



**HAL**  
open science

# Bactéries persistantes : vers un nouvel angle d'attaque dans la thérapeutique antimicrobienne ?

Selma Metaane

► **To cite this version:**

Selma Metaane. Bactéries persistantes : vers un nouvel angle d'attaque dans la thérapeutique antimicrobienne ?. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02149939

**HAL Id: dumas-02149939**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02149939>**

Submitted on 3 Sep 2019

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

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



**THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

Thèse en vue du

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée par

**Selma Metaane**

---

**Bactéries  
persistantes :  
Vers un nouvel angle  
d'attaque dans la  
thérapeutique  
antimicrobienne ?**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 8 octobre 2018**

devant le jury composé de :

**Alexandra MAURE**

Docteur en Pharmacie / *examineur*

**Pierre-Yves DONNIO**

PU Rennes 1 / *examineur*

**Marie-Laure PINEL**

MCU Rennes 1 / *directeur de thèse*

**Odile SERGENT**

PU Rennes 1 / *présidente de jury*



**THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

Thèse en vue du  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée par

**Selma Metaane**

---

**Bactéries  
persistantes :  
Vers un nouvel angle  
d'attaque dans la  
thérapeutique  
antimicrobienne ?**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 8 octobre 2018**

devant le jury composé de :

**Alexandra MAURE**

Docteur en Pharmacie / *examineur*

**Pierre-Yves DONNIO**

PU Rennes 1 / *examineur*

**Marie-Laure PINEL**

MCU Rennes 1 / *directeur de thèse*

**Odile SERGENT**

PU Rennes 1 / *présidente de jury*

ANNEE 2017-2018

## Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

| <b>PROFESSEURS</b>      |                    |            |     |             |
|-------------------------|--------------------|------------|-----|-------------|
|                         |                    | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
| <b>BOUSTIE</b>          | <b>Joël</b>        | X          | HDR |             |
| <b>BURGOT</b>           | <b>Gwenola</b>     | X          | HDR | X           |
| <b>DONNIO</b>           | <b>Pierre Yves</b> | X          | HDR | X           |
| <b>FAILI</b>            | <b>Ahmad</b>       |            | HDR |             |
| <b>FARDEL</b>           | <b>Olivier</b>     | X          | HDR | X           |
| <b>FELDEN</b>           | <b>Brice</b>       | X          | HDR |             |
| <b>GAMBAROTA</b>        | <b>Giulio</b>      |            | HDR |             |
| <b>GOUGEON</b>          | <b>Anne</b>        | X          | HDR |             |
| <b>LAGENTE</b>          | <b>Vincent</b>     | X          | HDR |             |
| <b>LE CORRE</b>         | <b>Pascal</b>      | X          | HDR | X           |
| <b>LORANT (BOICHOT)</b> | <b>Elisabeth</b>   |            | HDR |             |
| <b>MOREL</b>            | <b>Isabelle</b>    | X          | HDR | X           |
| <b>SERGENT</b>          | <b>Odile</b>       | X          | HDR |             |
| <b>SPARFEL-BERLIVET</b> | <b>Lydie</b>       | X          | HDR |             |
| <b>TOMASI</b>           | <b>Sophie</b>      | X          | HDR |             |
| <b>URIAC</b>            | <b>Philippe</b>    | X          | HDR |             |
| <b>VAN DE WEGHE</b>     | <b>Pierre</b>      |            | HDR |             |
| <b>VERNHET</b>          | <b>Laurent</b>     | X          | HDR |             |

| <b>PROFESSEURS ASSOCIES</b> |               |            |     |             |
|-----------------------------|---------------|------------|-----|-------------|
|                             |               | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
| <b>BUREAU</b>               | <b>Loïc</b>   | X          |     |             |
| <b>DAVOUST</b>              | <b>Noëlle</b> | X          |     |             |

| <b>PROFESSEURS EMERITES</b> |                |            |     |             |
|-----------------------------|----------------|------------|-----|-------------|
|                             |                | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
| <b>CILLARD</b>              | <b>Josiane</b> | X          | HDR |             |
| <b>GUILLOUZO</b>            | <b>André</b>   |            | HDR |             |

| <b>MAITRES DE CONFERENCES</b> |                       |            |     |             |
|-------------------------------|-----------------------|------------|-----|-------------|
|                               |                       | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
| <b>ABASQ-PAOFAI</b>           | <b>Marie-Laurence</b> |            |     |             |
| <b>ANINAT</b>                 | <b>Caroline</b>       | X          | HDR |             |
| <b>AUGAGNEUR</b>              | <b>Yoann</b>          |            |     |             |
| <b>BEGRICHE</b>               | <b>Karima</b>         |            |     |             |
| <b>BOUSARGHIN</b>             | <b>Latifa</b>         |            | HDR |             |
| <b>BRANDHONNEUR</b>           | <b>Nolwenn</b>        |            |     |             |
| <b>BRUYERE</b>                | <b>Arnaud</b>         | X          |     |             |
| <b>BUNETEL</b>                | <b>Laurence</b>       | X          |     |             |
| <b>CHOLLET-KRUGLER</b>        | <b>Marylène</b>       | X          |     |             |
| <b>COLLIN</b>                 | <b>Xavier</b>         | X          |     |             |
| <b>CORBEL</b>                 | <b>Jean-Charles</b>   | X          | HDR |             |
| <b>DAVID</b>                  | <b>Michèle</b>        | X          | HDR |             |
| <b>DELALANDE</b>              | <b>Olivier</b>        |            |     |             |
| <b>DELMAIL</b>                | <b>David</b>          |            |     |             |
| <b>DION</b>                   | <b>Sarah</b>          |            |     |             |
| <b>DOLLO</b>                  | <b>Gilles</b>         | X          | HDR | X           |
| <b>GICQUEL</b>                | <b>Thomas</b>         | X          |     | X           |
| <b>GILOT</b>                  | <b>David</b>          |            | HDR |             |
| <b>GOUAULT</b>                | <b>Nicolas</b>        |            | HDR |             |
| <b>HITTI</b>                  | <b>Eric</b>           |            |     |             |
| <b>JEAN</b>                   | <b>Mickaël</b>        |            |     |             |
| <b>JOANNES</b>                | <b>Audrey</b>         |            |     |             |
| <b>LECUREUR</b>               | <b>Valérie</b>        |            | HDR |             |

|                            |                    |   |     |   |
|----------------------------|--------------------|---|-----|---|
| <b>LE FERREC</b>           | <b>Eric</b>        | X |     |   |
| <b>LE GALL-DAVID</b>       | <b>Sandrine</b>    |   |     |   |
| <b>LE PABIC</b>            | <b>Hélène</b>      |   |     |   |
| <b>LEGOUIN-GARGADENNEC</b> | <b>Béatrice</b>    |   |     |   |
| <b>LOHEZIC-LE DEVEHAT</b>  | <b>Françoise</b>   | X |     |   |
| <b>MARTIN-CHOULY</b>       | <b>Corinne</b>     |   | HDR |   |
| <b>MINET</b>               | <b>Jacques</b>     | X | HDR |   |
| <b>NOURY</b>               | <b>Fanny</b>       |   |     |   |
| <b>PINEL-MARIE</b>         | <b>Marie-Laure</b> |   |     |   |
| <b>PODECHARD</b>           | <b>Normand</b>     |   |     |   |
| <b>POTIN</b>               | <b>Sophie</b>      | X |     | X |
| <b>RENAULT</b>             | <b>Jacques</b>     | X | HDR |   |
| <b>ROUILLON</b>            | <b>Astrid</b>      |   |     |   |

### ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

|               |                   | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|---------------|-------------------|------------|-----|-------------|
| <b>BACLE</b>  | <b>Astrid</b>     | X          |     | X           |
| <b>BOUVRY</b> | <b>Christelle</b> | X          |     | X           |

### ATER

|                |                |   |  |
|----------------|----------------|---|--|
| <b>PALAZZO</b> | <b>Claudio</b> |   |  |
| <b>VICTONI</b> | <b>Tatiana</b> | x |  |

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, le Pr. Pierre-Yves Donio et le Dr. Alexandra Maure, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Marie-Laure Pinel pour sa présence, ses conseils et ses encouragements bien que les délais de rédaction de cette thèse furent très courts.

Un remerciement spécial au Pr. Odile Sergent, grâce à qui j'ai pu intégrer la filière recherche de Rennes à partir de la 5<sup>e</sup> année, ce qui m'a probablement ouvert les portes me permettant de poursuivre dans la recherche.

Merci au doyen Jean-Louis Beaudeau, au Pr. Virginie Lasserre, et au Pr. Marie-José Butel de m'avoir soutenue dans ma décision de quitter Paris Descartes pour rejoindre la faculté de pharmacie de Rennes.

Merci au Dr. Françoise Norel et à Véronique Monteil dont les travaux m'ont inspiré le choix du sujet de cette thèse.

Merci aux rennais, qui m'ont accueillie et qui ont rendu ces quelques mois d'externat aussi doux que simples.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenue durant ce cursus de Pharmacie, de Huma Pharma à l'A.N.E.P.F. (les TPMP !), en passant par la C.E.P.P.V. et par notre biofilm de M2. En particulier : Cécile H. Léa, Lauriane, Annelore, Anne-Sophie, Ilias, Laura, Trâm, Sofiane, Sophie Y., Tigrou, Ounissa, Marion L., Alexandra M..Et en particulier, merci à Sandro, camarade de Promo/Associations/Appartement depuis la P2 (rayez la mention inutile).

Enfin, merci à mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait pu être possible.

*Pour que vive la Santé, vive la Pharmacie*

## ***Serment de Galien***

*« En présence des maîtres de la Faculté, et de mes condisciples, je jure :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »*



## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| <i>Serment de Galien</i> .....   | 6  |
| Introduction .....   | 13 |
| Les persisters : toujours présents ou réponse adaptative ? .....   | 14 |
| I. Définition et historique.....   | 14 |
| II. Comment différencier techniquement les persisters ? .....  | 19 |
| III. Des bases génétiques héritables.....  | 24 |
| IV. Une tolérance à large spectre .....  | 30 |
| A. Aminoglycosides.....  | 31 |
| B. Floroquinolones .....   | 32 |
| C. Bêta-lactamines .....   | 32 |
| D. Pompes d'efflux .....   | 33 |
| L'entrée des bactéries en état de persistance.....   | 35 |
| I. Mécanismes moléculaires et voies métaboliques impliqués dans la formation de bactéries persistantes ..... | 35 |
| A. La réponse stringente et (p)ppGpp.....  | 36 |
| B. RpoS et la réponse générale au stress .....   | 39 |
| C. La réponse SOS.....   | 39 |
| D. Communication cellulaire ou quorum sensing .....  | 41 |
| II. Les systèmes toxine-antitoxine.....  | 42 |
| A. Les différents types de systèmes toxine-antitoxine .....  | 44 |
| B. Les systèmes toxine-antitoxines impliqués dans la persistance bactérienne .....                           | 50 |
| III. Conditions environnementales favorisant la formation de bactéries persistantes .....                    | 59 |
| A. Carence en nutriments et phase stationnaire .....   | 59 |
| B. Traitement sub-létal d'antibiotiques .....  | 60 |
| C. Internalisation dans une vacuole phagocytaire .....   | 60 |

|   |     |
|---|-----|
| D. Formation de biofilm .....   | 63  |
| Les caractéristiques phénotypiques des persisters .....                           | 65  |
| I. Une activité métabolique modifiée .....  | 65  |
| II. Les colonies naines (ou Small Colony Variants).....                           | 67  |
| Aspects thérapeutiques.....   | 70  |
| I. Limiter la formation de bactéries persistantes.....                            | 72  |
| II. Tuer directement les bactéries persistantes .....                             | 75  |
| III. Sensibiliser les bactéries persistantes aux antibiotiques.....               | 85  |
| A. Stimuler les cibles des antibiotiques et stimuler la sortie de quiescence..... | 85  |
| B. Stimuler l'entrée d'antibiotique dans la cellule .....                         | 86  |
| C. Combiner plusieurs antibiotiques .....   | 90  |
| Conclusion.....   | 92  |
| Bibliographie.....  | 100 |

## Liste des illustrations

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Courbe de croissance lors d'un choc antibiotique .....  | 16 |
| Figure 2 : Différences entre la résistance, la tolérance et la persistance bactérienne à un traitement antibiotique.....                                     | 20 |
| Figure 3 : La tolérance chez les bactéries en croissance lente et chez les bactéries en phase de retard.....   | 21 |
| Figure 4 : Stratégie d'identification de la résistance, la persistance et la sensibilité des souches bactériennes.....                                       | 22 |
| Figure 5 : Avantage sélectif conféré par la présence ou l'absence d'un gène. ....  | 24 |
| Figure 6 : Régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle par l'ARN polymérase et son facteur $\sigma$ activateur d'une séquence promotrice. .... | 26 |
| Figure 7 : Résumé des mécanismes qui induisent une tolérance à large spectre. ....   | 34 |
| Figure 8 : Conditions environnementales et signaux cellulaires favorisant la formation de persisters.....  | 35 |
| Figure 9 : Induction de la réponse SOS par la protéine RecA .....  | 40 |
| Figure 10 : Mécanisme du quorum sensing AHL chez des bactéries à Gram négatif .....  | 41 |
| Figure 11 : Systèmes toxine-antitoxines ou « modules d'addiction ».....  | 43 |
| Figure 12 : Système toxine-antitoxine de type I .....  | 44 |
| Figure 13 : Système toxine-antitoxine de type II. ....   | 45 |
| Figure 14 : Système toxine-antitoxine de type III.....   | 47 |
| Figure 15 : Système toxine-antitoxine de type IV.....  | 48 |
| Figure 16 : Système toxine-antitoxine de type V .....  | 48 |
| Figure 18 : Système toxine-antitoxine de type VI.....  | 49 |
| Figure 18 : Le complexe HipBA est un système toxine-antitoxine de type II. ....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 19 : Schéma résumant le modèle d'activation du système HipBA par le (p)ppGpp, effecteur de la réponse stingente. ....                    | 53 |
| Figure 20 : Inhibition de la traduction de la toxine tisB par l'antitoxine IstR-1. ....   | 56 |
| Figure 21 : Trois voies majeures de formation de persisters chez E. coli K-12 qui dépendent de l'activation de systèmes toxine-antitoxine. .... | 58 |
| Figure 22 : Conditions environnementales au sein d'un macrophage. ....  | 61 |
| Figure 23 : Etapes de constitution d'un biofilm.....  | 63 |
| Figure 24 : Stratégies permettant de lutter contre les bactéries persistantes :.....  | 71 |
| Figure 25 : Représentation de l'hétérogénéité des persisters. ....  | 94 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau I : Les différents profils de réponse d'une population bactérienne à une antibiothérapie : Résistance, Sensibilité, Tolérance et Persistance .....                  | 18 |
| Tableau II : Gènes impliqués dans la persistance d' <i>E. coli</i> .....  | 27 |
| Tableau III : Résumé des classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action .....   | 30 |
| Tableau IV : Le régulon de (p)ppGpp (d'après Cashel et al., 1996 et Zhou et Jin, 1998).....   | 38 |
| Tableau V : Systèmes toxine-antitoxine impliqués dans la persistance classés par type.....  | 50 |
| Tableau VI : Mutations décrites chez les SCV de <i>S. aureus</i> .....  | 68 |
| Tableau VII : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet sur la formation des bactéries persistantes .....                               | 74 |
| Tableau VIII : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet direct de mort cellulaire sur les bactéries persistantes .....                 | 78 |
| Tableau IX : Tableau non exhaustif des essais cliniques les plus récents de molécules prometteuses.....   | 82 |
| Tableau X : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet de sensibilisation des bactéries persistantes.....                                | 88 |
| Tableau XI : Résumé des combinaisons de molécules décrites dans la littérature connues pour avoir montré leur efficacité dans l'éradication de bactéries persistantes ..... | 91 |
| Tableau XII : Résumé des différents modèles d'infection utilisés dans la recherche anti-persisters.....   | 96 |

## Abréviations

AHL : Acyl-homoserine lactone

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI (= MIC) : Concentration Minimal Inhibitrice

CSP : Competence-Stimulating Peptide

DMK : Duration Minimal of Killing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

PolyPPP : Polyphosphate

(p)ppGpp : guanosine penta- et tétraphosphate

RBS : Ribosome Binding Site

ROS : Reactive Specie Oxygen

SCV : Small Colony Variants

STA : Système Toxine-Antitoxine

TA : Toxine-Antitoxine

## Introduction

Selon l’OMS, la résistance aux antibiotiques constitue aujourd’hui « l’une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement ». Les risques représentés par l’émergence des bactéries résistantes et multi-résistantes sont connus depuis l’émergence des premiers antibiotiques. Selon les chiffres de l’OMS, 700 000 personnes meurent chaque année d’infections dues à des bactéries résistantes dont 25 000 en Europe, et ce chiffre est en constante augmentation. Les cliniciens sont de plus en plus confrontés à des échecs thérapeutiques, dont beaucoup sont toujours attribués aux multi-résistances croissantes des bactéries et, alors que l’on approche de « l’impasse thérapeutique » crainte par les professionnels de santé, les recherches se multiplient concernant cette problématique de l’antibiorésistance.

Parmi les préoccupations principales causées par l’antibiorésistance, on retrouve la récurrence des infections qui mène, d’une part à une chronicité de la maladie, et d’autre part qui favorise la sélection de mutants résistants. Récemment, les pistes de recherches concernant les facteurs induisant la récurrence des infections ont pris de l’ampleur, et il est apparu qu’une grande partie de l’échec thérapeutique des antibiothérapies pouvait être attribué, non pas à la résistance à proprement parler, mais à d’autres mécanismes tels que la formation de biofilms ou, dans notre cas, aux bactéries persistantes.

Les bactéries persistantes sont techniquement difficiles à différencier des autres bactéries et la prise de conscience de leur importance est très récente. On les retrouve chez toutes les espèces bactériennes et il y a un lien de réciprocité entre résistance et persistance : l’un favorise l’autre et *vice versa*. Les bactéries persistantes sont génétiquement identiques aux autres bactéries de la culture et sont très peu nombreuses au sein d’une colonie.

Ces données nous mènent à penser que la récurrence des infections chroniques ne peut être attribuée uniquement à la résistance, mais qu’en plus d’être multifactorielle, on peut affirmer que la persistance joue probablement un rôle important dans ce phénomène. Ainsi, dans un contexte où les infections chroniques sont devenues un véritable enjeu de santé publique, il est nécessaire de prendre en compte tous les mécanismes qui peuvent induire un échec thérapeutique, aussi bien les mécanismes de résistance aux antibiotiques que les autres facteurs qui induisent la persistance d’une infection.

