores bactériens avec plus de 500 chélateurs identifiés à ce jour, et de structures chimiques différentes. Ils se répartissent en trois grandes familles selon la fonction chimique chélatrice : les phénolates-catecholates, qui possèdent un groupement acide 2,3-dihydroxybenzoïque (*dihydroxybenzoic acid* - 2,3-DHBA), les hydroxamates et les acides hydroxycarboxyliques. Très souvent, les bactéries peuvent produire et sécréter un ou plusieurs sidérophores de structures chimiques différentes, mais elles peuvent aussi utiliser des sidérophores exogènes, produits par d'autres microorganismes, ce qui leur évite de les synthétiser.

Comme exemple de siderophores, nous pouvons citer l'**entérobactine** (appelée encore entérocheline), produite par *E. coli*, un des plus puissants et des plus répandus des siderophores, chélatant le fer *via* trois groupements 2,3-DHBA (acide 2,3-dihydroxybenzoïque), la **mycobactine**, produite par *M. tuberculosis* et les **pyoverdines** produites par *P. aeruginosa*.

La très forte affinité des sidérophores pour le fer leur permet de pirater le fer de l'hôte, le plus souvent celui qui est lié aux molécules de faible poids moléculaire, mais également, pour certains d'entre-eux, celui qui est associé aux protéines de transport et de stockage du fer, la transferrine et la ferritine.

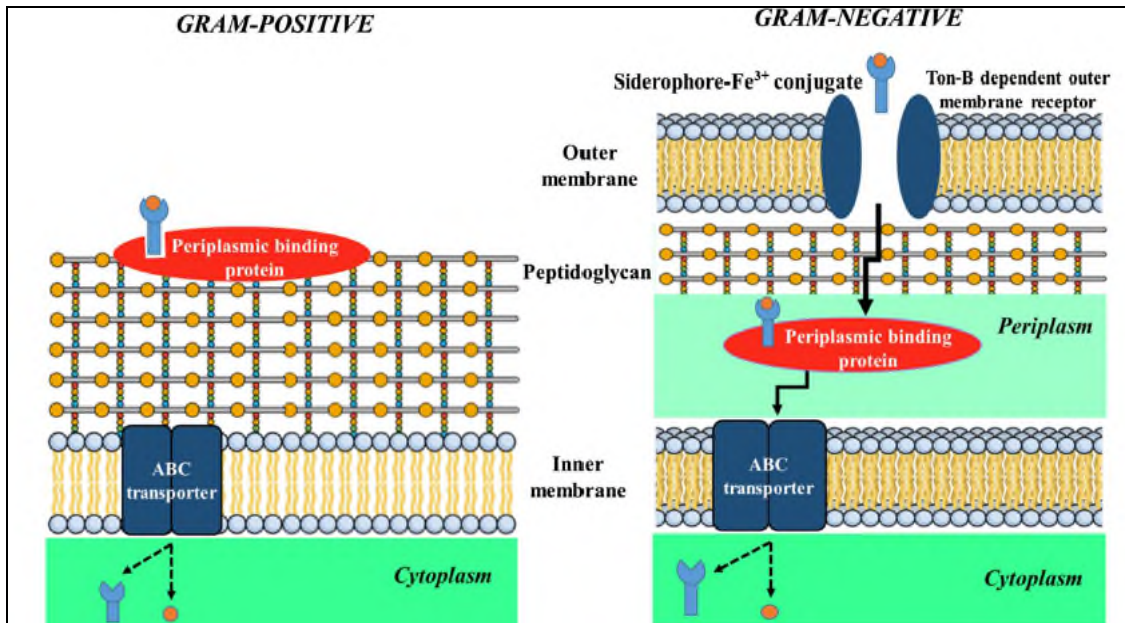


Figure 28. Trafic de sidérophores chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Vaulont et Schalk, 2015)

Questions de révision du chapitre I

1. Questions à court développement

1. Quelles sont les bactéries pathogènes. Expliquez avec un exemple approprié?
2. Que comprenez-vous par le terme infections opportunistes? Donnez des exemples.
3. Quelles sont les raisons des infections opportunistes chez l'homme?
4. Indiquez les étapes impliquées dans la pathogenèse des bactéries?
5. Quelles sont les différences entre adhésines fimbrial et afimbrial ?
6. Quels sont les rôles attribués au système de sécrétion de type IV?
7. Quels composants de la paroi cellulaire bactérienne sont les principaux causes de l'induction de cytokines qui conduisent à un faux choc septique?
8. Différencier l'endotoxine des exotoxines?
9. Quel est le rôle du biofilm dans la virulence bactérienne?
10. Quelles sont les trois niches intracellulaires occupées par les bactéries qui peuvent survivre et se répliquer dans les cellules hôtes?

2. Complétez le tableau suivant

Espèce pathogène	Toxine	Effet biologique	Maladie
	TSST		
<i>Vibrio cholerae</i>			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
	toxine diphtérique		
			botulisme
	Toxine pertussique (Ptx)		
	Shiga toxine (Stx)		

3. Question de réflexion

Même si un micro-organisme peut être considéré comme pathogène, il peut toujours ne pas être en mesure de provoquer une maladie en entrant dans le corps. Discutez pourquoi.

Chapitre II. Evolution des bactéries pathogènes

Les bactéries virulentes ont acquis leur phénotype grâce à un long parcours évolutif en contact étroit avec leur hôtes. La plupart des déterminants de la virulence se trouvent soit dans les chromosomes au niveau des îlots de pathogénicité ou hébergés dans les éléments génétiques accessoires tels que les plasmides et les phages. Ceci suggère que l'évolution d'un mode de vie avirulent vers la pathogénicité implique souvent l'acquisition d'ADN étranger. Néanmoins, pour que l'organisme soit un pathogène réel, ces facteurs de pathogénicité doivent être insérés dans un organisme écologiquement compatible avec l'hôte potentiel. De plus, dans certains cas, il ne s'agit pas d'une acquisition mais d'une suppression («trous noirs» associés à la virulence) qui sont nécessaires pour devenir un pathogène.

I. Bases génétiques et moléculaires de la virulence

I. 1. Supports génétiques de la virulence

I.1.1. Les îlots de pathogénicité

Chez les bactéries pathogènes, les gènes de virulence sont soit dispersés dans le génome central, soit regroupés dans des zones spécifiques du génome, appelées «îlot de pathogénicité» (PAI) qui codent pour de nombreuses fonctions lesquelles dépendent largement du contexte environnemental dans lequel la bactérie se développe.

Les PAI sont des éléments génétiques acquis par transfert horizontal de gènes au cours de l'évolution bactérienne. Elles sont normalement présentes chez les souches pathogènes mais absentes dans les souches non pathogènes de la même espèce ou d'une espèce étroitement apparentée. Elles portent souvent des éléments mobiles fonctionnels flanqués de séquences répétitives directes (DR). Elles sont insérées à côté de gènes codant pour l'ARNt.

Le PAI occupe des régions génomiques relativement grandes (entre 10 et 200 kb). Le contenu en GC et l'utilisation des codons des PAI est différent généralement de ceux des autres sites du génome. Les systèmes de sécrétion, les protéines effectrices et leurs chaperons correspondants, et les protéines régulatrices sont les composants communs des PAI. Cependant, de nombreuses études récentes ont montré que les ARN régulateurs bactériens (regRNA) qui sont impliqués dans divers aspects de la survie bactérienne et jouent un rôle de

régulation dans la virulence bactérienne et la pathogénèse, sont également des constituants importants des PAI.

Les PAI sont caractérisés par leur instabilité génétique intrinsèque due à des mutations. Ces dernières peuvent être observées lors de la culture d'agents pathogènes *in vitro*, mais on les trouve également chez les souches obtenues d'individus infectés, par exemple lors d'infections persistantes. De plus, plusieurs éléments génétiques mobiles, tels que les intégrases, transposases, et des éléments IS (séquence d'insertion), contribuent à la mobilisation et à l'instabilité des PAI.

Certaines souches de *H. pylori* présentent l'îlot de pathogénicité des gènes associés aux cytotoxines (cagPAI). CagA est une protéine immunogène élevée avec un poids moléculaire de 120 à 140 kDa et est transférée dans les cellules hôtes après la fixation de la bactérie à la cellule via le système de sécrétion de type IV codé par cagPAI. CagA est associée à des lésions cellulaires et des résultats cliniques plus graves, tels que l'adénocarcinome gastrique et l'ulcère duodéal. De plus, les souches de *H. pylori* positives pour CagA augmentent le risque de cancer gastrique. Près de 60% des souches de *H. pylori* isolées dans les pays occidentaux sont porteuses de cag PAI, alors que presque la totalité des souches isolées en Asie de l'Est sont cag PAI-positives.