## Les persisters : toujours présents ou réponse adaptative ?

### I. Définition et historique

L'antibiorésistance croissante a conduit ces dernières années à s'intéresser aux autres phénomènes qui peuvent participer à l'échec thérapeutique et potentiellement favoriser l'émergence de bactéries multi-résistantes. Parmi ces phénomènes, on retrouve la capacité d'une bactérie à rester viable dans l'hôte pendant une longue période donnée, c'est ce qu'on appelle la persistance. Celle-ci peut être due à de nombreux mécanismes comme par exemple la sporulation qui consiste en la formation d'une cellule spécialisée, dormante, résistante à la chaleur et à divers stress, et capable, lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance, de germer pour reformer une bactérie viable (1). Un autre phénomène qui induit une persistance, et qui est l'objet de cette thèse, est la différenciation de cellules quiescentes en « persisters » ou « bactéries persistantes ». Un persister peut être défini comme un variant phénotypique transitoire qui est capable de survivre à une dose létale d'antibiotiques (2). Dans ce contexte, on parle de « tolérance » aux antibiotiques, puisque la bactérie n'est pas génétiquement résistante. Ces phénomènes peuvent être responsables de la récurrence des infections notamment dans le cas des maladies chroniques du fait, par exemple, de la prolongation d'un traitement.

Bien que les persisters aient été mentionnés pour la première fois par Joseph Bigger en 1944 (3), Gladys Hobby avait publié deux ans plus tôt une étude montrant que le traitement de cultures par la pénicilline ne tuait que 99% des bactéries environ, et que la survie des bactéries variait selon les espèces (4).

Joseph Bigger, quant à lui, essayait de montrer que l'usage de la pénicilline à forte dose permettait de stériliser une culture de *Staphylococcus pyogenes*. Lors de ses expériences, il s'est aperçu qu'une sous-population de bactéries était capable de survivre pendant au moins 3 jours à l'action de l'antibiotique.

Les caractéristiques des persisters qu'il a alors mises en évidence sont, pour la plupart, toujours considérées comme vraies. Elles étaient alors au nombre de 6 :

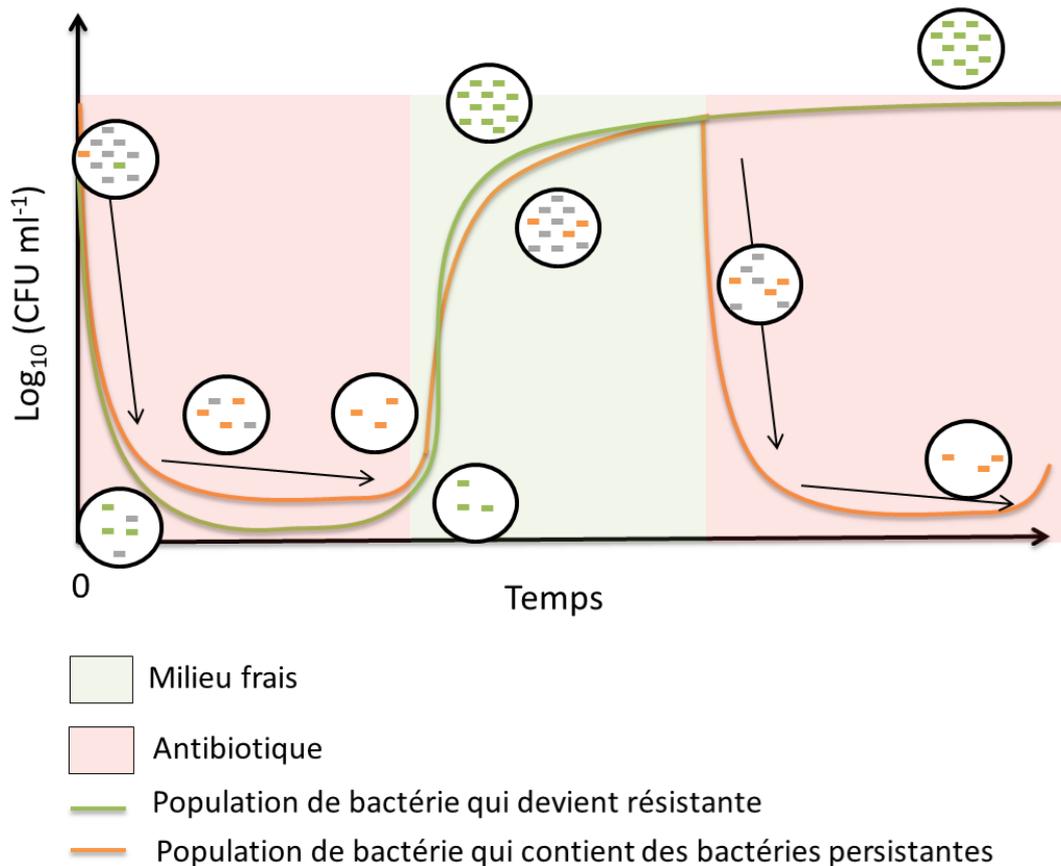
- Il faut que le stress subi par la population bactérienne soit assez important et assez long pour en tuer une proportion importante ;
- La sous-population de persisters est une petite proportion de la population totale et n'est pas constante ;
- Des persisters sont produits du fait des conditions environnementales ;
- Il n'y a aucune preuve qu'ils soient induits par le stress : ils pourraient être présents en permanence ;
- Les persisters ne se multiplient pas ;
- Ils peuvent sortir de leur dormance en 24h et peuvent rester dormants jusqu'à 9h.

Ces observations, bien qu'extrêmement précoces dans l'étude des persisters, semblent toujours être exactes à la lumière des informations plus récentes. En effet, lors d'un traitement antibiotique, la proportion de bactéries diminue drastiquement, mais cette diminution est biphasique : après une diminution importante, il reste toujours des bactéries persistantes et la diminution de la population est beaucoup moins importante, atteignant presque un plateau. Lorsqu'on ajoute du milieu frais, sans antibiotique en revanche, on a une reprise de la croissance qui est réversible en cas d'ajout d'antibiotique (contrairement à ce que l'on peut observer avec des bactéries résistantes) (Figure 1).

La différence entre les bactéries résistantes et les bactéries persistantes est très importante. Une bactérie résistante est un mutant auquel une modification génétique confère une résistance à un antibiotique. Par exemple, les bêta-lactamines sont des antibiotiques qui ciblent la PLP ou "protéine liant les pénicillines". Les PLP sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne) et en se fixant dessus, l'antibiotique empêche leur activité. Cependant, lorsqu'une bactérie possède le gène *mecA*, elle devient résistante aux bêta-lactamines, car le gène *mecA* permet la synthèse d'une nouvelle PLP, la PLP 2a, qui n'est pas ciblée par les bêta-lactamines et qui remplace alors la PLP. La bactérie contenant le gène *mecA* est donc une bactérie résistante. La résistance est

quantifiée par la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) qui est, par définition, plus élevée chez une souche résistante que chez une souche sensible.

Il est néanmoins possible, pour une souche ne portant pas de résistance, de survivre à un traitement antibiotique, on parle alors de tolérance. La tolérance est généralement définie comme la capacité d'une population bactérienne à survivre à un traitement antibiotique, même si celui-ci dépasse la CMI. A l'inverse de la résistance, on ne parle de tolérance que dans le cadre d'un antibiotique bactéricide, puisque toutes les bactéries sont, de fait, tolérantes aux antibiotiques bactériostatiques.



**Figure 1 : Courbe de croissance lors d'un choc antibiotique**

En présence d'un antibiotique, la croissance bactérienne diminue drastiquement montrant ainsi l'efficacité du traitement antibiotique et la sensibilité de la majeure partie de la population bactérienne. La courbe biphasique démontre la présence de bactéries résistantes ou persistantes à l'antibiotique qui, lors de l'ajout de milieu frais, peuvent reprendre leur croissance jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance. Lors d'un nouveau choc antibiotique, on voit alors la différence entre les populations résistantes pour lesquelles le

choc antibiotique n'a pas d'effet sur la mortalité, et les populations contenant simplement des bactéries persistantes qui sont redevenues sensibles lors de l'ajout de milieu frais. Dans les deux cas, la population bactérienne peut survivre au choc antibiotique.

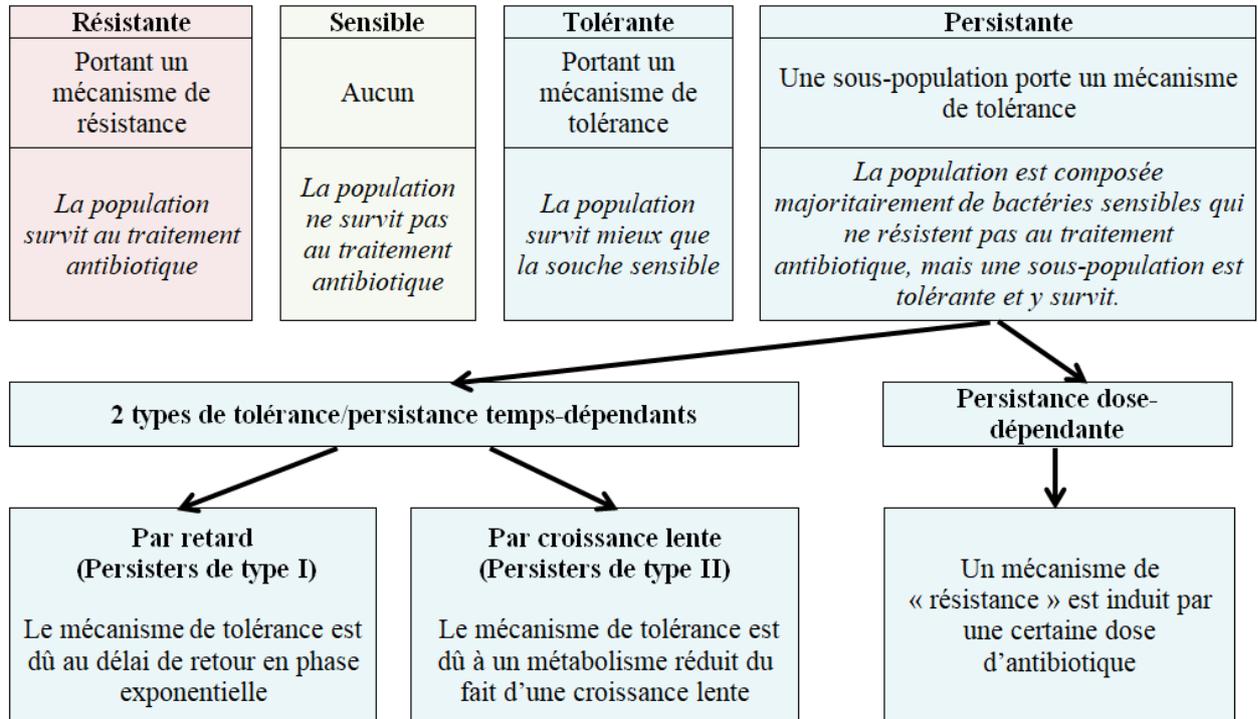
Lorsqu'une sous-population de bactéries est tolérante à une dose élevée d'antibiotiques, on parle de persistance. Cette sous-population, appelée bactéries persistantes (ou persisters cells). Ce cas de tolérance est reconnaissable du fait de sa courbe (Temps/mort) des bactéries biphasique (Figure 1). Une bactérie persistante, possède donc le même patrimoine génétique que les autres bactéries de la culture, mais elle peut tout de même survivre à un traitement de bêta-lactamines si le processus de synthèse de la paroi bactérienne est inactif.

Plusieurs types de tolérances ont été identifiés : ils sont définis comme la tolérance par « croissance lente » et la « tolérance par retard » (5).

- La **tolérance par croissance lente** concerne les bactéries qui se multiplient lentement, il peut s'agir d'une tolérance héritable : par exemple *M. tuberculosis* a un temps de réplication très lent, ce qui la rend tolérante à de nombreux antibiotiques. Il s'agit du type de tolérance le plus connu puisque la plupart des antibiotiques ciblent des mécanismes qui nécessitent une croissance active de la bactérie.
- La **tolérance par retard (ou par « lag »)** concerne une phase pendant laquelle la bactérie ne croît pas. Le temps de retard correspond au temps nécessaire à des bactéries quiescentes (par exemple en cas de carence ou de phase stationnaire prolongée) pour atteindre de nouveau une phase exponentielle (lorsqu'on les inocule dans du milieu frais).

Ces deux types de tolérance ont également été définis dans les sous-populations représentées par les bactéries persistantes : les persisters de type I correspondant à une tolérance par retard et les persisters de type II à une tolérance par croissance lente (6). Il est apparu que ce qui s'applique à l'échelle de la population totale s'applique également aux sous-populations, ce qui s'applique aux bactéries tolérantes s'applique donc aux persisters (Tableau I).

**Tableau I : Les différents profils de réponse d'une population bactérienne à une antibiothérapie : Résistance, Sensibilité, Tolérance et Persistance**



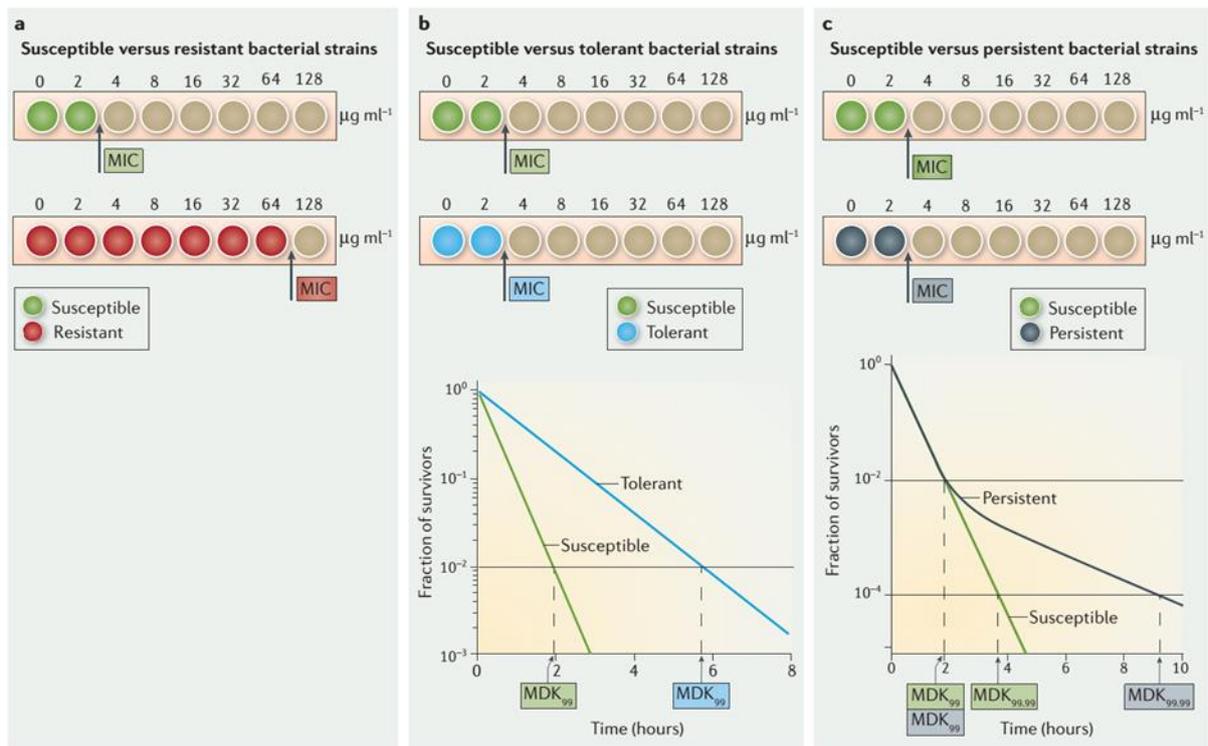
Le vocabulaire autour des « persisters » est relativement confus, en particulier du fait de l'écart entre la vision du clinicien et celle du microbiologiste. En effet, du point de vue du clinicien, on parlera d'infections **persistantes** (qui ne sont pas nécessairement dues à des bactéries persistantes) et de bactéries **quiescentes** (qui désignent généralement les bactéries persistantes). Du point de vue du microbiologiste, il s'agira d'infections **récurrentes** et de bactéries **persistantes** qui sont mécanistiquement partiellement **quiescentes**. C'est une nuance qu'il est importante de saisir car, pour les professionnels de santé, la persistance d'une infection peut être due à de la résistance, tandis que pour les microbiologistes, le terme de persistance est lié aux bactéries persistantes. Ici, nous admettrons que l'adjectif « persistant » appliqué à une infection peut désigner une simple récurrence de l'infection, quelle qu'en soit la source. En revanche, le terme de persistance ou les bactéries persistantes désignent bien le phénomène étudié dans ce manuscrit.

## II. Comment différencier techniquement les persisters ?

Il existe plusieurs approches qui permettent de différencier techniquement les persisters des autres souches. Une approche suggérée pour l'évaluation de la tolérance est la mesure de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes concentrations d'antibiotiques sous la forme de courbes  $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{mL}) = f(\text{temps})$  (Figure 1) démontrant l'efficacité d'un antibiotique (7). Cependant, la variation des méthodes et des interprétations de cette courbe d'un laboratoire à l'autre rend cette approche difficile à exploiter. Une autre mesure de la tolérance peut être donnée par le ratio CMB/CMI, avec CMB correspondant à la concentration minimale bactéricide (8). Cette métrique a montré une haute précision pour la tolérance induite par les antibiotiques, mais la corrélation avec les autres formes de tolérance est faible (9–12).

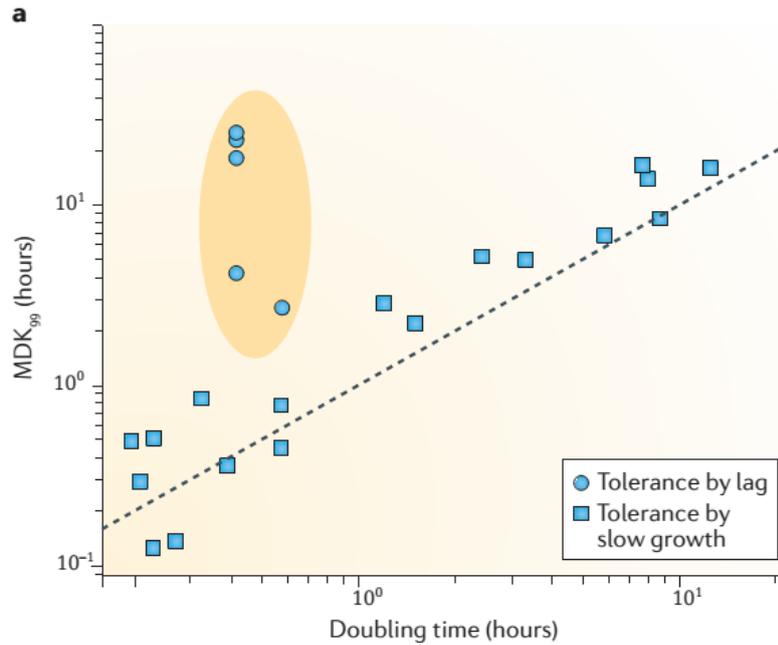
La MDK (Minimum Duration for Killing) est une mesure quantitative de la tolérance qui peut être calculée à partir de courbes démontrant l'effet de l'antibiotique sur la population bactérienne  $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{mL}) = f(\text{temps})$ . Elle est basée sur le fait que les bactéries tolérantes ont besoin d'un temps d'exposition plus long qu'une bactérie sensible pour être tuée (Figure 2). La MDK peut donc être définie comme la durée de traitement antibiotique nécessaire pour tuer une proportion donnée de la population bactérienne (13) à des concentrations supérieures à la CMI. De même que la CMI peut être utilisée pour comparer des niveaux de résistance, la MDK peut permettre de comparer des niveaux de tolérance entre plusieurs souches.

Bien que les bactéries persistantes par retard et par croissance lente aient une MDK plus élevée que celle des souches sensibles, l'évolution de ces MDK diffère d'un point de vue mathématique (Figure 3). On peut également les différencier d'un point de vue technique en comparant les MDK de cultures dont l'inoculum provient de différentes phases (Figure 4). Cette distinction se fait principalement parce que la persistance par croissance lente (type II) apparaît en phase stationnaire tandis que la persistance par retard (type I) est induite par une carence ou un stress.



**Figure 2 : Différences entre la résistance, la tolérance et la persistance bactérienne à un traitement antibiotique.**

Les caractéristiques propres aux populations résistantes, tolérantes ou contenant des bactéries persistantes, provoquent des manifestations de leur réponse aux antibiotiques différentes. Les puits colorés représentent les concentrations auxquelles on retrouve des bactéries croissantes, les puits marron représentent les concentrations auxquelles la croissance est inhibée. a. La CMI (Concentration minimale inhibitrice) d'une souche résistante est significativement plus élevée que celle d'une souche sensible. b. La CMI d'une souche tolérante est similaire à celle de la souche sensible. La MDK<sub>99</sub> (Minimum duration for killing : durée minimale pour tuer 99% des bactéries de la population) d'une souche tolérante est significativement plus élevée que celle de la souche sensible. c. La CMI et la MDK<sub>99</sub> d'une population contenant des bactéries persistantes sont similaires à celles de la souche sensible. La MDK<sub>99,99</sub> de la population contenant des souches persistantes est significativement plus élevée que celle de la souche sauvage. Figure adaptée de (5)



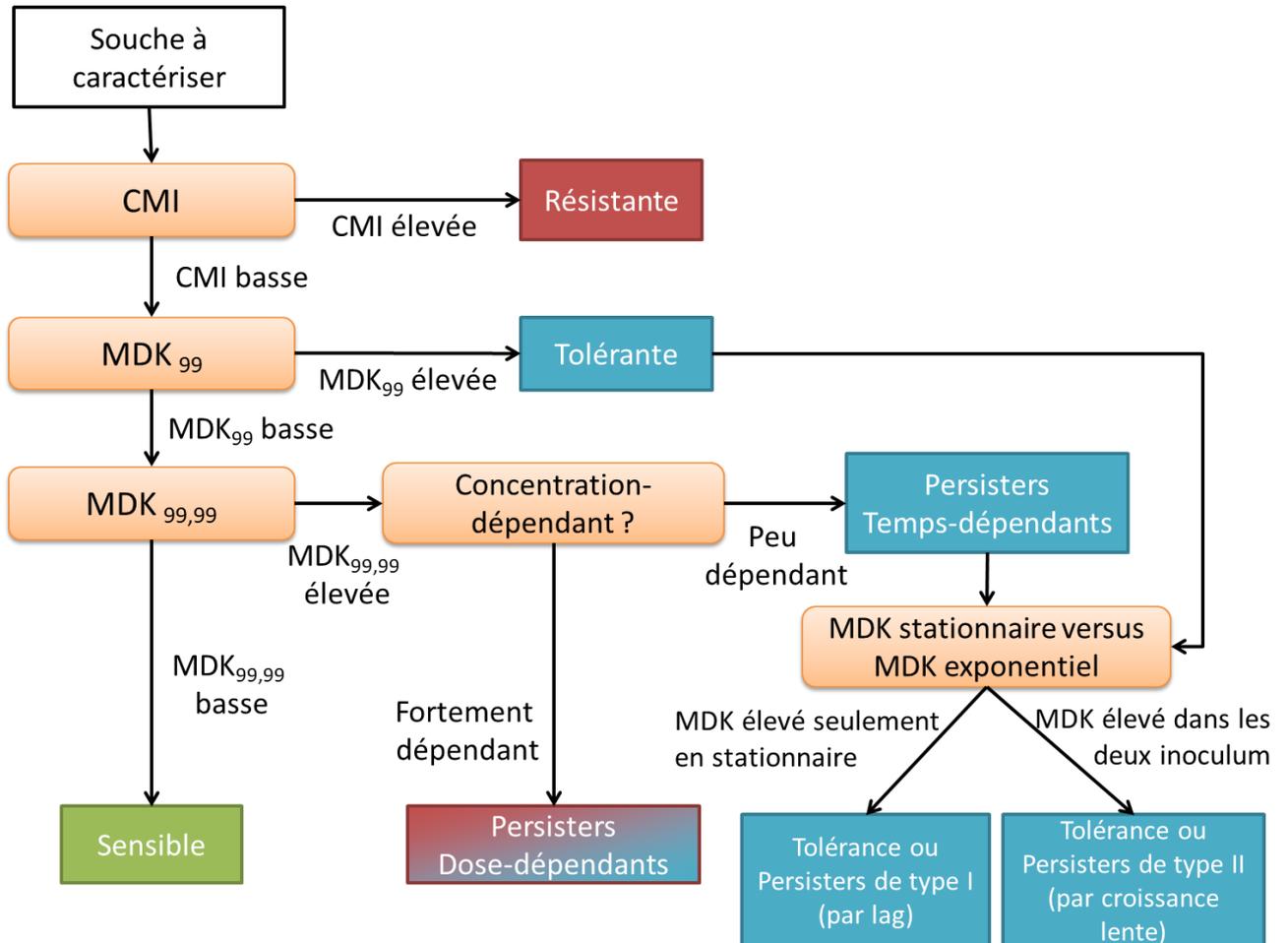
**Figure 3 : La tolérance chez les bactéries en croissance lente et chez les bactéries en phase de retard.**

a. La MDK pour 99% des cellules bactériennes est représentée en fonction du temps de division pour une combinaison de différentes souches, espèces et antibiotiques. Elles ont été extraites de plusieurs courbes temps/mort bactérienne trouvées dans la littérature (11,13–18). Les carrés représentent la tolérance par croissance lente et les ronds, la tolérance par retard. L'aire orange représente la distribution des bactéries qui sont tolérantes par retard. Figure tirée de (5)

Lorsqu'une souche a une CMI et une MDK<sub>99</sub> égales à la souche de référence, on peut établir si la souche est persistante en mesurant la MDK à 99,99% qui est alors significativement plus élevée que celle de la souche de référence (Figure 2).

Pour les souches bactériennes qui ont été identifiées comme étant persistantes, on peut distinguer les persisters temps-dépendants (qui possèdent un mécanisme de tolérance présent chez une sous-population bactérienne) des persisters dose-dépendants (qui possèdent un mécanisme apparenté à un mécanisme de résistance, tels qu'une surexpression de pompe d'efflux, induit par une dose élevée d'antibiotiques). Pour ce faire, il est nécessaire de comparer les MDK<sub>99,99</sub> à des doses différentes afin de voir si elle ont des valeurs élevées à

toutes les concentrations ou pas. Dans le cas de persisters dose-dépendants, la valeur élevée de la MDK n'est pas due à la présence de persisters à croissance lente ou en phase de retard, mais à l'expression transitoire d'un facteur qui permet de survivre à la concentration d'antibiotique utilisée lors de la mesure.



**Figure 4 : Stratégie d'identification de la résistance, la persistance et la sensibilité des souches bactériennes.**

Les persisters dose-dépendants possèdent un facteur généralement attribué à la résistance (par exemple, la surexpression d'une pompe d'efflux) qui se déclenche à une dose donnée d'antibiotique. Les persisters temps-dépendants apparaissent en fonction du temps d'exposition à l'antibiotique. Ils se divisent en deux catégories selon leur présence en phase stationnaire ou s'ils apparaissent en réponse à un stress. Figure adaptée de (5)

Pour différencier les bactéries qui sont persistantes par retard et celles qui sont persistantes par croissance lente, il faut effectuer une comparaison entre une culture bactérienne dont l'inoculum provient de la phase stationnaire et une autre dont l'inoculum provient d'une phase strictement exponentielle (on atteint cette phase en répétant des étapes de dilution en milieu frais suivie d'une reprise de croissance). Pour les souches pour lesquelles la MDK<sub>99</sub> est élevée uniquement lorsque l'inoculum provient de la phase stationnaire, on peut déduire qu'il s'agit d'une tolérance par retard. Si la MDK<sub>99</sub> est élevée pour les deux cultures, alors il s'agit d'une tolérance par croissance lente (Figure 4).

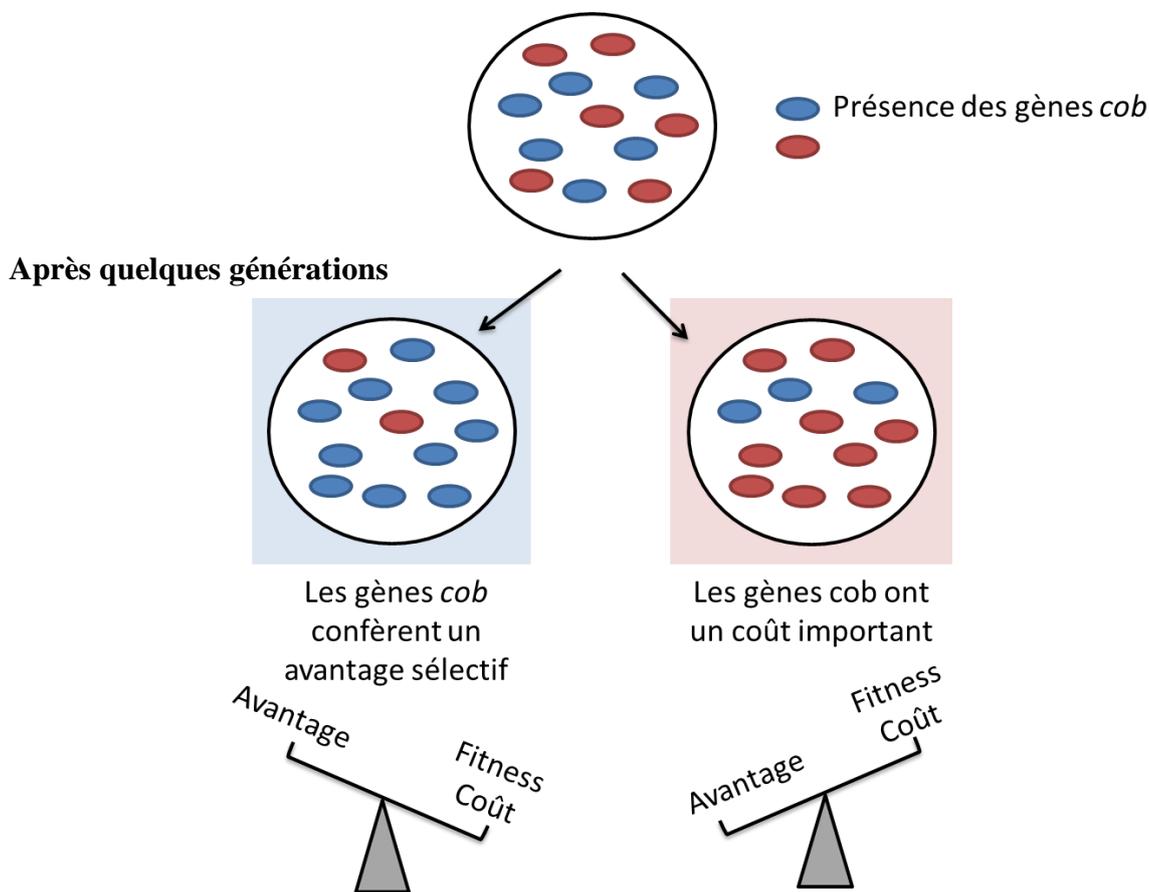
Grace aux avancées en microfluidique, il est également possible d'observer les cellules individuellement plutôt que de dénombrer des populations. Ceci permet d'analyser la croissance des cellules individuelles avant et après leur exposition aux antibiotiques. Le groupe de Balaban fût le premier à utiliser la microfluidique (6) pour examiner par microscopie les bactéries persistantes (19,20). Cette technique est particulièrement intéressante car elle permet de surveiller des cellules individuelles pendant une longue période, ainsi il est possible d'enregistrer le comportement des bactéries persistantes au sein d'une population. Cette technique a permis de démontrer une hétérogénéité préexistante au sein des populations bactériennes (6), de caractériser l'état dormant des cellules dormantes (19) et de suivre la formation de persisters après ajout d'indole (20).

Il est intéressant de noter que, bien qu'il existe des techniques permettant de quantifier l'abondance de persisters, il reste encore aujourd'hui très difficile d'identifier la fréquence de formation et la fréquence de sortie de quiescence des persisters. Ainsi, on ne peut pas exclure que les « facteurs induisant la formation de persisters » soient en réalité des « facteurs inhibant la sortie de quiescence », toutes les études étant menée sur l'abondance de persisters au sein d'une population.

Par ailleurs, une autre limite intrinsèque aux persisters est la difficulté actuelle à faire des analyses protéomiques, transcriptomiques et génétiques sur des bactéries persistantes. Ceci est dû à leur trop faible nombre ce qui complique l'application de ces techniques.

### III. Des bases génétiques héritables

Chez tous les organismes vivants, le support de l'information génétique est l'ADN et c'est le génome qui est responsable des traits phénotypiques observés. Cependant, le génome est large et tous les gènes ne sont pas exprimés, bien que toujours présents. Le génome a la capacité de se remodeler, ainsi donc, des gènes qui seraient « inutiles » à une bactérie auraient tendance à disparaître afin d'améliorer le « fitness » de la bactérie : si le coût d'une fonction ou d'un gène est plus important que son apport, elle confère un désavantage sélectif à la souche qui le porte (Figure 5).



**Figure 5 : Avantage sélectif conféré par la présence ou l'absence d'un gène.**

La conservation d'un gène au sein d'une population dépend d'un équilibre entre son coût énergétique et l'avantage qu'il confère à la bactérie. Par exemple, *Salmonella Typhimurium* possède les gènes *cob* grâce auxquels elle est capable de synthétiser de la cobalamine qui est un cofacteur qui lui permet d'utiliser le propanediol. Dans un milieu contenant du

propanediol, cette capacité à synthétiser la cobalamine confère donc à *S. Typhimurium* un avantage sélectif.

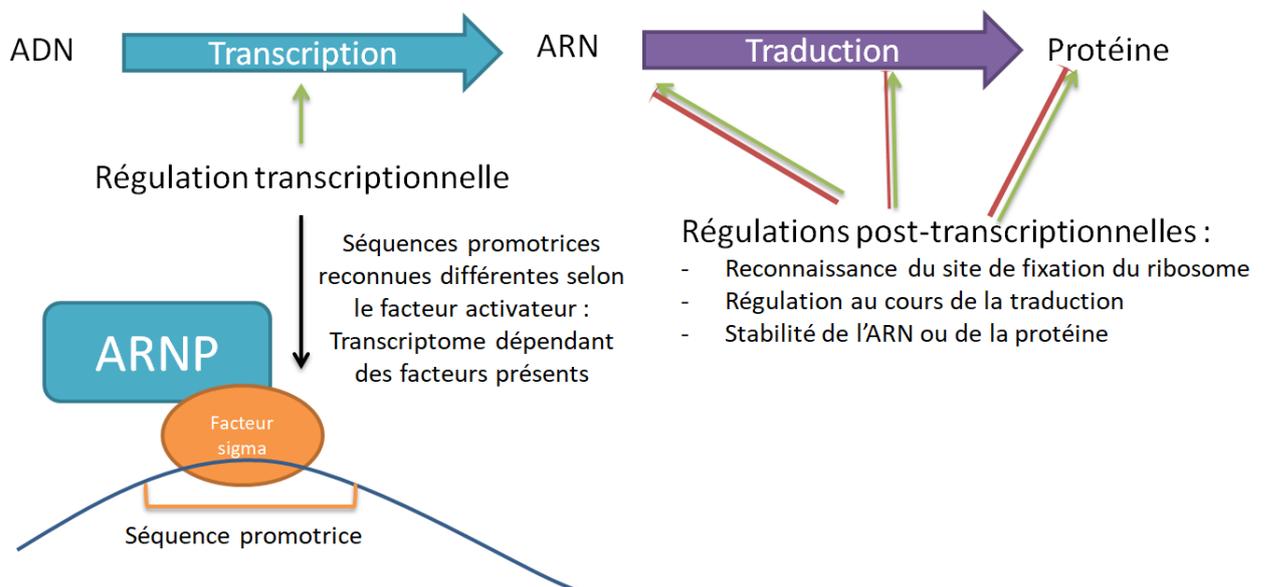
Il faut bien garder en tête que ces modulations du génome se font via un mécanisme de sélection. Un gène qui disparaît du génome d'une bactérie ne disparaît pas à proprement parler de la cellule concernée, mais ses cellules filles pourront ou non posséder le gène. Les cellules filles qui se multiplieront le mieux seront alors celles qui possèdent un avantage sélectif. Si cet avantage sélectif est lié à l'absence d'un gène, alors après quelques générations, on retrouvera principalement au sein de la population des cellules ne portant pas le gène (Figure 5).

Globalement, on peut déduire que la grande majorité des gènes devrait être utile au cours de la vie de la bactérie, bien que tous les gènes ne soient pas utilisés à un moment précis, ou dans une condition donnée. La question qui se pose alors est : par quels mécanismes la bactérie est-elle capable de moduler l'expression de certains gènes en particulier afin de créer des variations phénotypiques ?