La plupart des facteurs de virulence de *S. enterica* sont déterminés par des gènes le plus souvent localisés dans un PAI. Les PAI de *S. enterica* sérotype Typhimurium sont appelés Îles de pathogénicité de *Salmonella* (SPI). La fonction de SPI-1 est requise pour l'invasion de cellules non phagocytaires. Il contient les gènes codant pour le système de sécrétion T3SS et des protéines effectrices. Des gènes supplémentaires en dehors de SPI-1 sont également transloqués. Un sous-ensemble de ces protéines effectrices modifient les voies de la transduction du signal entraînant la réorganisation temporelle du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. La fonction de SPI-2 est essentielle pour la seconde caractéristique de la pathogénèse de *Salmonella*, la capacité de provoquer les infections et la prolifération dans les organes de l'hôte. Ce phénotype de virulence est lié à la capacité de *S. enterica* à survivre dans les cellules phagocytaires et à se répliquer à l'intérieur de vésicules SCV (pour *Salmonella*-containing vesicle) dans une variété de cellules eucaryotes. SPI-2 et les protéines de substrat du T3SS sont importants pour la pathogénèse systémique de *S. enterica* et de sa survie et de sa réplication dans la cellule de l'hôte (Fig29).

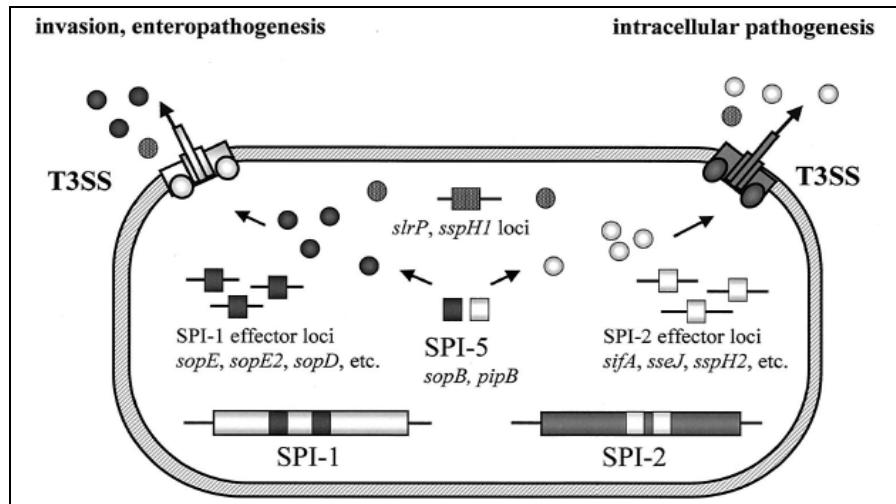


Figure 29. Relation des fonctions SPI de *S. enterica* (Schmidt et Hensel, 2004)

SPI-1 et SPI-2 codent chacun pour un appareil de sécrétion (T3SS) qui s'assemble dans l'enveloppe de la cellule. De plus, les protéines de substrat sécrétées ou transloquées par le T3SS codé SPI-1 (gris foncé cercles) ou le T3SS codé SPI-2 (cercles gris clair) sont codés par le PAI respectif. Autres protéines effectrices transloquées pour l'un ou l'autre système sont codés par divers loci en dehors de SPI-1 ou SPI-2. SPI-5 contient des gènes codant pour des protéines effectrices pour le système SPI-1 ainsi que pour le système SPI-2. Il existe des locus supplémentaires des effecteurs en dehors du PAI qui codent pour des protéines de substrat qui peuvent être sécrétées par le système SPI-1 ainsi que par le système SPI-2 (symboles gris pointillés).

I.1. 2. Bactériophage

Les bactériophages ont été isolés chez pratiquement toutes les espèces bactériennes, même chez les agents pathogènes intracellulaires tels que la *Chlamydia spp.* qui contiennent des phages spécifiques.

La présence de déterminants de virulence dans les phages infectant différentes espèces bactériennes a été décrit. En outre, une origine de phage a été proposée pour au moins certains îlots de pathogénicité. La transduction des déterminants de la résistance aux antibiotiques associé aux bactériophages a également été décrit. L'ADN de phage doit s'adapter à l'intérieur de la tête de la particule de phage, de sorte que sa longueur doit correspondre à une gamme de tailles. Dans de telles circonstances, le gain de certains gènes doit s'accompagner de la perte d'autrui. Pour cette raison, la possibilité de combiner gènes de résistance aux antibiotiques et déterminants de la virulence dans le même bactériophage est plus faible que dans le cas des plasmides, qui ont des exigences moins strictes pour l'incorporation de nouveaux fragments d'ADN.

Les bactériophages peuvent transférer des gènes de virulence en tant que passagers dans leurs génomes. Le transfert occasionnel de gènes de virulence par les phages permet aux bactéries réceptrices de coloniser de nouveaux habitats, tels que de nouveaux organismes

hôtes ou des sites anatomiques spécifiques. Cette extension permet également une propagation plus efficace des bactériophages. Ces derniers servent souvent de base à la production de toxines chez les bactéries pathogènes. Les exemples incluent la production de toxine diphtérique par *C. diphtheriae*, la formation de toxine érythrogénique par *S. pyogenes*, la synthèse de toxines de type Shiga par *E. coli* et la production de toxine botulique (types C et D) par *C. botulinum*.

Des gènes de virulence auraient été transférés entre phages appartenant à différents groupes ou infectant différentes espèces bactériennes augmentant ainsi la propagation latérale de ces gènes dans les bactéries.

I.1.3. Plasmide

Les plasmides, en combinaison avec des transposons, sont les véhicules primaires pour le transfert horizontal de gènes chez les bactéries, et ce sous des conditions de fortes pressions de sélection. La conjugaison peut permettre le transfert de plasmides entre les bactéries. Ces plasmides peuvent ensuite se répliquer à partir du chromosome bactérien, mais sous certaines conditions, les plasmides peuvent également s'intégrer dans le chromosome. Inversement, la formation d'éléments épisomiques ont été signalés pour certains PAI de *S. aureus*. Donc, les plasmides pourraient être un autre moyen de transfert de PAI entre les bactéries .

Les Plasmides chez les bactéries pathogènes codent pour des déterminants de la virulence, allant de la production de toxines et de l'échappement au système immunitaire, à la destruction de la machinerie cellulaire, comme dans le cas du plasmide oncogène Ti de *Agrobacterium*.

L'acquisition de plasmides peut dans certains cas permettre la création de nouvelles espèces bactériennes ayant de nouvelles caractéristiques phénotypiques comme c'est le cas des trois espèces pathogènes de *Yersinia* qui hébergent un plasmide de 70 kb que l'on appelle pYV (plasmid responsible for *Yersinia* virulence), essentiel pour la virulence. Ce plasmide, qui n'est pas conjugatif, constitue un système d'agression tellement complet qu'on en viendrait presque à le considérer comme un élément génétique pathogène utilisant une bactérie pour sa propagation. Il gouverne l'insertion de deux protéines, YadA et YlpA, dans la membrane externe de la bactérie ainsi que la sécrétion à l'extérieur de celle-ci de onze protéines appelées Yop. Le plasmide pYV code non seulement pour YadA, YI pA et les Yop mais aussi pour toute la machinerie qui permet l'exportation rapide de grandes quantités de Yop à travers les

deux membranes de la bactérie. Le plasmide pYV, enfin, contient les gènes régulateurs requis pour commander cette exportation au moment opportun et y consacrer l'essentiel du potentiel métabolique de la bactérie.

Il est bien connu que les plasmides sont des vecteurs majeurs pour la diffusion de la résistance aux antibiotiques et les déterminants de la virulence parmi les populations bactériennes. C'est aussi clair que leur présence dans le même élément génétique produira une co-sélection des deux types de déterminants. Parmi les souches d'entérobactéries accumulant à la fois plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence, deux groupes clonaux *E. coli* ST131 et *K. pneumoniae* ST258 connaissent, aujourd'hui, une dissémination mondiale notamment grâce aux plasmides épidémiques IncF contenant les types de réplicon FIA et FII.

Le tableau VI illustre les différents éléments génétiques mobiles associés à la pathogénicité chez *E. coli* 157:H7.