Cette régulation se fait notamment au niveau transcriptionnel, et également post transcriptionnel (Figure 6) du fait de facteurs  $\sigma$  alternatifs de l'ARN polymérase. Par exemple, la sous-unité sigma alternative de l'ARN polymérase, RpoS/  $\sigma^S$  est un régulateur majeur de la réponse au stress chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif (21). La protéine  $\sigma^S$  s'associe à l'ARN polymérase cœur ( $\alpha^2\beta\beta'\omega$ ), permettant la reconnaissance des promoteurs et l'initiation de la transcription de gènes appartenant au régulon RpoS et impliqués dans une résistance cellulaire à des stress variés (*i.e.* la réponse générale au stress) (21,22). Des mutants *rpoS* ont, par exemple, une sensibilité accrue à des stress multiples comme une température ou une osmolarité élevée, une acidité du milieu ou un stress oxydatif. A l'inverse du facteur sigma majeur,  $\sigma^{70}$ , qui permet la transcription des gènes de ménage,  $\sigma^S$  n'est exprimé qu'en phase stationnaire de croissance ou en réponse à des stress (21,22). La régulation de l'expression du gène par *rpoS* se fait au niveau de sa transcription, de sa traduction ainsi qu'au niveau de la stabilité de la protéine (21,22). Il existe également de nombreux facteurs de transcription qui sont des protéines qui se fixent sur une séquence spécifique de l'ADN afin de contrôler la vitesse de transcription d'un gène.

Concernant la régulation au niveau post-transcriptionnelle, elle peut se faire sur plusieurs fronts, par exemple, en déstabilisant les ARNm, en masquant la séquence Shine-Dalgarno, la rendant inaccessible aux ribosomes, par régulation de la traduction ou par atteinte de la stabilité de la protéine (Figure 6).

Des études récentes montrent que le contrôle de la persistance bactérienne et leurs mécanismes seraient codés génétiquement (23–26). Une autre hypothèse propose une apparition accidentelle de cellules dont le fonctionnement est altéré (2), mais ce modèle est réfuté par les études de plus en plus nombreuses basées sur les mécanismes moléculaires responsables de la persistance bactérienne.



**Figure 6 : Régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle par l'ARN polymérase et son facteur  $\sigma$  activateur d'une séquence promotrice.**

Lors de la régulation transcriptionnelle, les séquences promotrices reconnues dépendent du facteur  $\sigma$  et des facteurs de transcription mis en jeu. Ainsi, chaque facteur activateur de l'ARN polymérase est responsable de la transcription d'un ensemble de gènes de façon plus ou moins spécifique. Après la transcription, il peut également y avoir des régulations positive ou négative au niveau de la stabilité de l'ARNm, de la reconnaissance de l'ARNm par le ribosome pour la traduction, de la traduction en elle-même ou de la stabilité de la protéine obtenue. Toutes ces régulations induisent un impact direct sur le transcriptome et le protéome de la bactérie.

L'héritabilité génétique de ces mécanismes permettrait également à la fréquence de formation de persisters dans une population de s'adapter à l'incidence de traitements antibiotiques. L'augmentation de l'abondance de persisters dans les isolats cliniques semble être clairement liée à la récurrence de traitements antibiotiques qui pourrait rapidement mener à une population de cellules persistantes plus élevée qu'*in vitro* (13,25,27). Cependant, la formation de persisters peut également avoir un coût, auquel cas des populations à niveaux de persistance diminués peuvent être sélectionnés en l'absence de traitement antibiotique, bien que dans des conditions *in vitro*, cette évolution semble être relativement longue (27–29).

*In vivo*, il semblerait que la fréquence de persisters au sein d'une population soit très variable d'une espèce et d'une souche à l'autre (2,13,28,30,31).

Par ailleurs, parmi les gènes impliqués dans la persistance, il s'est avéré que le degré d'implication de chaque gène dans la persistance aux antibiotiques pouvait varier de façon significative. Une étude a noté ce degré d'implication dans la persistance (32) chez 21 gènes de *Escherichia coli* (Tableau II).

#### Tableau II : Gènes impliqués dans la persistance d'*E. coli*.

Les scores sont calculés en fonction de la survie de chaque mutant lors de son exposition à un antibiotique. Une survie donne 1 point, et le total des points correspond à la somme des survies d'une souche en présence de plusieurs antibiotiques différents (Tableau adapté de Wu et al. 2015).

| Gènes mutés impliqués dans la persistance | Voie concernée                            | Fonction  | Score |
|---|---|---|-------|
| <i>oxyR</i>                               | Défense contre les chocs antioxydants     | <b>Senseur du peroxyde d'hydrogène</b><br>Active l'expression d'un régulon de gènes induits par le peroxyde d'hydrogène | 10    |
| <i>dnaK</i>                               | Régulateur global<br>Dégradation de l'ARN | <b>Protéine chaperonne</b><br>Joue un rôle dans la réplication de l'ADN chromosomique                                   | 9     |

|             |   |   |   |
|-------------|---|---|---|
| <i>sucB</i> | <b>Production d'énergie</b><br>Dégradation de la Lysine/cycle du citrate/métabolisme du carbone | Catalyse la conversion de 2-oxoglutarate en succinyl-CoA et CO <sub>2</sub>   | 8 |
| <i>relA</i> | <b>Réponse stingente</b><br>Métabolisme de la purine  | Catalyse la formation de pppGpp et l'hydrolyse du ppGpp   | 8 |
| <i>rpoS</i> | <b>Régulateur global</b>  | Facteur d'initiation $\sigma$ qui promeut la fixation de la RNA polymérase à certains sites d'initiation spécifiques    | 7 |
| <i>clpB</i> | <b>Régulateur global</b>  | Protéine chaperonne qui joue un rôle dans la thermotolérance  | 6 |
| <i>mqsR</i> | <b>Module toxine-antitoxine</b>   | Toxine de type II qui joue un rôle important dans la formation de biofilms et dans l'induction de cellules persistantes | 6 |
| <i>recA</i> | <b>Réponse SOS</b><br>Recombinaison homologue   | Catalyse l'hydrolyse de l'ATP en présence d'ADN simple-brin   | 6 |
| <i>lon</i>  | <b>Module toxine-antitoxine/protéase</b>  | Protéase sérine ATP-dépendante qui médie la dégradation de protéines anormales  | 5 |
| <i>phoU</i> | <b>Régulateur global</b>  | Appartient au régulon Pho qui joue un rôle important dans l'homéostasie du phosphate                                    | 4 |
| <i>smpB</i> | <b>Traduction</b>   | Protéine importante dans le processus de « rescue » des ribosomes inactifs  | 4 |
| <i>glpD</i> | <b>Production d'énergie</b><br>Métabolisme du glycérophospholipide                              | Conversion du glycérol 3-phosphate en dihydroxyacétone.   | 4 |
| <i>relE</i> | <b>Module toxine-antitoxine</b>   | Toxine de type II qui inhibe la traduction lors de la réponse stringente  | 4 |

|              |  |  |   |
|--------------|--|--|---|
| <i>ssrA</i>  | <b>Traduction</b>  | Protéine important dans le processus de « rescue » des ribosomes inactifs                                | 3 |
| <i>uvrA</i>  | <b>Réponse SOS</b><br>Nucléotide excision repair           | Protéine appartenant au système de réparation UvrABC qui catalyse la reconnaissance des lésions de l'ADN | 3 |
| <i>tisAB</i> | <b>Module toxine-antitoxine</b>                            | Module Toxine-antitoxine de type I impliqué dans la persistance  | 3 |
| <i>tnaA</i>  | <b>Voie de signalisation</b><br>Métabolisme du tryptophane | Catalyse du tryptophane  | 1 |
| <i>umuD</i>  | <b>Réponse SOS</b>   | Protéine impliquée dans la mutagénèse  | 1 |
| <i>hipA</i>  | <b>Module toxine-antitoxine</b>                            | Toxine de type II impliqué dans la persistance   | 1 |

Les mécanismes qui permettent la formation de bactéries persistantes ont donc des bases génétiques et donc héréditaires, et on a vu que la formation de persisters pouvait être influencée par des facteurs extérieurs. Plusieurs questions se posent alors :

- Est-ce que la sous-population de persisters est toujours présente ou est induite par le stress ?
- Si elle est toujours présente, qu'est ce qui provoque la sortie de la dormance ?
- Est-ce que chaque bactérie d'une population passe une partie de sa vie en dormance indépendamment du stress ?

Pour répondre aux deux premières questions, il apparaîtrait que la formation de bactéries persistantes est menée par la combinaison de mécanismes stochastiques et de réponses à des facteurs intrinsèques ou extrinsèques qui permettent aux populations de répondre lorsque des situations nuisibles sont précédées d'un signal de stress (33). La formation stochastique de persisters est considérée comme une stratégie évolutive qui consisterait à maintenir au sein d'une population une hétérogénéité phénotypique permettant

de maximiser le fitness global de la population dans des environnements changeants (34,35). Ceci implique que certaines bactéries persistantes étaient déjà présentes avant l'apparition d'un traitement antibiotique.

Des observations directes de cellules seules par microfluidique et cytométrie de flux montrent que les cellules qui survivent à un traitement antibiotique étaient largement présentes avant ce traitement dans la sous-population dormante de *E.coli* en phase de croissance (6,36–38). De plus, une bactérie peut répondre aux conditions environnementales en modifiant quantitativement et qualitativement la fréquence de différenciation en cellules persistantes (53). Par exemple, l'apparition d'un stress à un niveau sous-létal semble augmenter la fréquence de formation de persisters (39–41).

#### IV. Une tolérance à large spectre

Les bactéries persistantes sont reconnues pour avoir une tolérance à large spectre, c'est-à-dire qu'elles sont tolérantes à des antibiotiques bactéricides de classes mécanistiques différentes (Tableau III). Il a été montré que chaque bactérie persistante n'était probablement pas si largement tolérante, mais qu'une population de bactéries persistantes est composée de plusieurs sous-populations ayant des spectres de tolérances variés (42).

**Tableau III : Résumé des classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action**

|   |                        |                 |
|---|------------------------|-----------------|
| <b>Inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes</b> | <b>Bêta-lactamines</b> | Pénicillines    |
|   |                        | Carbapénèmes    |
|   |                        | Monobactame     |
|   |                        | Céphalosporines |
|   | <b>Fosfomycine</b>     |                 |
|   | <b>Glycopeptides</b>   |                 |
|   | <b>Lipopeptide</b>     |                 |
|   | <b>Polymyxines</b>     |                 |

|   |                                 |                            |
|---|---------------------------------|----------------------------|
| <b>Inhibiteurs de la synthèse des protéines</b>         | <b>Aminosides</b>               |                            |
|   | <b>Macrolides et apparentés</b> | Macrolides vrais           |
|   |                                 | Lincosamides               |
|   |                                 | Kétolides                  |
|   |                                 | Synergistines              |
|   | <b>Phénicolés</b>               |                            |
|   | <b>Cyclines</b>                 |                            |
|   | <b>Acides fusidiques</b>        |                            |
| <b>Oxazolidinones</b>                                   |                                 |                            |
| <b>Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques</b> | <b>Quinolones</b>               | Quinolones 1ere génération |
|   |                                 | Fluoroquinolones           |
|   | <b>Quinoléines</b>              |                            |
|   | <b>Mupirocine</b>               |                            |
|   | <b>Autres</b>                   | Rifamycine                 |
| <b>Inhibiteurs de la synthèse d'acides foliques</b>     | <b>Sulfamides</b>               |                            |
| <b>Lésions de l'ADN</b>                                 | <b>Dérivés nitrés</b>           | Nitrofuranes               |
|   |                                 | Nitro-imidazoles           |

### A. Aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides qui interfèrent avec la traduction ribosomale. L'entrée de cet antibiotique se fait par voie active grâce à la force protomotrice au niveau de la membrane. L'hibernation du ribosome ou la formation de dimères inactifs affecte donc l'activité bactéricide des aminoglycosides en inhibant la traduction, d'une part, et en réduisant la force protomotrice permettant l'entrée de l'antibiotique, d'autre part. Les facteurs de modulation de l'activité ribosomale qui permettent

son hibernation sont retrouvés en grande quantité chez les *E. coli* persistantes ainsi que dans le biofilm (43).

## B. Floroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre, qui sont actives chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Elles agissent par formation d'un complexe ternaire entre l'ADN gyrase, l'ADN ou les topoisomérases IV. Ces enzymes sont directement impliquées dans le surenroulement et dans le désenroulement de l'ADN au cours de la réplication afin de faciliter l'action de l'ADN polymérase. Les fluoroquinolones ont donc un effet bactéricide du fait de la déstabilisation du processus de réplication qui endommage l'ADN. Dans les bactéries fluoroquinolone-persistantes qui sont en état de dormance, la réplication est limitée, ainsi l'atteinte de l'ADN gyrase par les fluoroquinolones n'a pas d'effet bactéricide.

L'ofloxacine est une fluoroquinolone qui se fixe spécifiquement à l'ADN gyrase et permet son activité endonucléasique, mais inhibe sa capacité à faire la ligation des brins, ce qui mène à des cassures de l'ADN (44).

Etant donné le modèle actuel de la persistance, dans lequel la tolérance est atteinte aussitôt que la cible de l'antibiotique est inactive, les bactéries persistantes à l'ofloxacine doivent avoir une activité ADN gyrase réduite, ce qui limite la corruption par la fluoroquinolone, les dommages subis par l'ADN, et puis finalement la mort cellulaire (45,46).

## C. Bêta-lactamines

Les bêta-lactamines présentent une analogie structurale dans l'espace avec le dipeptide du précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ils agissent par inhibition compétitive du précurseur de biosynthèse au niveau de la transpeptidase PLP ce qui corrompt l'intégrité de la paroi et induit un choc osmotique, en particulier chez les cellules en cours de croissance.

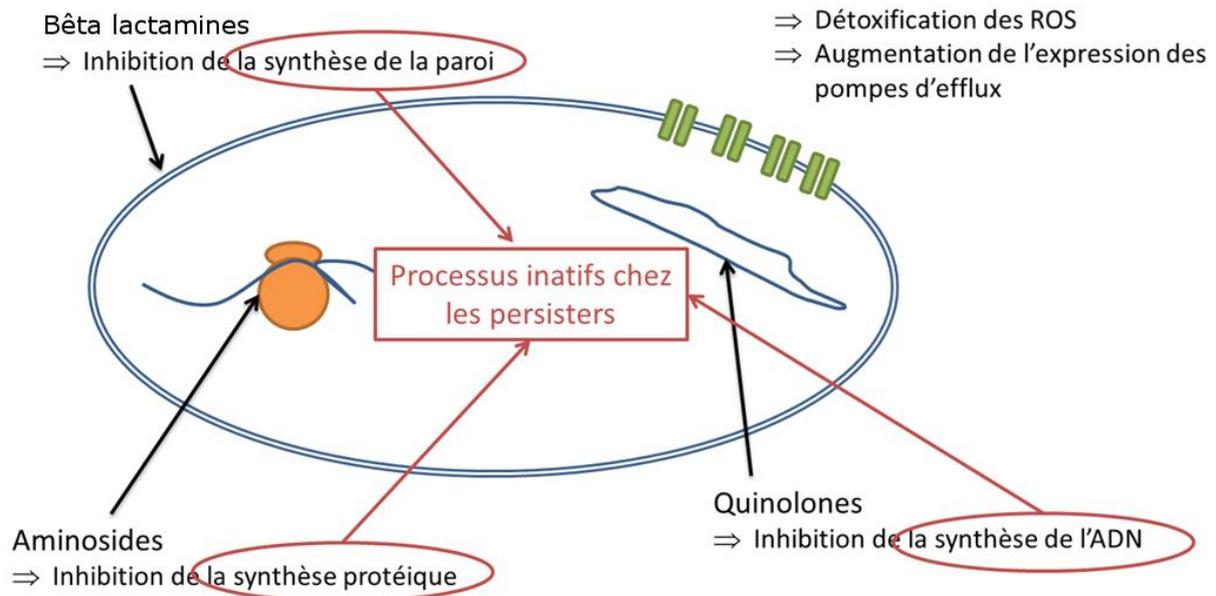
Les cellules persistantes peuvent survivre aux bêta-lactamines puisqu'elles ne se répliquent pas mais des études récentes ont élucidé un mécanisme menant à la formation de persisters tolérants à l'ampicilline. Ce mécanisme impliquerait une augmentation progressive de l'abondance en alarmone (p)ppGpp pour diminuer la synthèse de peptidoglycane (26).

#### D. Pompes d'efflux

Une étude récente a montré que les *E.coli* persistantes avaient une abondance accrue de pompes d'efflux par rapport au reste de la population issue de la même souche. Cette abondance pourrait contribuer à la tolérance contre les antibiotiques en diminuant la concentration cellulaire (47). L'induction de ces pompes d'efflux a également montré une tolérance accrue dans le contexte de l'infection de cellules hôtes pour les mycobactéries (48).

Les bactéries persistantes qui sont tolérantes par surexpression de la pompe d'efflux sont généralement qualifiées de persisters dose-dépendants (5). Ils sont techniquement différenciables des persisters qui sont tolérants *via* un autre mécanisme du fait de leur induction dose-dépendante. Il est intéressant de noter que ces bactéries présentent un cas particulier car les gènes d'induction de la surexpression de pompes d'efflux sont généralement associés à un mécanisme de résistance, et non de persistance. Ceci est peut-être dû à la méconnaissance du phénomène de persistance lors de la découverte de ces gènes.

Au-delà de la tolérance aux antibiotiques (Figure 7), les persisters sont aussi décrits comme des catalyseurs de l'émergence de résistances génétiques car plusieurs signaux de signalisation impliqués dans la formation de persisters sont connus pour augmenter le taux de mutations et activer les éléments génétiques mobiles (49,50).