Tableau VI. Eléments génétiques mobiles associés à la pathogénicité chez *E. coli* 157:H7

(De la Cruz et Davies, 2000)

Nom	Type	Taille (kb)	Facteurs de virulence
pO157	Plasmide	92	Hémolysine Catalase-peroxidase Protéases serine extracellulaire
933W	phage lysogénique	62	Shiga toxine 2 Ser/Thr protéine kinase résistance au sérum Survie au macrophage 3 nouveaux gènes ARNt
LEE	Ilôt de pathogénicité	43	Intimine Tir (Translocated intimin receptor)

I.2. Régulation des gènes de virulence

Le succès d'une bactérie pendant la pathogénèse repose sur sa capacité à détecter et de répondre à une multitude d'environnements pendant l'infection de l'hôte. Cela nécessite l'utilisation d'un répertoire de fonctions génétiques de la part du germe qui sont régulés indépendamment en réponse aux signaux environnementaux rencontrés à l'intérieur de l'hôte infecté.

La régulation et le "timing" d'expression des facteurs de virulence est très important pour la plupart des bactéries pathogènes, car elles rencontrent différents micro-environnements pendant le cours naturel de l'infection, chacun nécessitant une adaptation rapide au nouvel environnement pour permettre à l'agent pathogène de coloniser, survivre et se développer dans l'hôte. Les bactéries accomplissent la régulation complexe des facteurs de virulence en utilisant un certain nombre de motifs communs.

I.2.1. Le quorum sensing (QS)

Le QS est un mécanisme de régulation génétique permettant aux communautés bactériennes de réguler une variété de processus biologiques importants pour l'adaptation bactérienne et la survie. Il est utilisé par de nombreuses bactéries pour percevoir et répondre à divers facteurs comme l'évolution de la densité de la population microbienne et l'expression de gènes spécifiques. Il comporte de petites molécules de signalisation diffusibles par membrane intercellulaires, appelés autoinducteurs, libérés dans l'environnement et jouant un rôle important dans la régulation de l'expression de plusieurs facteurs de virulence dont la formation de biofilm (Fig30). Les bactéries pathogènes utilisent ce mécanisme non seulement pour moduler la production du facteur de virulence mais aussi pour s'adapter aux exigences métaboliques de la vie en communauté.

Chez *P. aeruginosa*, le *quorum sensing* (QS) est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique. Ce système de régulation est fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre-elles, ce qui leur permet de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication bactérienne repose sur la production de phéromones diffusibles, des N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisés par une AHL-synthase qui est codée par un gène de type « I » (inducteur). Lorsque la concentration de ces molécules diffusibles atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur transcriptionnel de type « R ».

Le complexe ainsi formé va activer la transcription de gènes cibles dits de virulence mais également du gène « I », d'où le terme de molécules auto-inductrices. Six à 10 % des gènes de *P. aeruginosa* qui codent pour des protéines impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux ou dans la virulence sont ainsi régulés par le QS. À ce jour, trois systèmes de QS ont été caractérisés chez *P. aeruginosa* : il s'agit de LasR/LasI, de RhIR/RhII et le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, dénommé aussi *signal Pseudomonas quinolone* (PQS). Tous ces systèmes contrôlent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la virulence. L'exotoxine A, l'élastase, les phospholipases C, les rhamnolipides, la pyocyanine, la pyoverdine, la protéase alcaline, la protéase IV.

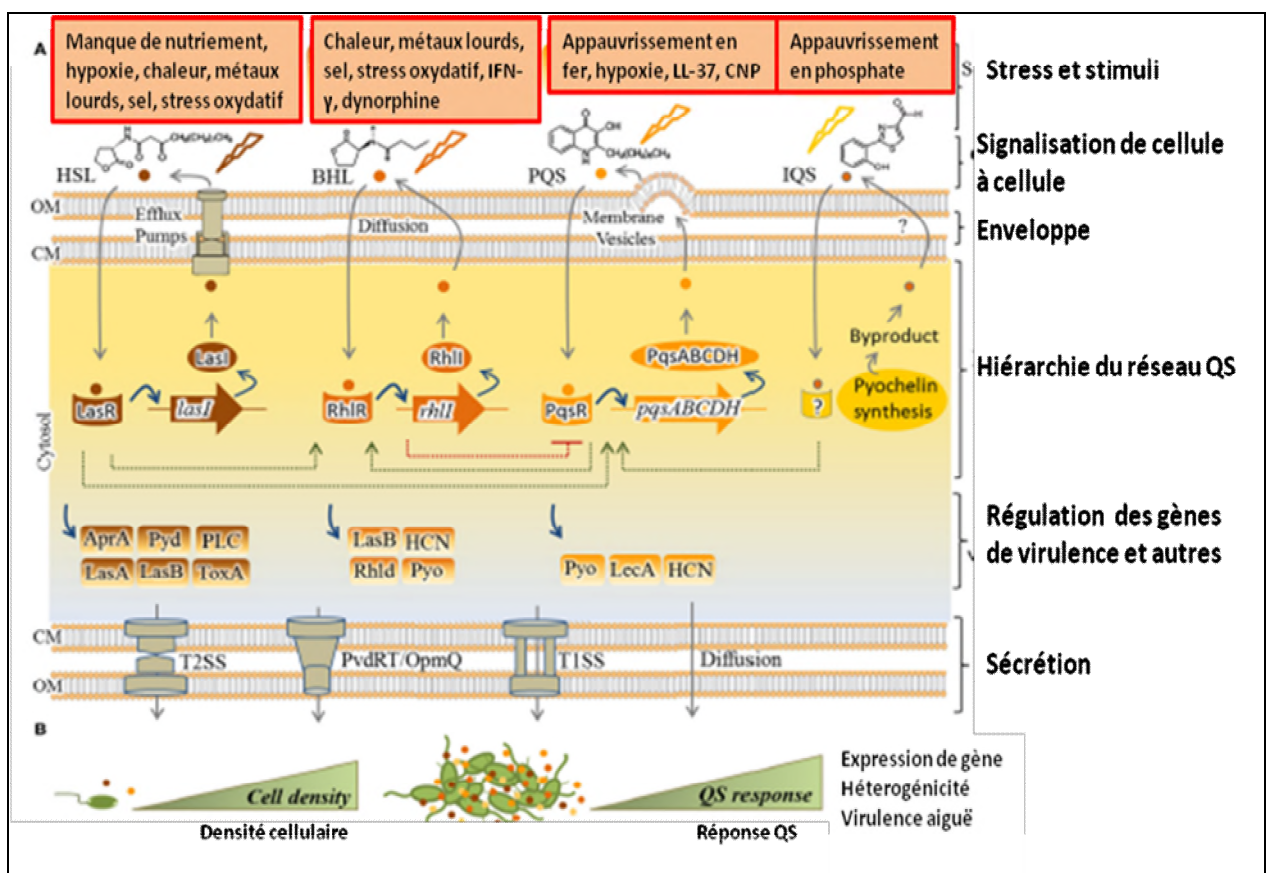


Figure 30. Réseau QS hiérarchique chez *P. aeruginosa* et régulation des facteurs de virulence (Moradali et al., 2017)

AprA, protéase alcaline; Pyd, pyoverdine; PLC, phospholipase C; ToxA, toxine A; LasA, LasA élastase; LasB, LasB élastase; HCN, cyanure d'hydrogène; Pyo, pyocyanine; RhId, rhamnolipides; Lec A, lectine A; CM, membrane cytoplasmique; OM, membrane externe.

I.2.2. Facteurs sigma

Les facteurs sigma sont des sous-unités protéiques des ARN polymérases bactériennes (les enzymes qui synthétisent l'ARN à partir d'un ADN et contrôlent l'initiation de la transcription au niveau d'une séquence promotrice). En conséquence, les facteurs sigma sont un régulateur majeur de l'expression des gènes procaryotes. Il est bien connu que les bactéries utilisent différents facteurs sigma pour contrôler la spécificité d'initiation à différents promoteurs, y compris les promoteurs dont les gènes codent pour les facteurs de virulence. En particulier, l'alternative sigma. Il a été démontré que les facteurs RpoS (s38) régulent l'expression des gènes en réponse à la phase stationnaire, la privation de nutriments, et le stress oxydatif et osmotique. Ce sont des environnements physiologiquement pertinents à ceux rencontrés par de nombreux agents pathogènes microbiens au cours de l'infection. Il a été démontré que le facteur sigma RpoS est important pour la virulence chez un certain nombre d'agents pathogènes bactériens, dont *S. typhimurium*, *E coli*, *P. aeruginosa* et *L pneumophila*.