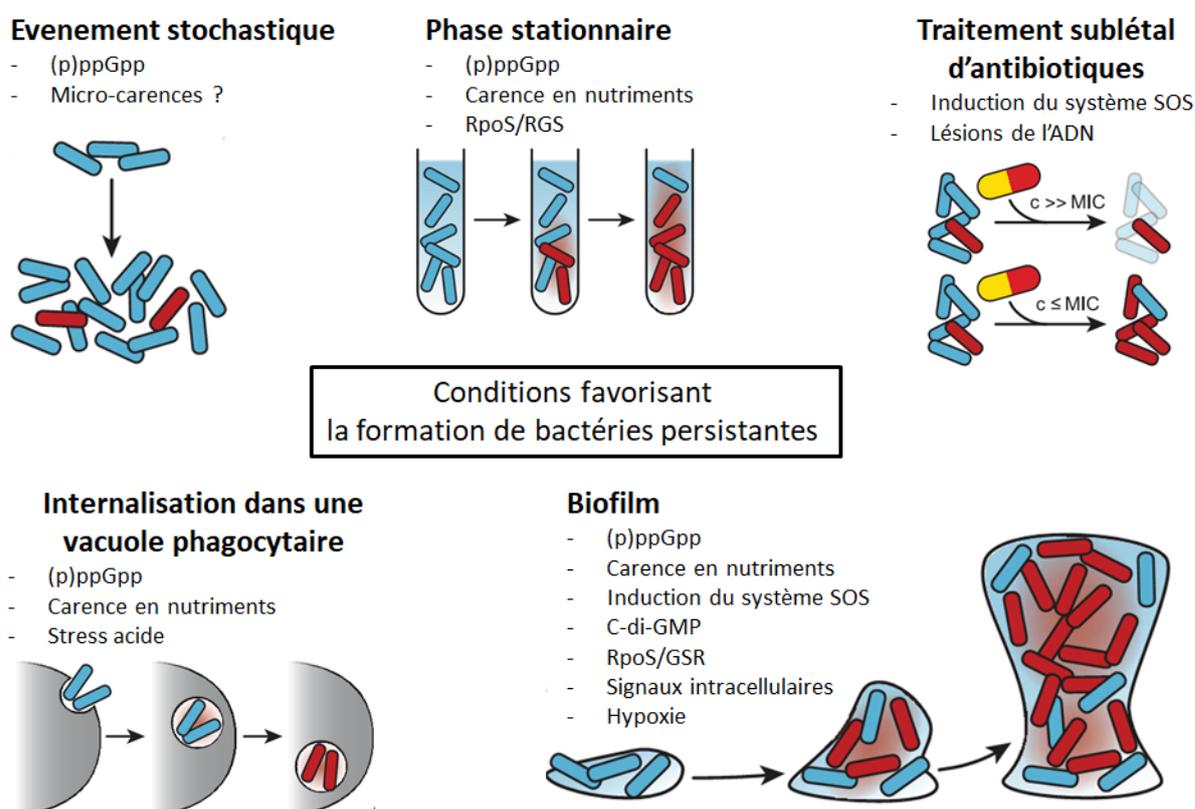
**Figure 7 : Résumé des mécanismes qui induisent une tolérance à large spectre.**

Trois classes d'antibiotiques sont d'emblée inactives chez les bactéries persistantes chez lesquelles les mécanismes ciblés sont éteints. D'autre part, la mise en place de processus de détoxification des ROS et l'augmentation du nombre de pompes d'efflux permettent une tolérance accrue à d'autres classes d'antibiotiques ainsi qu'à d'autres types de stress tels que le stress oxydant.

## L'entrée des bactéries en état de persistance

### I. Mécanismes moléculaires et voies métaboliques impliqués dans la formation de bactéries persistantes

Au cours de l'étude des bactéries persistantes, plusieurs conditions ont semblé avoir un impact sur l'abondance de bactéries persistantes. A présent, les recherches se focalisent sur les mécanismes sous-jacents de cet impact afin de mieux comprendre les voies de régulations de la formation de bactéries persistantes et leurs réels effecteurs (Figure 8).



**Figure 8 : Conditions environnementales et signaux cellulaires favorisant la formation de persisters.**

Les signaux cellulaires indiqués correspondent aux conditions rencontrées dans ces circonstances environnementales mais ne sont pas nécessairement des facteurs d'induction des persisters (Figure adaptée de (51)).

## A. La réponse stringente et (p)ppGpp

Les bactéries sont capables de réguler un certain nombre de processus afin de s'adapter à des stress rencontrés dans l'environnement. Parmi les mécanismes impliqués, on retrouve la formation de bactéries persistantes mais également de cellules qui sont dans un état appelé « viable mais non cultivable » (VNC).

Lorsque le stress rencontré correspond à une carence en nutriments, le remodelage de la physiologie cellulaire est ce que l'on appelle la réponse stringente, elle est ubiquitaire chez les bactéries. Au cours de cette réponse, la synthèse de protéines et d'acides nucléiques diminue, et la synthèse d'acides aminés et la dégradation protéique sont augmentées. Les effecteurs de la réponse stringente sont deux molécules signal : les nucléotides guanosine penta- et tétraphosphate, regroupés sous l'abréviation (p)ppGpp (52). Lors de carences, ils sont synthétisés à partir de GTP et de GDP, l'ATP agissant comme un donneur de phosphate. L'enzyme ubiquitaire RelA est responsable de la réponse stringente et catalyse la formation de (p)ppGpp et l'hydrolyse du ppGpp. En cas de carence, les alarmes (p)ppGpp sont synthétisées et modifient la transcription globale : d'une part, en inhibant la transcription d'ARN stables, stoppant ainsi la croissance, d'autre part, en activant des gènes nécessaires à la survie.

La voie du (p)ppGpp peut être activée de façon stochastique dans les cellules en phase exponentielle (36) et par des conditions environnementales qui vont stimuler la production de l'alarme (par exemple, la phase stationnaire ou dans le cadre d'une formation de biofilms). Cette activation peut déclencher la différenciation de cellules en bactéries persistantes.

*Pseudomonas aeruginosa* répond activement à une carence en nutriments via des mécanismes impliquant (p)ppGpp. Ces mécanismes semblent augmenter la tolérance aux antibiotiques de la population (53).

Le stress métabolique peut également mener à divers scénarii dans lesquels (p)ppGpp et l'hydrolase SpoT influencent la formation de persisters (54). Des niveaux faibles de SpoT augmentent également l'abondance de (p)ppGpp qui est associée à l'inhibition de l'ADN gyrase et la réduction de l'activité de l'ARN polymérase.

Chez *Staphylococcus aureus*, un rôle similaire de (p)ppGpp a été démontré puisque sa synthèse mène à une inhibition de la croissance et de la virulence, ce qui semble faciliter les infections persistantes (55). De plus, chez *E.coli*, la protéine CspD est exprimée pendant la phase stationnaire (pendant laquelle le nombre de persisters est augmenté) et l'induction de cette expression se fait en cas de carence en glucose est liée à (p)ppGpp (56). Le manque de nutriments mène à une inhibition CspD-dépendante de la réplication de l'ADN qui mènerait à une formation accrue de la formation de persisters (57). D'autre part, un autre second messenger, l'AMP cyclique a également un rôle dans le métabolisme de CspD. L'abondance cellulaire de l'AMPc dépend de la présence de nutriments, et augmente la transcription de *cspD* en complexe avec le récepteur Crp (58). Le complexe AmpC-Crp active alors l'expression de *relA*, ce qui résulte d'une augmentation de l'abondance intracellulaire de (p)ppGpp (59).

La capacité d'une cellule à se différencier en bactérie persistante découle de voies métaboliques précises. Des études effectuées sur des souches en situation de carence montrent que (p)ppGpp a des effets pléiotropes directs et indirects (Tableau IV) et le (p)ppGpp semble être un médiateur important dans le lien entre la formation de persisters et la régulation du métabolisme.

**Tableau IV : Le régulon de (p)ppGpp** (d'après Cashel et al., 1996 et Zhou et Jin, 1998).

Ce tableau représente l'ensemble des gènes et fonctions régulés par (p)ppGpp, ainsi que le type de régulation exercé.

| Régulation négative par (p)ppGpp   | Fonction cellulaire                     | Régulation positive par (p)ppGpp   |
|--|---|--|
| Transcription des opérons d'ARNr<br>Expression des protéines ribosomiques<br>Transcription des ARNt<br>Expression des facteurs d'élongation EF-Tu, EF-Ts, EF-G   | <b>Traduction</b>                       |  |
| Expression de RpoD   | <b>Transcription</b>                    | Expression de RpoS<br>Activité de RpoS, RpoN, RpoH   |
| Expression de l'adenylosuccinate synthétase<br>Expression de l'IMP déshydrogénase<br>Expression de l'aspartate transcarbamylase<br>Biosynthèse de pyrimidine   | <b>Métabolisme des nucléotides</b>      | Expression de la thymidine phosphorylase<br>Expression de l'uridine phosphorylase  |
|  | <b>Métabolisme des acides aminés</b>    | Biosynthèse de l'arginine<br>Biosynthèse de la glutamine et du glutamate<br>Biosynthèse de l'histidine<br>Biosynthèse de l'isoleucine et de la valine<br>Biosynthèse de la lysine<br>Biosynthèse de la méthionine et de la thréonine |
| Expression de Fis  | <b>Protéines associées au nucléoïde</b> | Expression de la sous-unité $\alpha$ de IHF  |
| Transport de l' $\alpha$ -méthyl-glucoside<br>Expression de la guanine phosphoribosyltransférase<br>Expression de l'adénine phosphoribosyltransférase<br>Expression de l'uracile phosphoribosyltransférase | <b>Transport</b>                        | Transport des acides aminés branchés   |
|  | <b>Métabolisme des carbohydrates</b>    | Expression de la $\beta$ -galactosidase<br>Synthèse de glycogène   |
| Synthèse de phospholipides<br>Synthèse de peptidoglycane   | <b>Métabolisme de l'enveloppe</b>       |  |
| Synthèse de DnaA   | <b>Réplication de l'ADN</b>             |  |

## B. RpoS et la réponse générale au stress

Les cultures en phase stationnaire peuvent contenir  $10^3$  à  $10^4$  fois plus de bactéries persistantes que les cultures en phase exponentielle (11,36,40,60,61). On peut penser que c'est le fait de voies régulées par le facteur de stress RpoS / $\sigma^S$ , présent en grande quantité lors de cette phase. Ce facteur de stress est en grande partie responsable de l'adaptation générale au stress via un remodelage de la transcription du génome et de la physiologie cellulaire (74).

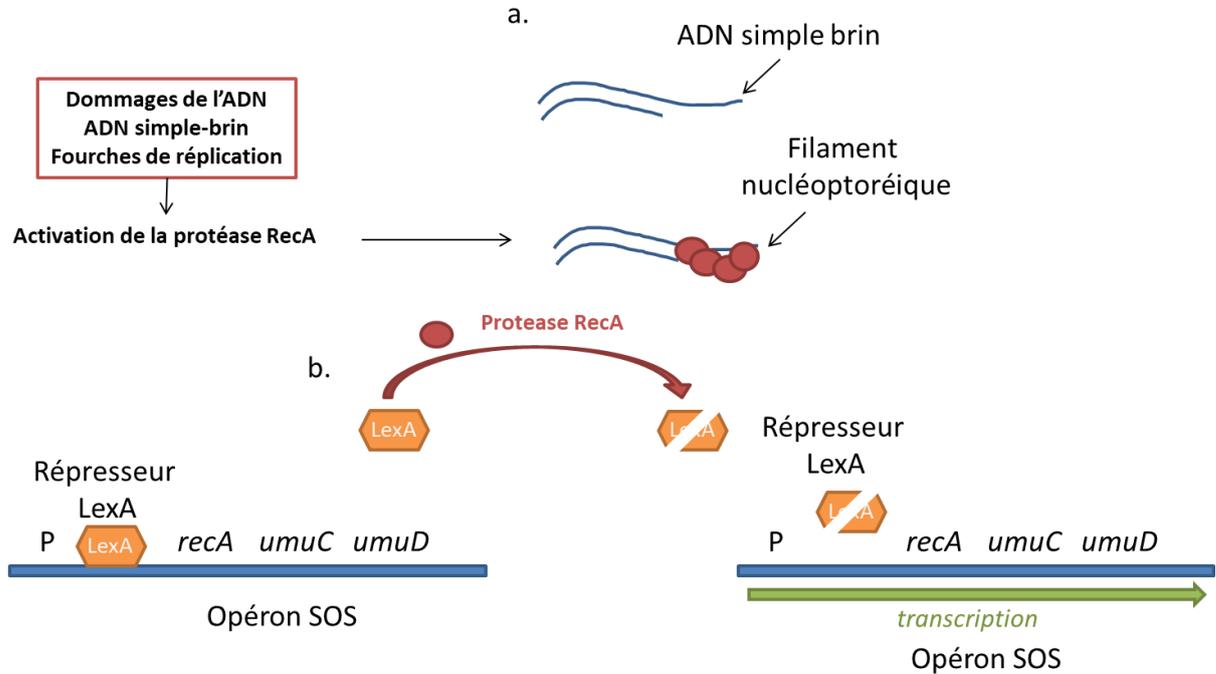
Chez *E. coli*, la réponse générale au stress peut être induite en phase stationnaire via des carences en nutriments, un choc thermique, la formation de biofilm, une forte variation du pH, le stress oxydatif (70). Au-delà de sa réponse au stress, RpoS est également un facteur de la différenciation de cellules quiescentes en persisters. RpoS contrôle pendant un quart du génome et ce via des régulations à la fois positives et négatives (62,63), les phénotypes des mutants délétés pour *rpoS* sont donc très pléiotropes et varient énormément en fonction des conditions expérimentales et des milieux utilisés (32,39,64–66).

## C. La réponse SOS

Le régulon "SOS" comprend des gènes impliqués dans la réparation d'ADN et est induit en réponse à des lésions de l'ADN du fait de dysfonctionnements de la machinerie ou de la variation des conditions de répllication. Cette réponse SOS induit la protéine RecA qui va permettre la transcription de l'opéron SOS en clivant le répresseur LexA (Figure 9). RecA est également capable de se fixer au niveau des brèches de l'ADN et d'amorcer l'échange de brins. Les protéines UmuC et UmuD permettent à la polymérase III de franchir les obstacles dus aux lésions et de réparer le brin d'ADN.

Le rôle de la réponse SOS dans la formation de bactéries persistantes est double : c'est une voie de stress complémentaire qui module la formation de persisters, puis qui module les mécanismes de leur sortie de quiescence. Il a été montré que le nombre de persisters survivants à un traitement par les fluoroquinolones s'effondre chez les mutants dont les gènes *lexA*, *recA* et *recB* sont inactivés et dont la réponse SOS est ainsi altérée (32,40,67,68). En

surexprimant le régulon SOS par manipulation génétique ou par induction avec un traitement antibiotique, on observe une abondance de bactéries persistantes fortement accrue (45).



**Figure 9 : Induction de la réponse SOS par la protéine RecA**

En l'absence de stress, le répresseur LexA est fixé au niveau de la région promotrice du gène du régulon SOS. a. Lors de l'apparition d'un stress qui provoque des dommages au niveau de l'ADN, la protéine RecA est activée et interagit avec l'ADN simple brin pour former un filament nucleo-protéique. b. Ce filament active alors l'autoprotéolyse de LexA, ce qui permet à l'opéron SOS d'être transcrit.

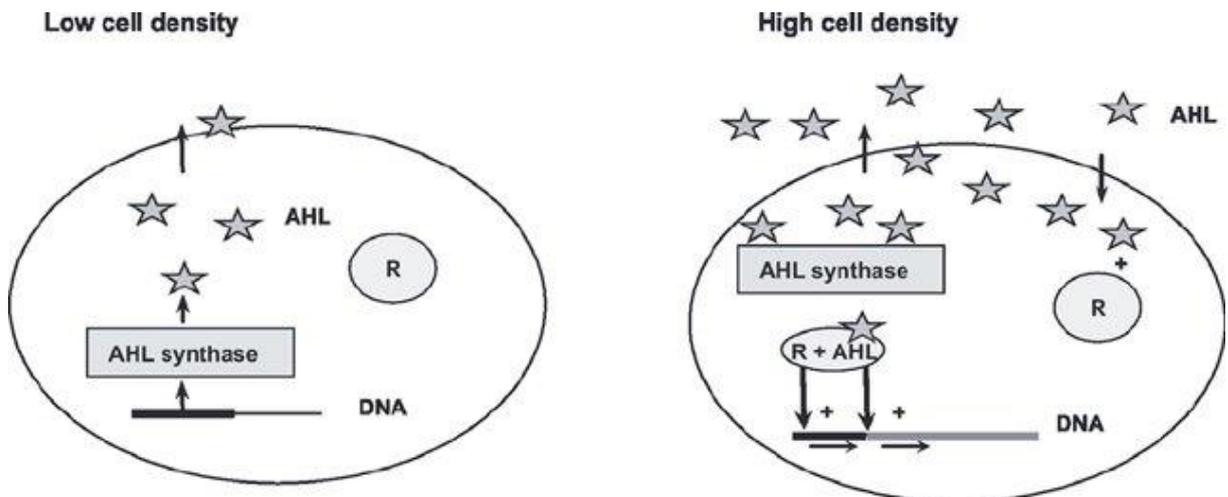
Il a été montré que la délétion de *recA* diminue significativement le nombre de bactéries persistantes dans le cadre de cultures en phase exponentielle traitées à la ciprofloxacine, et que ce nombre est restauré lorsque les cellules sont complémentées avec le gène *recA*. De plus, lors d'un traitement à l'ofloxacine, le gène *recA* est nécessaire à la formation de persisters (67). Etant donné l'impact de la présence et de l'absence du gène *recA* sur le niveau de persistance, ce gène, qui est également le principal acteur de la réponse SOS est considéré comme étant impliqué dans la persistance.

## D. Communication cellulaire ou quorum sensing

Une grande hétérogénéité phénotypique permet à une population bactérienne d'optimiser son « fitness cost » et ses chances de survies en cas de changement environnemental. Dans les cas où cette hétérogénéité est très importante, la communication entre les bactéries d'une même population permet également d'augmenter les chances de survies.

Les communautés bactériennes sont capables de coordonner un certain nombre de mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression coordonnée de certains gènes en particulier, c'est ce qu'on appelle le quorum sensing (QS).

Les bactéries dotées de quorum sensing produisent des signaux cellulaires dits « auto-inducteurs » (Figure 10). La présence de ces auto-inducteurs est détectée par des récepteurs protéiques intracellulaires qui s'y fixent.



**Figure 10 : Mécanisme du quorum sensing AHL chez des bactéries à Gram négatif**

Les bactéries produisent l'autoinducteur AHL, *via* une AHL-synthase. A faible densité de population, les molécules d'AHL sont activement transportées du milieu extérieur vers le cytoplasme par un transporteur ATP-dépendant. A concentration cellulaire élevée, le transport s'effectue par diffusion passive. Lorsque la concentration d'AHL atteint un seuil (Quorum State), les autoinducteurs AHL interagissent avec la protéine régulatrice R, le plus souvent un régulateur transcriptionnel. Le complexe R-AHL se lie au promoteur des gènes cibles et initie leur transcription ainsi couplée à la densité bactérienne. Figure tirée de (69)

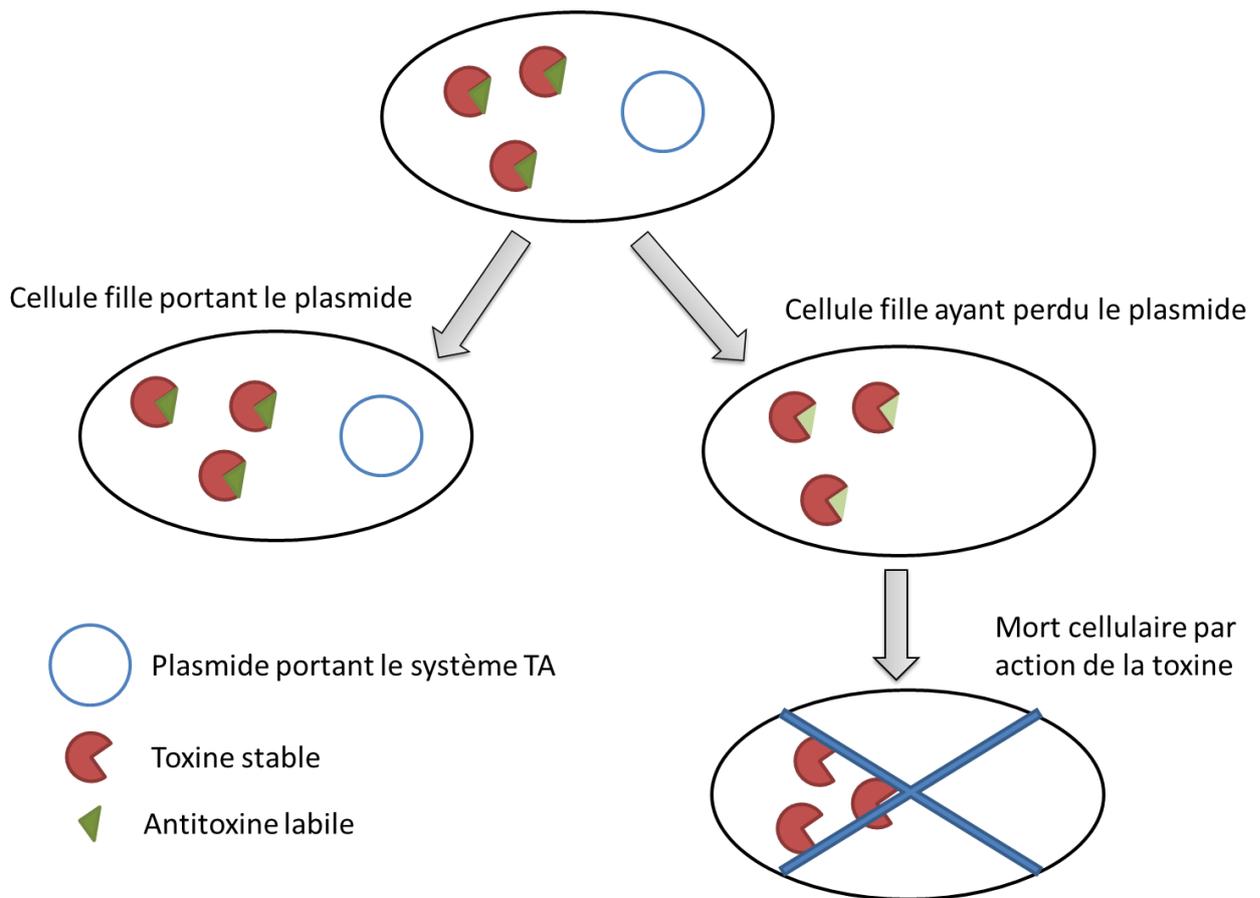
Il a été montré que certains systèmes de quorum sensing avaient un impact sur la formation de bactéries persistantes. C'est le cas de pyocyanine ou de l'acyl-homoserine lactone (AHL) qui semblent induire la formation de persisters chez *P. aeruginosa* (70,71). L'induction de bactéries persistantes par l'AHL chez *E. coli* est probablement due à l'activation par l'AHL du facteur transcriptionnel RpoS (71,72). De même, la molécule d'indole peut moduler la formation de persisters chez *E.coli* même si les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés (8, 82).

Le CSP (competence-stimulating peptide) est un peptide du quorum sensing qui est impliqué dans la réponse aux stress chez *S. mutans*, or les stress environnementaux augmentent également le nombre de persisters, en plus d'induire l'expression de *comC* (gène du CSP). Ainsi, pour montrer l'impact du CSP sur la formation de bactéries persistantes, des chercheurs ont ajouté du CSP synthétique exogène à des cultures de *S. mutans* sauvage et au mutant  $\Delta comC$ , qui ont ensuite été traitées pendant 24h à l'ofloxacine. Les résultats ont montré que le taux de CSP avait considérablement augmenté le nombre de persisters tolérants à l'ofloxacine chez la souche sauvage par rapport à la souche délétée  $\Delta comC$ . Le nombre de persisters chez le mutant  $\Delta comC$  n'a pas changé. Le fait que l'ajout de CSP au mutant  $\Delta comC$  n'aie pas restauré un phénotype sauvage suggère que la production de CSP est contrôlée par une boucle de régulation positive (73).

## II. Les systèmes toxine-antitoxine

Les modules toxine-antitoxines (TA) sont des systèmes de mort « autoprogrammée » généralement composés d'une toxine stable et d'une antitoxine, plus labile, qui neutralise l'action de la toxine. La survie des bactéries dépend d'un équilibre entre les toxines et les antitoxines, ainsi, une surexpression de la toxine pourra induire une stase bactérienne voire la mort cellulaire.

Dans certaines conditions, l'antitoxine labile est dégradée, ce qui favorise l'action de la toxine en inhibant certains processus cellulaires essentiels tels que la traduction, la réplication et la synthèse de la paroi cellulaire. Afin de neutraliser cette toxicité, l'antitoxine doit donc être continuellement synthétisée par la bactérie.



**Figure 11 : Systèmes toxine-antitoxines ou « modules d'addiction ».**

L'antitoxine étant plus labile que la toxine, les cellules filles qui ne possèdent pas le matériel génétique permettant de produire de nouvelles antitoxines vont mourir, tuées par les toxines léguées par la cellule mère.

Ces systèmes toxine-antitoxine (STA) permettent à un élément génétique mobile qui en porte d'être conservé par la cellule. En effet, après la division cellulaire, les cellules filles dépourvues de ces plasmides ne peuvent plus produire d'antitoxine, ainsi la toxine, plus stable, peut entraver un processus essentiel à la survie de la bactérie (11). Ce processus, appelée « mort post-ségrégationnelle » ou PSK (Post-Segregational Killing) (74) favorise le maintien des plasmides dans la population bactérienne et explique l'ancien nom des systèmes toxine-antitoxines : « module d'addiction ». Ces systèmes ont été retrouvés dans les génomes de bactéries, d'archées et de fungi (75), ils semblent donc être conservés, ce qui soulève la question d'un éventuel rôle physiologique.

Il existe 6 types de systèmes toxine-antitoxine dont la classification est basée sur la façon dont l'antitoxine neutralise la toxine. Les systèmes toxine-antitoxine de type I et III regroupent les antitoxines de type ARN tandis que les systèmes de type II, IV et VI regroupent les antitoxines de type protéique.

L'action des toxines passe par la restriction d'un processus cellulaire essentiel, par exemple, la réplication de l'ADN, la traduction ou encore la synthèse du peptidoglycane et l'antitoxine correspondant lève alors cette restriction. L'étude des systèmes toxine-antitoxine montre qu'ils participent également à de nombreux processus dans la bactérie, allant de la réponse au stress à la régulation du métabolisme et de la survie dans des cellules hôtes (29).

## A. Les différents types de systèmes toxine-antitoxine

### 1. Systèmes toxine-antitoxine de type I

Dans les systèmes toxine-antitoxine de type I, l'antitoxine est un ARN complémentaire de la séquence de l'ARNm codant pour la toxine. L'antitoxine et l'ARNm forment alors un complexe par appariement de bases et l'antitoxine peut activer la dégradation de l'ARNm comme simplement inhiber la traduction de l'ARNm de la toxine (Figure 12). La majorité des toxines de types I caractérisées est supposée agir au niveau de la membrane bactérienne (17).

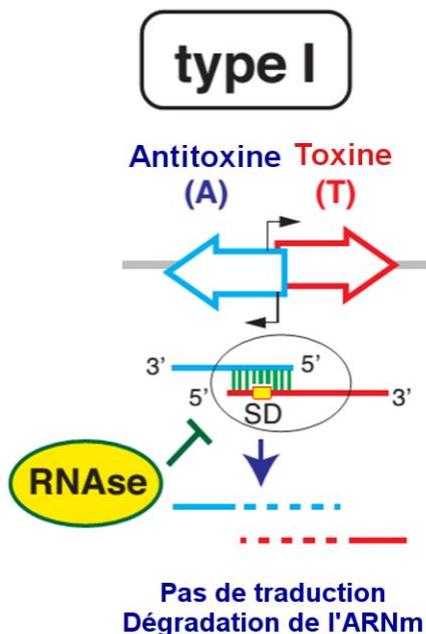


Figure 12 : Système toxine-antitoxine de type I

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine est un ARN antisens qui s'apparie avec l'ARNm codant la toxine. Le duplex est ciblé par des RNases inhibant la traduction de la toxine. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

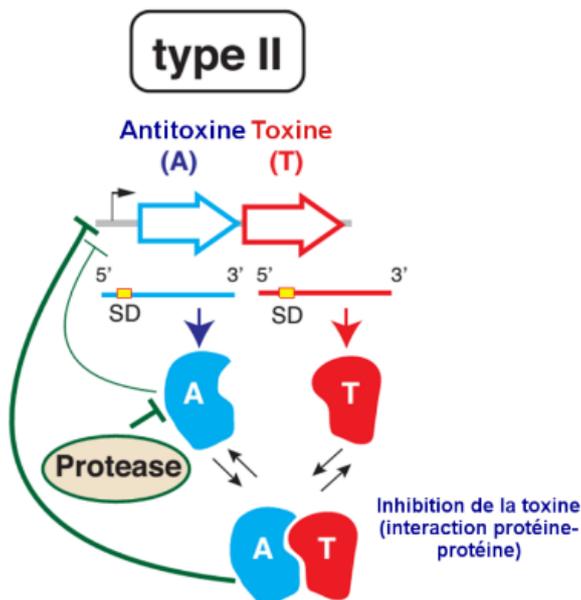
L'expression de plusieurs toxines de type I semble dégrader la membrane cellulaire, ce qui semble indiquer la formation de pores. Cependant, cette activité de formation de pores n'a été vérifiée expérimentalement que pour TisB (76), et très récemment pour HokB (77).

## 2. Système toxine-antitoxine de type II

Les systèmes toxine-antitoxine de type II représentent la classe de système toxine-antitoxine la mieux étudiée. Ils sont composés de deux gènes organisés en opéron : le gène de l'antitoxine précède celui de la toxine et les deux sont transcrits à partir d'un seul et même promoteur localisé en amont du gène de l'antitoxine (Figure 13) (78).

Le plus souvent, la traduction des deux gènes est couplée, c'est-à-dire que les deux gènes sont légèrement chevauchants, ce qui permet à l'antitoxine d'être transcrite et traduite systématiquement avant la synthèse de la toxine (79). L'antitoxine de type II forme un complexe avec la toxine et empêche la toxicité par encombrement stérique des sites actifs de la toxine (80,81).

D'autres antitoxines inhibent l'activité de la toxine en perturbant leur structure, comme l'antitoxine RelB (82), ou en se fixant loin du site actif pour verrouiller la toxine dans une conformation ouverte inactive, comme l'antitoxine HipB (83).



**Figure 13 : Système toxine-antitoxine de type II.**

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine est une protéine qui bloque l'activité de la toxine par une interaction protéine-protéine directe. Dans la plupart des cas, le complexe T-A se fixe au promoteur pour réprimer efficacement la transcription des deux éléments. L'antitoxine seule peut aussi fixer et réprimer son propre promoteur, mais moins efficacement qu'en combinaison avec la toxine. Les niveaux d'antitoxine sont minutieusement contrôlés par les protéases. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

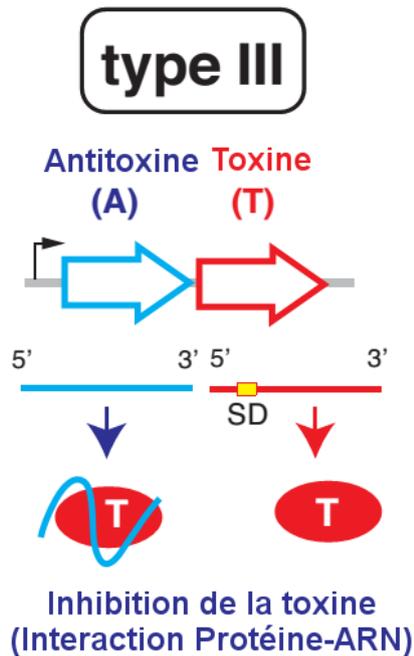
Les antitoxines de type II sont également capables de réprimer la transcription de leur propre opéron en se fixant directement sur le site operateur (Figure 13). Seules, elles n'ont pas un effet régulateur important, mais en présence du complexe toxine-antitoxine, une répression totale de la transcription est observée. La toxine joue alors un rôle de co-répresseur en modifiant la conformation de l'antitoxine qui se fixe plus efficacement à l'ADN en amont de l'opéron (79,84).

Les toxines de type II peuvent être divisées en six groupes en fonction de leur homologie de structure (85). Elles peuvent cibler différentes structures cellulaires et des procédés moléculaires essentiels entravant ainsi les activités cellulaires (86,87). La grande majorité des toxines de type II agissent comme des endoribonucléases qui inhibent la traduction (88) : c'est le cas de la toxine MazF qui clive les ARNm libres de manière séquence spécifique (89). D'autres toxines de type II inhibent la traduction bactérienne. Enfin, les toxines de type II CcdB et ParE agissent par inhibition de la réplication de l'ADN (90,91) et les toxines  $\zeta$  et PezT empêchent la synthèse de la paroi bactérienne (92).

### ***3. Système toxine-antitoxine de type III***

Les STA de type III sont organisés en opérons bicistroniques dans lesquels la toxine et l'antitoxine sont transcrits à partir d'un même promoteur situé en amont du gène de l'antitoxine (Figure 14). L'expression en excès de l'antitoxine est assurée par la présence d'un terminateur transcriptionnel Rho-indépendant localisé entre les deux gènes (93,94).

L'antitoxine est composée d'une succession de séquences répétées, dont une seule en particulier est nécessaire pour réprimer la toxicité de la toxine (85,95,96). La toxine, qui a une activité endoribonucléasique spécifique de cette séquence nucléotidique, clive l'antitoxine en monomères.



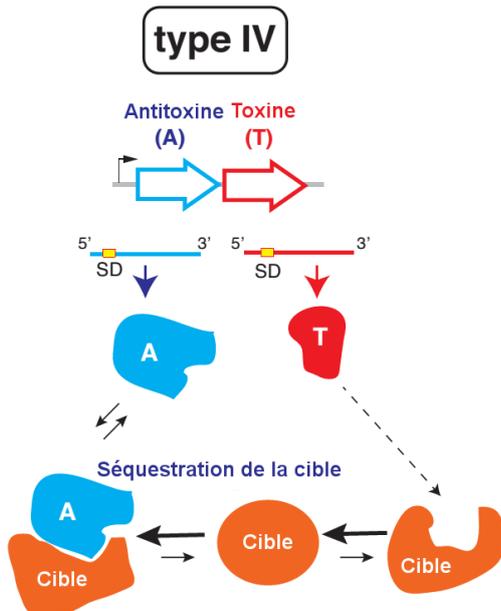
**Figure 14 : Système toxine-antitoxine de type III**

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine est un ARN qui bloque l'activité de la toxine par interaction directe avec la toxine. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Le premier STA de type III découvert est le système *toxN/ToxI*, qui a été trouvé sur le plasmide pECA1039 chez *Pectobacterium atrosepticum* (95). Plus récemment, le système *abiQ/AntiQ* a également été découvert chez *Lactococcus lactis* (96).

#### 4. Système toxine-antitoxine de type IV

Le système toxine-antitoxine de type IV se caractérise par l'action de l'antitoxine de type protéique qui neutralise la toxine par blocage plutôt que par une interaction directe protéine-protéine (Figure 15). L'unique exemple de STA de type IV actuellement mis en évidence est *yeeUV*, qui a été retrouvé chez *E. coli*. L'antitoxine YeeU, renommée CbeA (pour Cytoskeleton bundling-enhancing factor A), permet le regroupement des protéines du cytosquelette MerB et FtsZ, protégeant leur polymérisation contre l'action inhibitrice de la toxine YeeV (ou CbtA) (97).

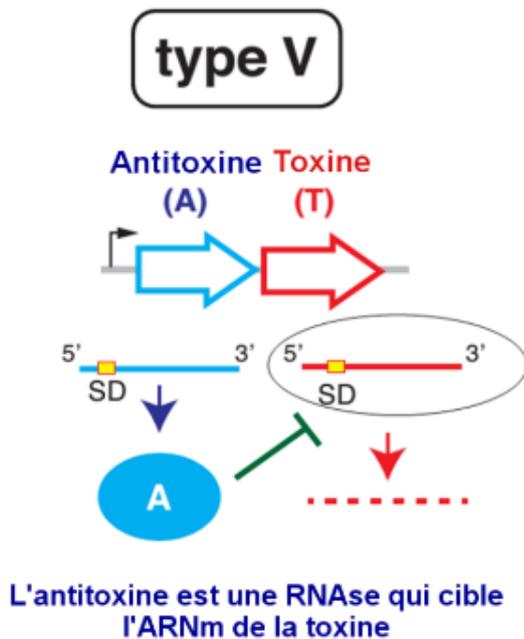


**Figure 15 : Système toxine-antitoxine de type IV**

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. La toxine et l'antitoxine se fixent sur la même cible. L'antitoxine inhibe l'activité de la toxine par compétition pour la fixation sur un substrat commun. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

### 5. Système toxine-antitoxine de type V

Dans le STA de type V, l'antitoxine a une activité RNase qui dégrade le transcrite de la toxine (Figure 16).