Autres facteurs sigma alternatifs impliqués dans la régulation des gènes de virulence le facteur RpoE (s24), un facteur sigma qui répond au stress périplasmique et qui montre une importance dans la virulence du pathogène entérique *Salmonella Typhimurium*; RpoN (s54) et AlgU qui régulent le phénotype mucoïde chez *P. aeruginosa*; RpoH (s32), un facteur sigma de choc thermique important dans la régulation de la virulence de *V. cholerae*; et le facteur sigma F, qui affecte l'expression flagellaire chez l'agent pathogène respiratoire *Bordetella bronchiseptica*.

I.2.3. Systèmes à deux composants

Les systèmes de régulation à deux composants sont constitués de deux protéines impliquées dans l'expression des déterminants de la virulence. Typiquement, ces systèmes sont composés de:

- (1) une protéine capteur qui est intégrée dans la membrane bactérienne qui «détecte» différentes conditions physiologiques de la cellule bactérienne.
- (2) un régulateur de réponse qui se lie généralement au promoteur d'un gène pour activer ou réprimer la transcription.

Ce type de système de régulation est responsable du contrôle de nombreuses fonctions différentes chez les bactéries, y compris la virulence en participant notamment à la régulation

du fer, du phosphate, de l'azote, du carbone, de la production de capsules et de l'activité flagellaire. La molécule capteur du système à deux composants contient généralement une histidine kinase qui s'autophosphoryle lors de l'interaction avec une molécule signal. Le phosphate dérivé de l'ATP sur la kinase est ensuite transféré à la régulateur de réponse induisant un changement de conformation qui entraîne la liaison ou la libération de l'ADN promoteur.

La régulateur peut interagir avec l'ARN polymérase pour augmenter la transcription ou il peut se lier à une région promotrice pour empêcher la transcription du gène. Les facteurs de virulence bactériens connus pour être régulés par le système à deux composants comprennent la toxine de la coqueluche de *B. pertussis* (BvgA / BvgS63), la formation de pili et la production de toxines cholérique de *V. cholerae* (ToxR / ToxS64), la survie de *Salmonella* dans les macrophages (PhoP / PhoQ65), la régulation de la porine de la membrane externe chez *Salmonella* et *E. coli*, la production d'alginate chez *P. aeruginosa* (FimS [AlgZ] / AlgR67).

I.3. Progrès dans la compréhension des bactéries pathogènes obtenus à partir du "Whole Genome Sequencing" (WGS)

Le paradigme dominant de l'évolution bactérienne est représenté par les modifications périodiques déclenchées par le transfert horizontal de gènes par le biais des éléments génétiques mobiles. De plus, tous les gènes du génome de la bactérie montreront une relation étroite avec leur ancêtre le plus proche. Ce paradigme est vrai pour la plupart des bactéries, mais pas pour toutes. En outre, en plus de ces changements majeurs, une bactérie est sujette à des mutations ponctuelles spontanées qui peuvent modifier n'importe quel gène du génome. Plus tard, en raison de l'accumulation de ces changements, les bactéries peuvent soit conserver une fonction, soit se diversifier pour favoriser l'évasion immunitaire. Similaire à l'évolution de toutes les formes, la feuille de route phylogénétique de la toxine bactérienne comprend l'évolution de la molécule progénitrice fonctionnelle, suivi de processus adaptatifs, qui sont les ajustements évolutifs qui modifient l'efficacité catalytique, la spécificité du substrat, l'interaction modifiée avec les cellules cibles et la réponse de l'hôte. Généralement, les blocs de gènes se déplacent ensemble. Cependant, il existe plusieurs insertions et échanges de gènes entre différentes phylogénie pour différentes parties de gènes, appelé «mosaïcisme» ou HGT (transfert horizontal de gènes).

La découverte de "points chauds" illustrés par des blocs de gènes de virulence localisés dans les îlots de pathogénicité lors de l'insertion de phages chromosomiques ont été l'une des grandes surprises de ces dernières années, renforçant le concept selon lequel l'évolution de la virulence peut être caractérisée par de nombreux cas comme un processus dramatique «d'évolution par saccades »plutôt que comme un processus lent et progressif (mutations ponctuelles, réarrangements) de gènes existants pour améliorer la survie dans différentes niches (bien que cela soit également important). Les îlots génomiques, y compris les îlots de pathogénicité, sont dynamiques et sont considérés comme des anciens éléments intégratifs dans l'évolution des bactéries, y compris pathogènes.

Évidemment, l'évolution des organismes pathogènes tend à être limitée dans les temps modernes par le répertoire anti-infectieux développé par l'homme qui comprend des mesures d'hygiène, des contrôles épidémiologiques, des vaccins... ect, et de manière significative, les antibiotiques (Tableau VII).

Tableau VII. Facteurs pouvant influencer l'évolution future de la virulence et de la résistance aux antibiotiques (Martínez et Baquero, 2002)

Facteur	Résultat
Assainissement et mesures d'hygiène	Réduction du nombre d'infections
Préservation (éventuellement biorestauration) des écosystèmes	Maintien de la diversité microbienne
Changements démographiques humains	Augmentation du nombre de contacts hôte-pathogène
Changements environnementaux	Changements dans la localisation géographique des micro-organismes
Échanges commerciaux	Large propagation de micro-organismes
Augmentation du nombre de personnes âgées	Augmentation du nombre d'infections opportunistes
Technologies médicales agressives	Augmentation du nombre d'infections opportunistes
L'agriculture intensive	Réduction de la diversité microbienne; sélection de résistants aux antibiotiques bactéries par des antibiotiques et des additifs alimentaires
Maladies qui modifient la réponse de l'hôte à l'infection	Augmentation du nombre d'infections opportunistes
De nouvelles stratégies antimicrobiennes	Meilleur traitement des infections
Nouvelles technologies de vaccination	Prévention des infections
Bioterrorisme / guerre biologique	Propagation d'agents pathogènes anciens et / ou nouveaux

Le développement du séquençage de nouvelle génération (NGS) en tant que technologie rentable a facilité l'analyse des structures de la population bactérienne au niveau du génome entier et à grande échelle. À partir de ces données, les arbres phylogéniques ont été construits qui définissent les structures de la population aux niveaux local, national et mondial, fournissant un cadre pour l'analyse génétique. Bien qu'elles n'en soient encore qu'à un stade précoce, ces approches ont permis des progrès dans plusieurs domaines, y compris la cartographie de la transmission des agents pathogènes, la génétique de la colonisation de niche et l'adaptation de l'hôte, ainsi que des études d'association gène-phénotype. La résistance aux antibiotiques s'est avérée être un défi majeur au début du 21^e siècle, et des analyses phylogénétiques ont révélé l'effet dramatique que l'utilisation d'antibiotiques a eu à façonner les structures de la population bactérienne.

II. Résistance aux antibiotiques

II.1. Émergence des souches multirésistantes aux antibiotiques

Le premier traitement chimique des maladies infectieuses a été signalé par Paul Ehrlich en 1909 sous la forme d'un arsenic composé pour traiter la syphilis. Cent dix ans depuis lors, il s'est passé beaucoup de choses dans le domaine de la prévention et le traitement des maladies infectieuses, notamment par l'utilisation d'antibiotiques avec une contribution significative à l'augmentation de la durée de vie humaine. Le potentiel des agents pathogènes à muter sous la pression de sélection des antibiotiques qui les rendent résistants a été reconnu dans les années 1940. Mais en raison de l'utilisation intensive d'antibiotiques pour la thérapie humaine et l'élevage depuis plus de 70 ans a conduit à la présente crise de résistance des principaux agents pathogènes. En effet, plusieurs mécanismes de résistance touchant plusieurs familles d'antibiotiques ont été développés par les bactéries qui peuvent être d'origine chromosomique ou plasmidique incluant l'imperméabilité membranaire, la modification de la cible et l'inactivation enzymatique (Fig31).

La prévalence croissante des infections dues aux bactéries multirésistantes (MDR pour Multi Drug Resistant) constitue une menace grave pour la santé publique mondiale en raison des options de traitements limitées disponibles et de la lenteur du rythme de développement de nouveaux agents antimicrobiens. Les infections dues aux souches MDR sont associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité et une hospitalisation prolongée, ce qui se traduit par un fardeau important pour les systèmes de soins de santé. Récemment,

l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a lancé la toute première semaine de sensibilisation aux antibiotiques pour sensibiliser à la menace mondiale de la résistance aux antibiotiques, ainsi que relever les défis liés au mauvais usage des antibiotiques dans la pratique clinique.

Les souches MDR comprennent; *K. pneumoniae* et *E. coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénémases, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème et à la ticarcilline, *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM), Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) qui représentent des défis importants pour les cliniciens modernes dans l'efficacité du traitement et la gestion des maladies infectieuses.

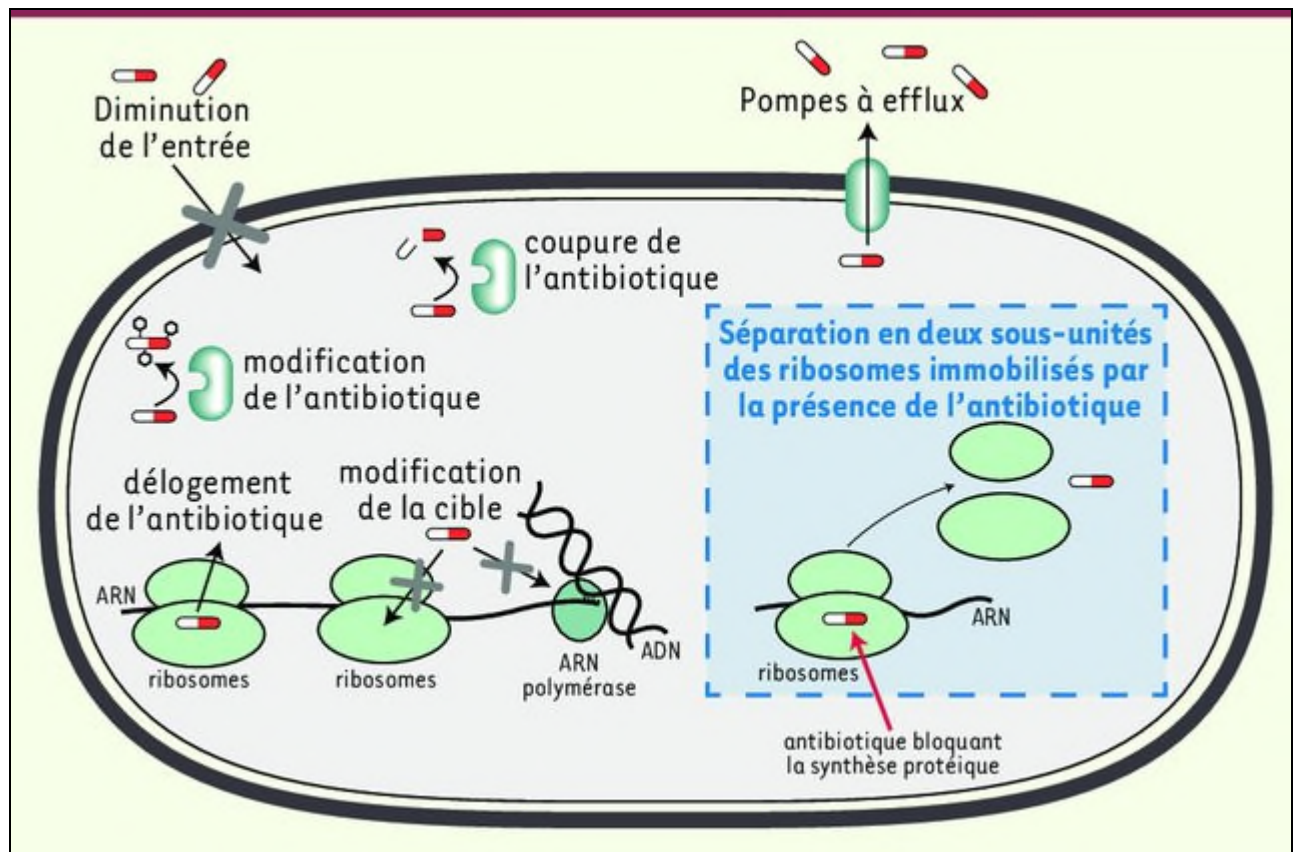


Figure 31. Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Duval et Cossart, 2019)

III.2. Lien entre la résistance et la virulence

En termes d'évolution et d'écologie, la résistance aux antibiotiques et les déterminants de la virulence partagent certaines caractéristiques de base. Puisque ces déterminants ont été acquis par transfert horizontal de gènes d'autres organismes. En effet, la virulence et la résistance aux antibiotiques sont des mécanismes adaptatifs formellement similaires sélectionnés pour survivre dans des conditions de stress (invasion de l'hôte ou traitement antibiotique). D'un point de vue écologique, aussi bien les conditions d'infection que les traitements antibiotiques tendent à réduire la biodiversité microbienne, seul un sous-ensemble très spécifique de bactéries est capable de coloniser l'hôte dans ces conditions.

Certains phénotypes de virulence sont liés à la résistance aux antibiotiques. Ainsi, les bactéries pathogènes peuvent être dans un mode de vie intracellulaire pendant l'infection ou alors peuvent être entourées d'une capsule ou englouties dans un biofilm permettant ainsi d'éviter le contact avec les antibiotiques. Les bactéries dans les biofilms sont plus résistantes à l'action des antibactériens que celles sous un mode de vie planctonique, les antibiotiques peuvent sélectionner des organismes producteurs de biofilm, augmentant ainsi la prévalence des infections chroniques. Autres mécanismes de virulence qui pourrait empêcher l'action des antibiotiques contre les bactéries. par exemple, des toxines entraînant une nécrose locale ou la formation d'abcès va certainement diminuer la disponibilité locale des antibiotiques en raison de la réduction de l'arrivée d'antibiotiques dans les foyers infectieux ou en raison de l'inactivation des médicaments par modification du pH, des protéines libres ou de l'ADN.

Dans ces cas, les mécanismes de pathogénicité peuvent finalement servir de mécanismes de résistance aux antibiotiques. Dans d'autres cas, par contre, les déterminants de la résistance aux antibiotiques peuvent contribuer à la virulence bactérienne. Ainsi, les gènes et les protéines de la pompe d'efflux sont présents dans tous les organismes. Chez les bactéries, les gènes qui codent pour les pompes d'efflux sont localisés sur le chromosome ou sur des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides. Ces pompes d'efflux lorsqu'elles sont surexprimées peuvent conférer une sensibilité réduite aux antibiotiques. Elles peuvent être spécifiques à un substrat ou peuvent transporter une gamme de composés différents (y compris les antibiotiques de différentes familles). Ce qui induit une multirésistance aux antibiotiques. Certaines classes de pompes d'efflux confèrent non seulement une résistance aux antibiotiques utilisés en thérapie, mais ont également un rôle dans la pathogénicité des

bactéries. En effet, parmi les agents exportés par les pompe d'efflux notamment celles appartenant aux familles RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), les déterminants de la virulence, comme les adhésines, les toxines ou d'autres protéines qui sont importants pour la colonisation et l'infection de cellules humaines et animales⁷¹. En effet, il a été suggéré que l'extrusion des sels biliaires présents dans l'écosystème intestinal auquel ces bactéries sont adaptées est la fonction pour laquelle ces déterminants MDR ont été sélectionnés. L'analyse des mutants du sérotype Typhimurium de *S. enterica* à forte sensibilité aux sels biliaires a démontré que cette sensibilité plus élevée était une conséquence de l'inactivation du déterminant MDR *acrB*. Cette inactivation conduit à une capacité réduite à coloniser le tractus intestinal chez une souris infectée, ce qui indique que la pompe d'efflux AcrAB est impliquée à la fois dans la résistance aux antibiotiques et dans la virulence. De plus, il a été démontré que la pompe MexAB-OprM exporte les déterminants de la virulence qui permettent à *P. aeruginosa* d'être invasive et provoquer une infection.

Le transporteur MacB ABC forme une pompe à efflux tripartite avec la protéine adaptatrice MacA et le canal de sortie de la membrane externe TolC pour expulser les antibiotiques et exporter les facteurs de virulence de bactéries Gram-négatives. Chez *S. maltophilia* MacAB confère une résistance à une variété d'antibiotiques incluant les macrolides, les aminosides et les polymyxines. L'expression de la pompe MacAB d'*A. baumannii* est surexprimée dans le cas de souches cliniques résistantes à la colistine dépourvues de LPS. Chez les espèces de *Pseudomonas*, les homologues de MacB sécrètent des toxines et des sidérophores comme la pyoverdine.