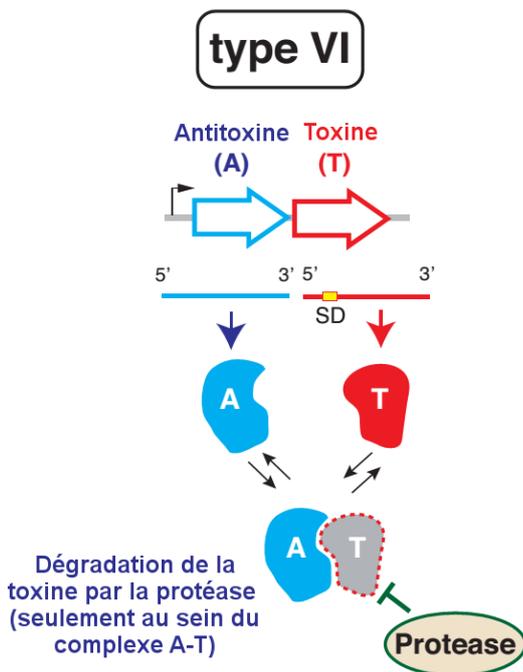
**Figure 16 : Système toxine-antitoxine de type V**

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine a une activité RNase et dégrade le transcrite de la toxine. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

Le système ghoTS est le premier système de type V découvert, et GhoS (Ghost cell Suppressor) y joue le rôle d'antitoxine qui neutralise GhoT en clivant son ARNm (98). GhoT est un peptide qui lyse la membrane, ce qui provoque la formation de cellules fantômes (des cellules lysées avec des membranes endommagées).

## 6. Système toxine-antitoxine de type VI

Le STA de type VI est le système le plus récemment identifié, et il n'en existe qu'un seul exemple à ce jour : le système *socAB*, dans lequel l'antitoxine SocA se fixe à la toxine SocB et agit comme une protéine adaptatrice pour les protéases ClpXP qui vont donc pouvoir dégrader la toxine. A l'inverse des STA de type II, SocA ne neutralise donc pas directement SocB, mais assure la promotion de sa dégradation par des protéases spécifiques grâce à la formation d'un complexe toxine-antitoxine (99).



**Figure 17 : Système toxine-antitoxine de type VI**

Toxine (T) et antitoxine (A) sont indiquées en rouge et bleu, respectivement. L'antitoxine favorise la dégradation de la toxine par la formation d'un complexe T-A ; dans cette conformation, la toxine est sélectivement ciblée par les protéases. SD : séquence Shine-Dalgarno. Adapté de (Lobato-Marquez *et al.*, 2016).

## B. Les systèmes toxine-antitoxines impliqués dans la persistance bactérienne

La question du contrôle de systèmes toxine-antitoxine et de leur contrôle de la formation de cellules persistantes a été souvent étudiée. Les systèmes toxine-antitoxine chromosomiques pourraient être impliqués dans la formation de cellules persistantes (100). En effet, le nombre de gènes identifiés associés aux persisters continue d'augmenter (Tableau V) et les systèmes toxine-antitoxine semblent en être un régulateur clé (23,101). L'analyse du protéome de *Mycobacterium* en cas de carence en nutriments montre une abondance accrue de protéines appartenant à des systèmes toxine-antitoxine (102).

L'étude de la compréhension des phénomènes de persistance bactérienne est passée par la recherche de caractéristiques phénotypiques propres aux bactéries persistantes pour finalement arriver à un champ de recherche plus efficace : l'identification de gènes favorisant la différenciation de cellules quiescentes en persisters (Tableau V). Ces études ont montré que les systèmes toxine-antitoxine sont d'importants médiateurs de la persistance (37,43,46,103–105) bien que le détail de leurs modes d'actions reste souvent inconnu (106).

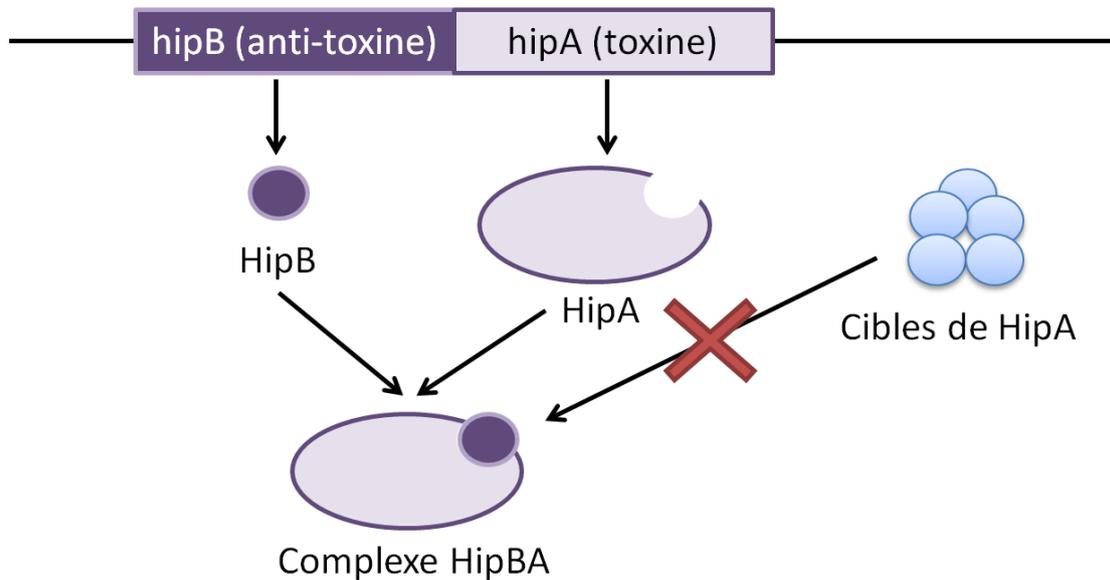
**Tableau V : Systèmes toxine-antitoxine impliqués dans la persistance classés par type**

| TA         | Espèce         | Références                                    |
|------------|----------------|---|
| Type I     |                |   |
| istR/tisAB | <i>E. coli</i> | Dorr, Vulic and Lewis (2010)                  |
| hokA/sokA  | <i>E. coli</i> | Kim and Wood (2010)                           |
| hokB/sokB  | <i>E. coli</i> | Verstraeten et al. (2015b)                    |
| Type II    |                |   |
| hipBA      | <i>E. coli</i> | Rotem et al. (2010);<br>Germain et al. (2015) |
| dinJ/yafQ  | <i>E. coli</i> | Harrison et al. (2009);<br>Hu et al. (2015)   |

|                        |  |   |
|------------------------|--|---|
| relBE                  | <i>E. coli</i> , <i>S. mutans</i> ,<br><i>S. Typhimurium</i> | Keren et al. (2004b);<br>Leung and Levesque (2012) ;<br>Tashiro et al. (2012);<br>Maisonneuve, Castro Camargo<br>and Gerdes (2013);<br>Helaine et al. (2014);<br>Silva-Herzog et al. (2015) |
| mazEF                  | <i>E. coli</i> , <i>S. mutans</i> ,<br><i>S. Typhimurium</i> | Leung and Levesque (2012);<br>Tripathi et al. (2013);<br>Mok et al. (2015);<br>Tiwari et al. (2015)   |
| hicBA                  | <i>E. coli</i> , <i>B</i><br><i>pseudomallei</i>             | Maisonneuve et al. (2011);<br>Butt et al. (2014)  |
| graAT                  | <i>P. putida</i>   | Tamman et al. (2014)  |
| shpBA                  | <i>S. Typhimurium</i>  | Slattery et al. (2013);<br>Helaine et al. (2014);<br>Silva-Herzog et al. (2015)   |
| ccdBA                  | <i>E. coli</i>   | Tripathi et al. (2012)  |
| mqsAR (ygiUT)          | <i>E. coli</i>   | Kim and Wood (2010)   |
| ybaJ/hha<br>(tomB/hha) | <i>E. coli</i>   | Kim and Wood (2010)   |
| higBA (ygjNM)          | <i>E. coli</i> , <i>S.</i><br><i>Typhimurium</i>             | Maisonneuve et al. (2011);<br>Helaine et al. (2014)   |
| yefM/yoeB              | <i>E. coli</i>   | Maisonneuve et al. (2011);<br>Maisonneuve, Castro-Camargo and Gerdes<br>(2013)  |
| prIF/yhaV              | <i>E. coli</i>   | Maisonneuve et al. (2011)   |
| chpSB                  | <i>E. coli</i>   | Maisonneuve et al. (2011)   |
| yafNO                  | <i>E. coli</i>   | Maisonneuve et al. (2011)   |
| phd/doc                | <i>S. Typhimurium</i>  | Helaine et al. (2014)   |
| parDE                  | <i>S. Typhimurium</i>  | Helaine et al. (2014)   |
| vapBC                  | <i>S. Typhimurium</i>  | Helaine et al. (2014),<br>Silva-Herzog et al. (2015)  |

|        |                       |   |
|--------|-----------------------|---|
| sehBA  | <i>S. Typhimurium</i> | Silva-Herzog et al. (2015)                        |
| tacTA  | <i>S. Typhimurium</i> | Helaine et al. (2014);<br>Cheverton et al. (2016) |
| Type V |                       |   |
| ghoST  | <i>E. coli</i>        | Wang et al. (2012, 2013b);<br>Cheng et al. (2013) |
| ortT   | <i>E. coli</i>        | Islam, Benedik and Wood (2015)                    |

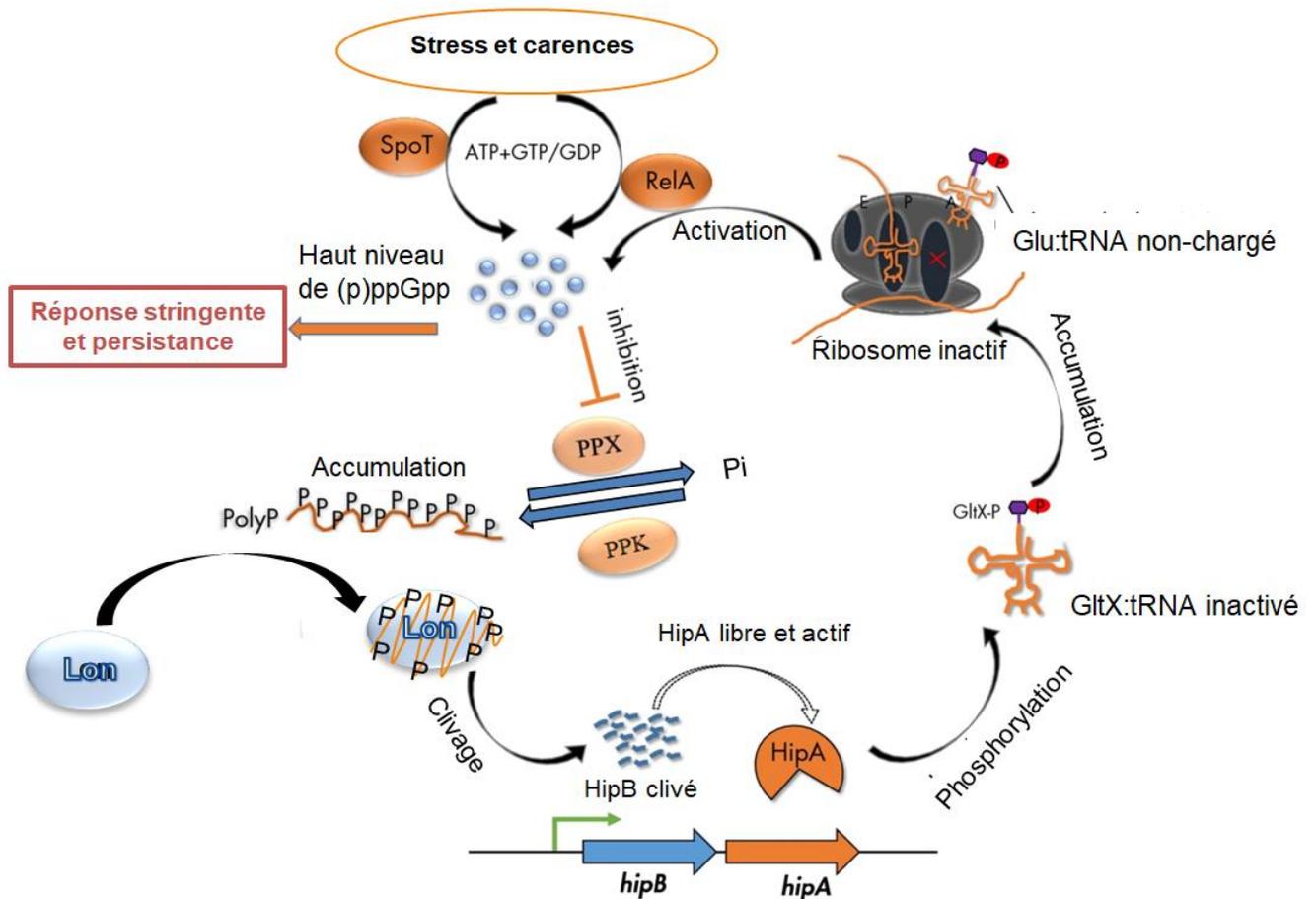
Le premier gène impliqué dans la persistance ayant été identifié est le gène *hipA* (high persistence gene) isolé chez *Escherichia coli* (25). La protéine HipA est une toxine appartenant au module HipBA, qui est un système TA de type II. HipB est l'antitoxine de HipA et l'inhibe par encombrement stérique (Figure 18) (107).



**Figure 18 : Le complexe HipBA est un système toxine-antitoxine de type II.**

L'antitoxine bloque la fixation de HipA à sa cible. Le gène *hipB* précède le gène *hipA* et exerce un rétrocontrôle négatif sur le système *hipBA*

Des études ont également montré qu'un allèle particulier, *hipA7* pouvait multiplier la fréquence d'apparition de persisters jusqu'à mille fois (108). Il est toutefois nécessaire d'être vigilant concernant les études qui utilisent *hipA7*, car les variants HipA7 ne sont pas toxiques (109) et les nombreuses expériences qui utilisent ces variants n'étudient pas une toxine active, ainsi les conclusions de ces expériences peuvent être liées à la persistance mais pas au système toxine-antitoxine.



**Figure 19** : Schéma résumant le modèle d'activation du système HipBA par le (p)ppGpp, effecteur de la réponse stringente.

Ce modèle selon lequel de hauts niveaux de (p)ppGpp permettent une accumulation de polyphosphate, qui, avec le Lon forme un complexe capable de cliver l'antitoxine HipB et donc d'augmenter l'activité de HipA est controversé dans la communauté scientifique du fait des souches et des méthodes utilisées qui peuvent conduire à des artefacts et à de fausses conclusions. Le PPX correspond à l'exopolyphosphatase et le PPK à la polyphosphate kinase. Cette figure est adaptée de (Yang et al. 2017) et de (Germain et al. 2015) (110,111)

Par ailleurs, une surexpression de HipA inhibe la croissance cellulaire en gênant la traduction, la transcription et la réplication de l'ADN, ce qui induit une tolérance augmentée aux antibiotiques (112). Des analyses plus tardives ont montré que HipA inactive la glutamyl tRNA synthetase (GltX) par phosphorylation (113), et que cette inhibition a pour conséquence une accumulation de tRNA<sup>Glu</sup> non chargé et de synthèse de (p)ppGpp, qui, comme vu précédemment a un impact conséquent sur la formation de persisters. Cependant, ce modèle est de moins en moins retenu, de nombreux laboratoires mettant en cause la qualité des souches utilisées.

Le modèle qui a été proposé est celui selon lequel le (p)ppGpp, médiateur de la réponse stringente, active la protéase Lon à travers un polyphosphate (PolyP), ce qui a pour effet d'inactiver les systèmes toxine-antitoxine de type II (Figure 19). Cependant, depuis que le (p)ppGpp a pour la première fois été corrélé à la persistance en 2003 via le système toxine-antitoxine HipA (109), la seule nouvelle découverte au sein de ce modèle est l'impact du (p)ppGpp sur la protéase Lon via le polyphosphate (Figure 19). D'autre part, *in vitro*, le (p)ppGpp et le phosphate désactivent Lon au lieu de l'activer (114). De plus, la délétion de *lon* n'a aucun effet sur la persistance induite par des aminoglycosides et des bêta-lactamines (115,116). De même, si PpK, l'enzyme qui produit le polyphosphate est inactivé, le nombre de persisters ne subit pas non plus de modification significative (115), et chez les bactéries qui ne produisent pas de (p)ppGpp, des cellules persistantes sont toujours formées.

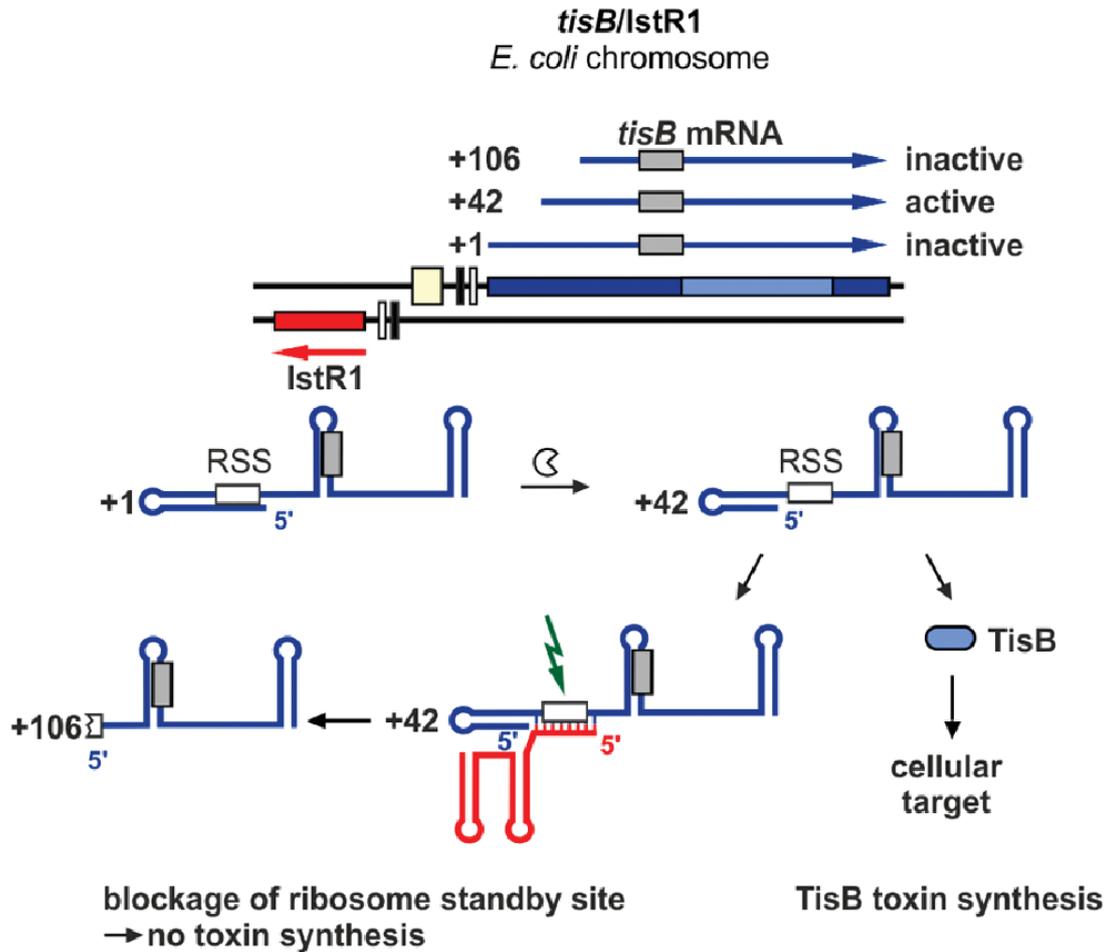
Un des principaux articles décrivant ce modèle chez *E. coli* K12 a d'ailleurs été rétracté durant la rédaction de cette thèse, en précisant que plusieurs résultats obtenus étaient des artefacts dus aux bactériophages et aux souches utilisés, et que l'on ne pouvait plus conclure concernant la contribution du polyphosphate et du système toxine-antitoxine dans la persistance bactérienne.