Dans tous les exemples discutés précédemment, un mécanisme sélectionné pour la virulence bactérienne peut également produire une résistance aux antibiotiques. La sélection des souches les plus virulentes pourrait sélectionner la résistance aux antibiotiques, et inversement, la sélection pour la résistance aux antibiotiques pourrait sélectionner les micro-organismes les plus virulents. Cependant, la situation inverse peut également être trouvée dans certains cas où la résistance aux antibiotiques peut diminuer la virulence bactérienne. Par exemple, l'activité catalase-peroxydase KatG est importante pour la survie de *M. tuberculosis* chez l'hôte. Les mutations qui éliminent cette activité empêchent l'activation de l'isoniazide et sont la principale cause de résistance à cet antibiotique chez *Mycobacterium spp.* On pourrait alors prévoir que les mutants de *Mycobacterium* résistants à l'isoniazide pourraient être moins

virulents que les souches sensibles à l'isoniazide de type sauvage. Cependant, lorsque des isolats résistants à l'isoniazide ont été analysés, une virulence réduite n'a pas été trouvée. Il s'est avéré que les souches de *M. tuberculosis* pathogènes accumulent des mutations compensatoires dans le gène codant pour l'alkyl peroxydase AphC, qui peut remplacer KatG pour la survie à l'intérieur de l'hôte.

III.3. Coût biologique de la virulence et de la résistance

Il est largement admis que l'acquisition de nouveaux déterminants génétiques peut avoir un coût biologique pour l'hôte bactérien. Cela peut se produire en raison de l'incompatibilité partielle de ces déterminants génétiques, ou en raison de l'énergie supplémentaire nécessaire pour maintenir les vecteurs génétiques porteurs des nouveaux gènes. L'acquisition de plasmides portant des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques pourrait avoir un effet sur le fitness bactérien, tel est le cas de grands plasmides "*vir*" qui sont nécessaires pour certains agents pathogènes, comme *Shigella* et *Yersinia*, pour exprimer un phénotype pathogène. Les coûts d'acquisition de ces déterminants pourraient être compensés par des mutations dans d'autres loci.

En effet, il semble que le coût biologique d'acquisition de nouveaux gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques est rapidement compensé en raison de la forte plasticité des génomes des bactéries et les immenses populations de bactéries à partir desquelles des mutants compensatoires peuvent être sélectionnés. Toutefois, l'acquisition de gènes de résistance par des bactéries pathogènes a eu lieu au cours des 50 dernières années, alors que l'acquisition et l'évolution des structures comme les îlots de pathogénicité se sont produits, il y a des milliers d'années. Ainsi, le temps d'évolution nécessaire pour acquérir et optimiser les mutations compensatoires pour atténuer les effets sur l'adéquation de l'acquisition des déterminants de la pathogénicité a été beaucoup plus long.

Questions de révision du chapitre II

1. Questions à court développement

1. Quels sont les éléments génétiques mobiles portant les gènes de virulence?
2. Est-ce que les PAI sont présents chez toutes les souches de la même espèce? Citez un exemple
3. Par quel phénomène se fait la co-sélection des gènes de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques?
4. Quels sont les environnements qui favorisent l'expression des gènes de virulence?
5. Comment une bactérie pathogène devient-elle résistante aux antibiotiques?

2. Question de réflexion

Quels sont les facteurs influençant sur l'évolution de la pathogenèse bactérienne?

Chapitre III. Nouvelles stratégies pour combattre les bactéries pathogènes

La résistance accrue des bactéries pathogènes contre plusieurs familles d'antibiotiques contribue à un nombre croissant d'infections incurables. Par conséquent, de nouveaux traitements efficaces sont nécessaires. Une approche alternative consiste à développer les thérapies antivirulentes qui interfèrent avec les déterminants de la virulence bactérienne (par exemple, les toxines, les enzymes ou les protéines de surface) et/ou les voies médiatrices de la virulence (par exemple, les systèmes de régulation de la virulence à deux composants, les régulateurs transcriptionnels ou système de détection de quorum) qui favoriseraient moins probablement le développement de la résistance aux antibiotiques. Les connaissances approfondies sur la façon dont les agents pathogènes bactériens établissent l'infection et une meilleure compréhension des déterminants génomiques de la virulence des pathogènes a ouvert la voie à une nouvelle thérapeutique anti-virulence robuste. Du moment que le composé ne cible pas la croissance bactérienne, cette stratégie garantit la préservation de la population microbienne endogène de l'hôte. On pense qu'en inhibant la virulence des bactéries, celles-ci sont moins capables de coloniser l'hôte et cela peut permettre à l'immunité naturelle de l'hôte d'éradiquer le pathogène atténué. La biologie des systèmes informatiques et les approches de criblage à haut débit fournissent des informations cruciales pour identifier de nouvelles cibles de médicaments et des molécules de pointe ayant un potentiel thérapeutique. En voici quelques une.

I. Potentiel thérapeutique des sidérophores

Les systèmes d'absorption du fer par les sidérophores sont reconnus comme une approche antimicrobienne en raison de leur rôle crucial pour la survie des bactéries et de leur pathogénicité. L'une des stratégies est l'inhibition de la biosynthèse du sidérophore empêchant la croissance bactérienne dans des conditions limitées en fer. Une autre approche du cheval de Troie utilisant des sidérophores ayant la capacité de délivrer les antibiotiques à l'intérieur des cellules, en surmontant la résistance liée au mécanisme d'imperméabilité grâce à la délivrance de l'antibiotique via les systèmes d'absorption du fer.

II. Élaboration de vaccins

L'utilisation de facteurs de virulence connus avec l'application de la bioinformatique du génome de souches pathogènes peut constituer un défi pour le développement de vaccins. Ainsi, des recherches sur l'élaboration de vaccins sont en cours qui permettent la prévention de certaines maladies infectieuses. La recherche en thérapie antimicrobienne est axée sur le développement de vaccins ou de médicaments pour bloquer l'étape d'adhésion dans le cycle d'infection.

Le développement de vaccins contre *E. coli* entérotoxigène (ETEC) a été identifié comme une stratégie de prévention primaire importante dans les pays en développement et pour les voyageurs dans ces régions. L'immunisation muqueuse peut provoquer la sécrétion d'anticorps IgA (sIgA) qui empêche l'attachement des bactéries à l'intestin et sont d'une importance particulière pour fournir une protection contre l'infection ETEC. La conception d'un vaccin ETEC multivalent contenant diverses facteurs de colonisation et la toxine ETEC peuvent fournir une protection contre un large éventail de souches bactériennes.

En outre, une autre application médicale potentielle des sidérophores est basée sur le développement de vaccins, une option viable pour prévenir et / ou traiter les infections aux bactéries multirésistantes tout particulièrement les infections urinaires. Mike et coll. (2016) ont enquêté sur le potentiel des sidérophores comme antigènes vaccinaux protecteurs. Ainsi, des souris ont été immunisées avec des sidérophores conjugués à une protéine porteuse immunogène ce qui a provoqué la stimulation du système immunitaire adaptatif qui ciblait les sidérophores furtifs bactériens et protégeait contre les infections urinaires.

Les souches mutantes de *Salmonella* déficientes en T3SS codé par l'îlot de pathogénicité SPI-2 sont fortement atténuées en virulence, et l'utilisation de ces souches comme vaccin contre la fièvre typhoïde ou comme souches porteuses de vaccins recombinants ont été évalués²⁹. De même, des études de vaccination couramment menées chez la souris, le lapin, le bétail et les primates ont pu démontrer le pouvoir d'inhiber le T3SS en utilisant des anticorps qui reconnaissent les effecteurs du T3SS ou ses composants structurels. L'un des exemples les plus notables des recherches récentes sur les vaccins a eu lieu dans le laboratoire Pasetti (2019). Ils ont développé un YopB combiné et le vaccin sous-unitaire LcrV qui agit contre *Yersinia enterocolitica*, un agent pathogène qui provoque des infections chez les jeunes enfants et les nourrissons. Le vaccin est également efficace contre *Y. pestis*. Des modèles de souris bébé et adultes ont été utilisés, avec > 90% des adultes et 60% des nourrissons protégés contre l'infection par *Y. enterocolitica*.

III. Inhibiteur de système de sécrétion

Chez les espèces dont la virulence dépend des systèmes de sécrétion, on peut espérer découvrir des molécules capables de bloquer le transport des protéines de virulence et donc l'expression du pouvoir pathogène de ces bactéries. De telles substances pourraient servir de médicaments antibactériens non antibiotiques, permettant d'améliorer la thérapeutique des maladies correspondantes pour diverses raisons: soit en relais d'antibiotiques dont l'efficacité est amoindrie par les conditions environnantes (par exemple, le pH acide du contenu gastrique ou du phagosome), soit en bloquant de manière précoce la sécrétion de toxines responsables principales du tableau clinique (comme dans le cas de la coqueluche).

Les mycobactéries peuvent contenir jusqu'à cinq systèmes de sécrétion de type 7 (T7SS) appelé ESX-1 à ESX-5, chacun ayant son propre rôle dans la physiologie et la virulence de ces bactéries. Ceci montre que ces systèmes sont des cibles prometteuses pour le développement de futur médicaments. Récemment, les premiers inhibiteurs de T7SS ont été identifiés et pourraient être les pionniers de nouvelles classes de médicaments contre les mycobactéries pathogènes.

Une motivation majeure pour comprendre le T3SS est dû à son rôle essentiel dans la virulence. L'aiguille, la pointe et le translocon sont exposés sur la surface bactérienne, ce qui en fait des cibles attractives pour le développement de nouveaux anti-infectieux. Les résultats structurels ont identifié des sites de liaison et des points chauds dans la pointe et les protéines translocon pour lier les petites molécules qui pourraient potentiellement perturber l'assemblage de l'appareil à aiguilles. Des défis majeurs restent à relever pour transformer ces petites molécules en inhibiteurs de T3SS pour combattre la menace croissante de la résistance aux antibiotiques chez de nombreuses bactéries pathogènes.

IV. Substances antibiofilm

Ces dernières années, diverses approches pour traiter les infections bactériennes à biofilm (par exemple, antagonisme quorum-sensing, anticorps, stratégies antiadhésion, bactériophages, etc.) ont été développées. Certaines études mettent en évidence l'effet antibiofilm de métabolites secondaires de certaines bactéries telles que les substances brutes extraites de souches d'actinobactéries qui ont montré une activité antibiofilm contre les souches de *S. epidermidis* en rendant les cellules moins hydrophobes.

V. Inhibition des toxines

Le ciblage des toxines a été une approche efficace pour la lutte contre les infections contre un certain nombre d'agents pathogènes, notamment *B. anthracis*, *B. pertussis* et *Clostridia spp.* Un certain nombre d'antitoxines spécifiques de *S. aureus* ont été étudiés dans les modèles animaux d'infection. Cependant, à ce jour, aucun n'a réussi dans les essais cliniques, bien que de nombreuses preuves précliniques existent prouvent que les agents neutralisants anti-toxines sont très efficaces pour prévenir ou traiter un large éventail de maladies causées par *S. aureus*. L'approbation de l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre la toxine du charbon par la FDA (Food and Drug Administration) en 2009 a conduit à des études explorant le potentiel de ces anticorps monoclonaux comme option thérapeutique pour les toxines de *S. aureus*. Par exemple, les anticorps anti- α -hémolysine confèrent un degré élevé de protection contre les pneumonies staphylococciques causée par divers isolats cliniques de *S. aureus* chez des animaux de laboratoire et réduisent considérablement la formation d'abcès dans un modèle de dermonécrose à *S. aureus*. De plus, l'efficacité thérapeutique des anticorps semble être additive ou synergique lorsqu'ils sont appliqués en combinaison avec des antibiotiques cliniquement utilisés (vancomycine ou linézolide), ce qui signifie que la présence de ces anticorps rendent le traitement par antibiotiques plus efficace.

PharmAthene a été fondée en 2001 pour développer des technologies et des produits pour répondre à ces besoins de biosécurité. Leur nouveau médicament antivirulien, Valortim, est un anticorps monoclonal humain qui a démontré une protection prophylactique et, séparément, post-infection contre les toxines de *B. anthracis* chez le lapin et les modèles de primates non humains. En 2006, Cangene Pharmaceuticals a reçu un Contrat de 362 millions de dollars sur 5 ans avec Project BioShield pour développer et produire 200000 doses d'une antitoxine botulique potentiellement améliorée, une antitoxine heptavalente dérivée de chevaux (contenant des anticorps contre 7 sous-types de toxines), en raison de son utilisation potentielle comme "bioterror agent". Sa commande initiale a été officiellement reçue dans le stock national stratégique des États-Unis en septembre 2007.

VI. Application des outils CRISPR pour le développement d'antibiotiques intelligents

Le système CRISPR-Cas est constitué du locus *CRISPR*, de l'anglais *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, et de gènes *cas* (*CRISPR-associated*). Ce locus est composé de courtes séquences nucléotidiques répétées (appelées répétitions) intercalées de courtes séquences nucléotidiques variables et souvent uniques (appelées espaceurs, de l'anglais *spacers*). Cette structure génétique fut découverte pour la première fois dans le génome de la bactérie *E. coli* en 1987. Sa fonction biologique resta inconnue pendant environ 20 ans. La description de la biochimie du système CRISPR-CAS9 a été réalisée essentiellement autour de 2012-2013, en particulier par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna (Prix Nobel de chimie 2020!!!).

CRISPR/Cas9 est le système de ciseaux moléculaires le mieux décrit. Il est considéré comme un système immunitaire adaptatif de la bactérie pouvant la protéger de l'attaque des bactériophages. Le locus CRISPR synthétise un ARN précurseur ainsi qu'un autre petit ARN, qu'on appelle ARN Traceur (pour « TransActing CRISPR ARN »). Ce dernier est essentiel au fonctionnement de ce système ; il est homologue aux répétitions de l'ARN précurseur et va s'hybrider pour former l'« ARN duplex », qui sera reconnu d'une part par Cas9 et de l'autre par une ARNase1. Ce processus conduit à la synthèse des petits ARN-guides. On obtient, à la fin de ces réactions, un complexe nucléoprotéique comprenant à la fois Cas9 et ces deux ARN. Ce complexe effectue la surveillance dans la cellule ; il est en permanence en train de scanner l'ADN présent dans la bactérie. Lorsqu'il identifie une séquence homologue au guide, il peut détruire cette séquence. Il agit donc en deux étapes: une première étape d'Immunitisation par l'intégration de gènes de bactériophages et d'une deuxième étape d'immunité par l'expression de ces gènes CRISPR en ARN-guides qui s'associent avec un complexe Cas pour détruire les séquences homologues de pathogènes.

Le couplage du système CRISPR/Cas9 avec une recombinaise a permis de révolutionner la modification des génomes bactériens par recombinaison homologue. En effet, les méthodes utilisées jusqu'alors comprenaient de nombreuses étapes qui marquaient de façon indélébile le chromosome bactérien sous la forme de « cicatrices ». La machinerie Cas9 peut, elle, couper l'ADN avant qu'une recombinaison avec une séquence choisie ne soit réalisée par la recombinaise, permettant alors la modification désirée sans cicatrice exogène au niveau de l'ADN (Fig32).

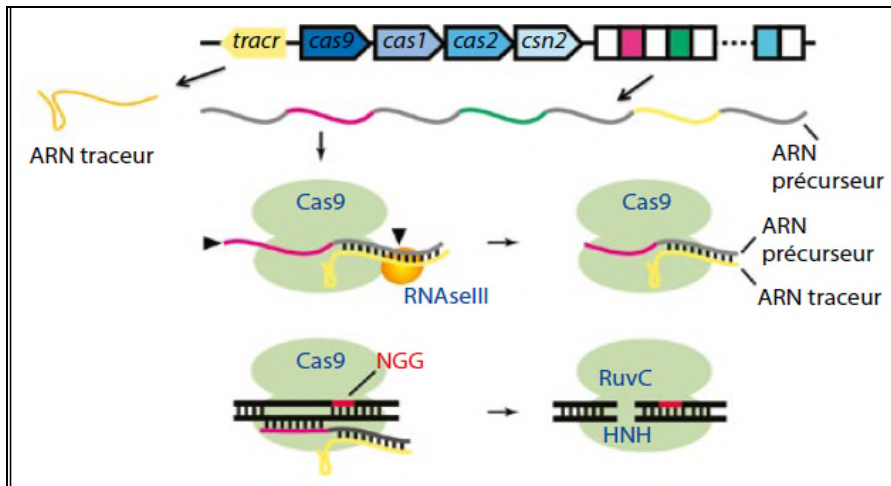


Figure 32 . Expression de l'ARN précurseur et de l'ARN Traceur par les gènes CRISPR puis traitement de ces ARN par la protéine Cas et l'ARNase pour former les ARN-guides et le complexe nucléoprotéique de surveillance de la cellule (Castagné et al., 2018)

On s'est récemment posé la question de savoir si on pouvait tenter d'utiliser cette capacité de Cas9 à tuer les bactéries comme une stratégie antimicrobienne, une sorte d'antibiotique intelligent en reprogrammant Cas9 pour cibler spécifiquement des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de virulence, et éliminer uniquement les bactéries qui portent ces gènes sans toucher au reste du microbiome. On a en fait réalisé un antibiotique à précision ultime, puisqu'on est capable d'aller tuer les bactéries en fonction des gènes qu'elles portent⁹³ (Fig33).

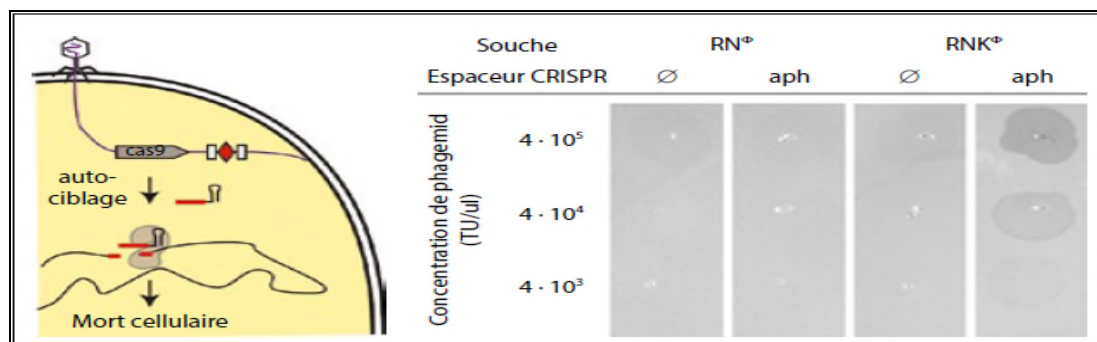


Figure 33. concept du système CRISPR-Cas9 comme stratégie antimicrobienne (Castagné et al., 2018)

On injecte le système CRISPR-Cas9 en utilisant des bactériophages comme vecteurs, ce qui revient à retourner complètement le système naturel. Ce système CRISPR est ensuite guidé pour cibler par exemple un gène de résistance à un antibiotique dans le chromosome de la bactérie et tuer les bactéries qui portent ce gène. Sur la droite de la figure sont représentés des tapis cellulaires développés sur des boîtes de Pétri de la bactérie *S. aureus*. et sur lesquels on a déposé une goutte de cette préparation de CRISPR vectorisée par des bactériophages. Ce qu'on observe, c'est que sur la droite, il s'agit de tapis de staphylocoques qui portent un gène de résistance à la kanamycine. et sur la toute droite c'est le système CRISPR programmé pour cibler ce gène de résistance à la kanamycine qui a été déposé. On observe qu'en déposant la goutte sur le tapis de bactérie, on tue de manière efficace les bactéries cibles-

Références bibliographiques

1. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. (2013). Microbiologie. Chapitre 1 La microbiologie et l'évolution des micro-organismes. 4ème édition française de boeck. p 17-18.
2. Orji FA, Ugbogu OC, Ugbogu EA, Barbabosa-Pliego A, Monroy JC, Salem AZM. (2018). The conventional pathogenic flora compositions: An overview of the trends used for bacterial pathogenicity identifications. *Microb Pathog.* 121:139-146.
3. Leggett HC, Cornwallis CK, West SA. (2012). Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. *PLoS. Pathogens.* 8(2):e1002512.
4. Ross LN, Woodward JF. (2016). Koch's postulates: An interventionist perspective. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences.* 59: 35-46.
5. Barbercheck CR, Bullitt E, Andersson M. (2018). Bacterial Adhesion Pili. *Rev. Subcell. Biochem.* 87:1-18.
6. Ribet D, Cossart P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Rew. Microbes and Infection.* 17:173-183.
7. Chaban B, Hughes HV, Beeby M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 46:91-103.
8. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu JJ. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *biomedical journal.* 39:14-23.
9. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics.* 9(2): 59.
10. Moormeier DE, Bayles KW. (2017). *Staphylococcus aureus* Biofilm: A Complex Developmental. *Rev. Organism. Microbiol.* 104(3): 365-376.
11. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Rev. Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15(7):39.
12. Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Rev. Ann. Biol. Clin.* 69 (4): 393-403.
13. De souza santos M, Orth K. (2019). The Role of the Type III Secretion System in the Intracellular Lifestyle of Enteric Pathogens. *Microbiol Spectrum* 7(3):
14. Lavigne JP, Botella E, O'Callaghan D. (2006). Les systèmes de sécrétions de type IV et leurs effecteurs Type IV secretion system and their effectors: an update . *Pathol. Biol.* 54: 296-303.
15. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. (2019). Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front. Microbiol.* 10:1100.
16. Kumar R, Feltrup TM, Kukreja RV, Patel KB, Cai S, Singh BR. (2019). Evolutionary Features in the Structure and Function of Bacterial Toxins. *Toxins.* 11(1): 15.
17. Chaudhuri K, Chatterjee SN. (2009). Bacterial Toxins: A Brief Overview. *Cholera Toxins.* 5. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
18. Salyers AA, Whitt DD. (2002). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2nd Edition. ASM Press: Washington. 1-539.
19. Galmiche A, Boquet P. (2001). Toxines bactériennes : facteurs de virulence et outils de biologie cellulaire. *médecine/sciences.* 17: 691-700.
20. Alonzo F, Torres VJ. (2014). The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of

- Staphylococcus aureus*. MMBR. 78(2):199–230.
21. Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14: 584-640.
22. Popoff MR. (2004). Mode d'action des neurotoxines botuliques et tétanique. Bull. Acad. Vét. France . Tome 157 - N°3:5-17.
23. Landraud L, Doye A, Buisson-Touati C, Boquet P, Lemichez E. (2003). L'activation/dégradation protéasomique des GTPases Rho par CNF1 confère des capacités invasives aux *E. coli* uropathogènes . M/S.4. 19.
24. Rudkin JK, McLoughlin RM, Preston A, Massey RC. (2017). Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? PLoS Pathog 13(9): e1006452.
25. Pilo P, Frey J. (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. Infect Genet Evol. 64:115-125.
26. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. Réanimation. 21:268-279.
27. Genestier AL, Lina G. (2001). Un feu d'artifice de superantigènes chez *Staphylococcus aureus*! La Lettre de l'Infectiologue. Tome XVI - 8-9: 279-283.
28. Kobayashi SD, Malachowa n, DeLeo FR. (2018). Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. J. Innate. Immun.10:432–441.
29. Paczosa MK, Meccas J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol. Mol. Biol Rev 80:629–661.
30. Guerra FE, Borgogna TR, Patel DM, Sward EW, Voyich JM. (2017). Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:286.
31. Cole JN, Nizet V. (2016). Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. Microbiol. Spectr. 4(1):10.
32. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 4(1): 3–66.
33. Mitchell G, Chen C, Portnoy DA. (2016). Strategies used by bacteria to grow in macrophages. Microbiol. Spectr. 4(3):10.
34. Todar K. (2020). Bacterial Defense against Specific Immune Responses <http://textbookofbacteriology.net/antiimmuno.html>. Madison, Wisconsin.
35. Vulont S, Schalk I. (2015). Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. Médecine/sciences. 31: 756-63.
36. Schmidt H, Hensel M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews. 17(1):14–56.
37. De la Cruz F, Davies J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends in Microbiology. 8 (3):128-133.
38. Martínez JL, Baquero F. (2002). Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 15(4): 647–679.
39. Khardori N, Stevaux C, Ripley K. (2019). Antibiotics: From the Beginning to the Future: Part Indian J Pediatr. 87(1):39-42.
40. Duval M, Cossart P. (2019). Un nouveau mécanisme de résistance aux antibiotiques: Le recyclage des ribosomes. Medecine sciences: M/S 35(8-9):611-613.
41. Ribeiro M, Simões M. (2019) . Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores.. Environmental Chemistry Letters. 17:1485–1494.
42. Castagné P, Guingand A, Moderc A, Monard S. (2018). Ingénierie du génome bactérien grâce à l'outil CRISPR/Cas12a. m/s. 34(5):399-400.