La réponse SOS est une fonction médiée par la réparation de l'ADN, qui, chez *E. coli* contrôle l'activation de deux modules de type I (*tisB/istR* et *symE/symR*), ainsi que de deux modules de type II (*dinJ/yafQ* et *yafNO*) (68,117). La réparation de l'ADN induite par la réponse SOS est essentielle pour la survie à un traitement à la fluoroquinolone, et la réponse SOS contrôle l'activation de *tisB/istR*.

Le petit peptide de 29 acides aminés, TisB, appartient au système toxine-antitoxine de type I *tisB*-IstR1, qui est régulé par le répresseur transcriptionnel LexA de la réponse SOS (118). En réponse à un stress, la toxine TisB se lie à la membrane interne et inhibe la force promotrice, conduisant à une chute des niveaux d'ATP et par conséquent une induction de la persistance (76,119,120).

Dans ce système, l'ARNm de la toxine TisB (toxicity-induced by SOS) entier (+1), traductionnellement inactif, est clivé à son extrémité 5' par une endonucléase pour donner l'ARNm *tisB* actif (+42). La forme active présente des réarrangements structuraux et possède des séquences nucléotidiques simple-brin complémentaire de la séquence de l'antitoxine IstR-1 (Inhibitor SOS-induced toxicity by RNA) qui vient s'y fixer pour inhiber sa traduction et favoriser son clivage, par la RNase III, en un ARNm tronqué et inactif (+106). L'ARNm *tisB* actif (+42), contrairement aux transcrits inactifs (+1 et +106), contient un site de chargement ou de « stand-by » en amont du RBS qui lui est séquestré dans une structure secondaire stable. La fixation de la sous-unité 30S sur cette séquence stand-by lui permet d'avancer vers le RBS de l'ARNm *tisB*, alors transitoirement ouvert et accessible, afin de traduire le peptide toxique TisB. L'antitoxine IstR-1 inhibe la traduction de *tisB* par compétition avec le ribosome par appariement de base au niveau de ce site stand-by, localisé approximativement à 100 nucléotides en amont du RBS, bloquant ainsi la toxicité de TisB (118,121). Les études montrent que la délétion du gène *rnc* codant pour la RNase III et la délétion du gène *istR-1* induit une augmentation du niveau d'ARNm *tisB* (119), suggérant que la formation du duplexe *tisB*/IstR-1 provoque la dégradation de *tisB* par la RNase III (Figure 20).

## Blocking of ribosome standby site



**Figure 20 : Inhibition de la traduction de la toxine *tisB* par l'antitoxine IstR-1.**

Chez *E. coli*, IstR-1 fixe le site stand-by (RSS) du ribosome de l'ARNm *tisB*. Par conséquent, les ribosomes ne peuvent pas accéder à cette région de l'ARNm et la traduction de l'ARNm *tisB* dépendante du site stand-by est inhibée. Les barres noires et blanches mettent en évidence les boîtes -35 et -10 des promoteurs, respectivement et les boîtes grises correspondent aux séquences SD. Les flèches vertes symbolisent les endoribonucléases. Figure tirée de (122)

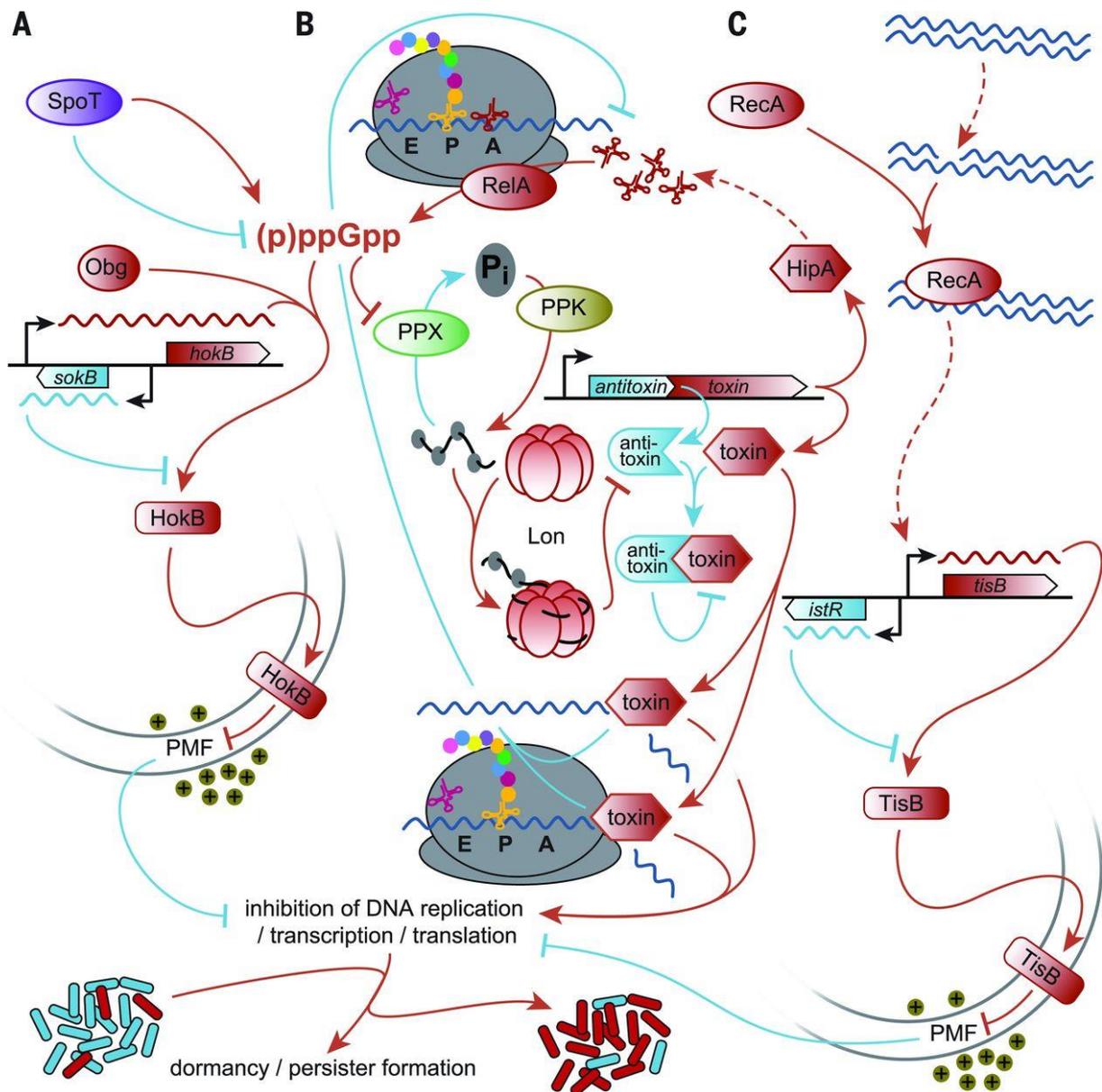
Des études récentes ont montré que la GTPase Obg induit la persistance à travers une activation transcriptionnelle de la toxine de type I HokB. La délétion de *hokB* n'influence pas le niveau de persistance, en revanche, sa surexpression augmente l'abondance de cellules

persistantes (104). A ce jour, on ne connaît pas le détail des mécanismes moléculaires qui induisent une augmentation de l'abondance de persisters lorsque le gène *hokB* est surexprimé.

Le système *ghoTS* est un STA de type V dont la toxine, *GhoT* semble augmenter la formation de cellules persistantes. Le système *ghoTS* serait également être impliqué dans la formation de biofilm (98).

A ce jour, seuls trois types de systèmes toxine-antitoxine semblent être impliqués dans la persistance : les systèmes de type I, II et V. Les bases moléculaires de la formation de bactéries persistantes ont été principalement étudiées chez *E. coli* K12. Cet organisme code pour une trentaine de systèmes toxine-antitoxine dont la grande majorité se divise entre les systèmes de type I et II (123). Un nombre considérable de ces systèmes toxine-antitoxine semble contribuer à moduler l'abondance de persisters (Tableau V) et trois voies majeures ont été identifiées (51) (Figure 21) :

- Les ARNm endonucléases sous le contrôle de (p)ppGpp et de Lon
- La réponse SOS et les systèmes toxine-antitoxine régulés par la réponse SOS
- La toxine *HokB* sous le contrôle de *Obg* et du (p)ppGpp



**Figure 21 : Trois voies majeures de formation de persisters chez *E. coli* K-12 qui dépendent de l'activation de systèmes toxine-antitoxine.**

Les mécanismes activant la formation de persisters sont en rouge tandis que ceux qui la répriment sont en bleu. La voie du système Obg/HokB (A) et celle de la voie polyphosphate/Lon/ARNm interférase (B) sont sous le contrôle d'un signal de (p)ppGpp. Le système TisB est contrôlé par une induction via la réponse SOS. Les toxines HokB et TisB sont des toxines de type I, ce sont des peptides associés à la membrane qui induisent la formation de bactéries persistantes par diminution de la force proto-motrice (PMF). Les ARNm endonucléase sont des toxines de type II qui interfèrent avec la traduction ribosomale.

La voie (B) implique des régulations positives (via HipA) et négatives (via la diminution du niveau d'ARNm). E, P et A représentent la sortie ribosomale (exit), et les sites peptidyl et aminoacyl tRNA, respectivement. Figure provenant de (51).

### III. Conditions environnementales favorisant la formation de bactéries persistantes

De nombreuses conditions environnementales modulent la formation de bactéries persistantes et peuvent apparaître tout au cours de la vie de la bactérie comme la carence nutritive, les concentrations sub-létales d'antibiotiques, le stress oxydant lors de l'internalisation dans une cellule phagocytaire et lors de la formation de biofilm.

#### A. Carence en nutriments et phase stationnaire

Un manque de nutriments dans le milieu est considéré par la cellule comme un stress. De même, la phase stationnaire de croissance a lieu, en conditions physiologiques, lorsque la limite des nutriments présents dans le milieu est atteinte. La phase de croissance exponentielle s'arrête et il y a un équilibre au sein de la population bactérienne entre les bactéries naissantes et les bactéries mourantes. Cette carence en nutriments induit une réponse générale au stress chez les bactéries.

Dans ces conditions, la synthèse de protéines impliquées dans les voies métabolique, en réponse active aux carences, et le facteur de stress  $\sigma^S$ /RpoS sont activés ainsi qu'une hausse de l'abondance en (p)ppGpp augmentant le taux de formation de bactéries persistantes, probablement responsable d'une tolérance accrue aux antibiotiques (124).

Cependant, il a été montré que des facteurs peptidiques, notamment du quorum sensing tels que la pyocyanine chez *P. aeruginosa*, présents dans des cultures en fin de phase exponentielle permettent la sortie de quiescence des bactéries persistantes (125). Ces facteurs semblent être principalement présents lors de la phase exponentielle, on peut donc penser qu'en phase de croissance, une population bactérienne sécrète ces facteurs ce qui a pour effet

de réguler la quantité de persisters au sein de la population. Si tel est le cas, on ne peut pas exclure que l'abondance accrue de bactéries persistantes au sein d'une population en phase stationnaire soit due, au moins en partie, à une diminution de la sortie de quiescence des persisters et non à une augmentation de la formation de nouveaux persisters.

## **B. Traitement sub-létal d'antibiotiques**

Il est admis que la mauvaise observance d'un traitement antibiotique, une pénétrance insuffisante de l'antibiotique au niveau du site d'infection sont des situations qui augmentent la résistance bactérienne du fait d'une exposition à une dose d'antibiotique en dessous de la CMI. Les mécanismes impliqués dans cette diminution de la sensibilité semblent stimuler des processus tels que le transfert horizontal entre bactéries (126), et augmenter le taux de mutations (127).

L'exposition à une dose sub-létale d'antibiotique semble également augmenter le taux de différenciation des cellules en persisters et ce, *via* des mécanismes variés (40,45). En effet, on a vu précédemment que la réponse SOS et les réponses générales au stress ont un impact important sur l'abondance des cellules persistantes, or ces réponses peuvent être générées par des doses d'antibiotiques inférieures à la CMI. Chez *Vibrio cholerae*, par exemple, des doses sub-létales d'aminoglycosides induisent la réponse SOS (128).

Les fluoroquinolones à des concentrations sub-létales déclenchent également la réponse SOS qui induit une augmentation significative de la formation de persisters chez *E. coli* via l'activation du système toxine-antitoxine TisAB (45).

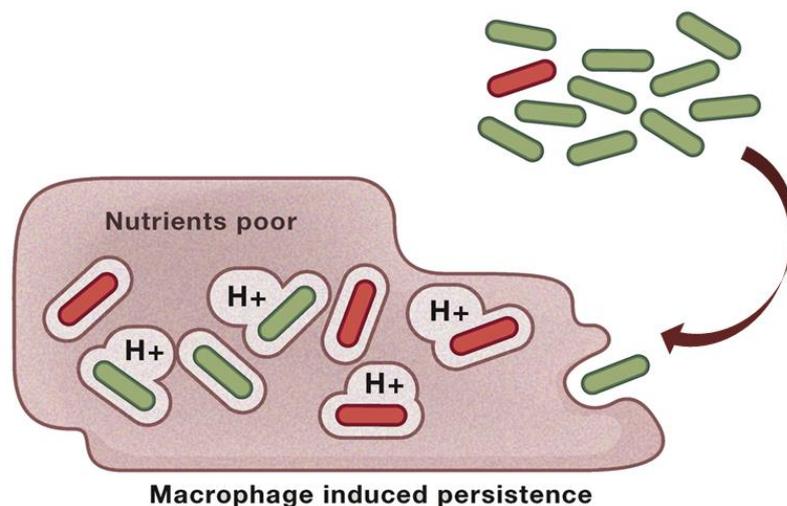
## **C. Internalisation dans une vacuole phagocytaire**

La phagocytose est l'un des mécanismes clés de l'immunité innée. Ses principaux effecteurs sont notamment les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Elle est habituellement constituée de trois phases : l'adhésion, l'ingestion puis la digestion (bien que cette dernière phase ne soit pas systématique). L'adhésion permet de lier le phagocyte au corps étranger, puis vient ensuite l'étape d'internalisation pendant laquelle le corps étranger

pénètre dans la cellule via une vacuole phagocytaire (ou phagosome). Enfin, il y a parfois une fusion du phagosome avec une autre vacuole contenant des enzymes permettant de dégrader la plupart des macromolécules : le lysosome. Cette fusion permettra la formation du phagolysosome.

Les phagosomes ont un pH plus acide que le cytoplasme (pouvant varier de pH 6,5 à pH 4), et bien que la phagocytose puisse être efficace pour détruire certaines bactéries, elle peut également être utilisée par d'autres bactéries en tant que stratégies d'invasion. Par exemple, *Mycobacterium*, *Chlamidia*, *Salmonella* et *Legionella* se répliquent au sein des phagosomes.

Des études ont montré chez *S. Typhimurium* qu'au cours de l'infection, alors que certaines cellules se répliquent au sein du phagosome, d'autres cellules de la même population se mettent en dormance, et ce, au sein du même macrophage (129). Une partie de ces cellules dormantes étaient dans un état de persistance, ce qui leur permettait de survivre sur le long terme, à la fois aux dommages infligés par l'hôte et aux traitements antibiotiques (Figure 22) (29).



**Figure 22 : Conditions environnementales au sein d'un macrophage.**

A l'intérieur du macrophage, les bactéries sont internalisées dans des vacuoles à pH acide et à faible disponibilité en nutriments. En rouge, les bactéries persistantes, en vert, les bactéries se multipliant. Figure adaptée de (24)

Les conditions au sein d'une vacuole sont particulières : en plus du pH acide, c'est un milieu faible en nutriments (Figure 22). Dans ces circonstances, il peut y avoir une induction de la réponse stringente qui provoque alors la formation de bactéries persistantes. En effet, les mutants de *Salmonella* privés de réponse stringente montrent un niveau beaucoup plus faible de persisters dans les macrophages (29).

Lorsqu'une bactérie entre en contact avec un macrophage, ils génèrent des ROS. La bactérie répond alors au stress oxydant par l'induction d'une réponse globale qui élimine les ROS et répare les dommages causés par les radicaux libres (130,131). La formation de persisters en réponse à des dommages subis par l'ADN suggère que d'autres stress tels que le stress oxydant pourraient provoquer cette formation.

Le stress oxydant est une agression subie par la cellule notamment du fait des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS). Les bactéries, comme tous les organismes, ont des processus de détoxification de ROS et de réparation des protéines oxydées, ce qui permet de maintenir la bactérie viable malgré un niveau de production basal de ROS. On peut donc définir le stress oxydant comme un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité anti-oxydante de la bactérie (132).

Les systèmes senseur-régulateur qui répondent au stress oxydant chez *E. coli* sont les régulons OxyR et SoxRS, qui contrôlent respectivement les réponses au peroxyde d'hydrogène et au superoxyde (133,134). Des études ont montré que le régulon OxyR jouait un rôle dans la formation de persisters induite par la signalisation d'indole. En effet, l'indole serait détecté de façon hétérogène par les populations cellulaires, ce qui causerait l'induction de la voie du stress oxydant (20).

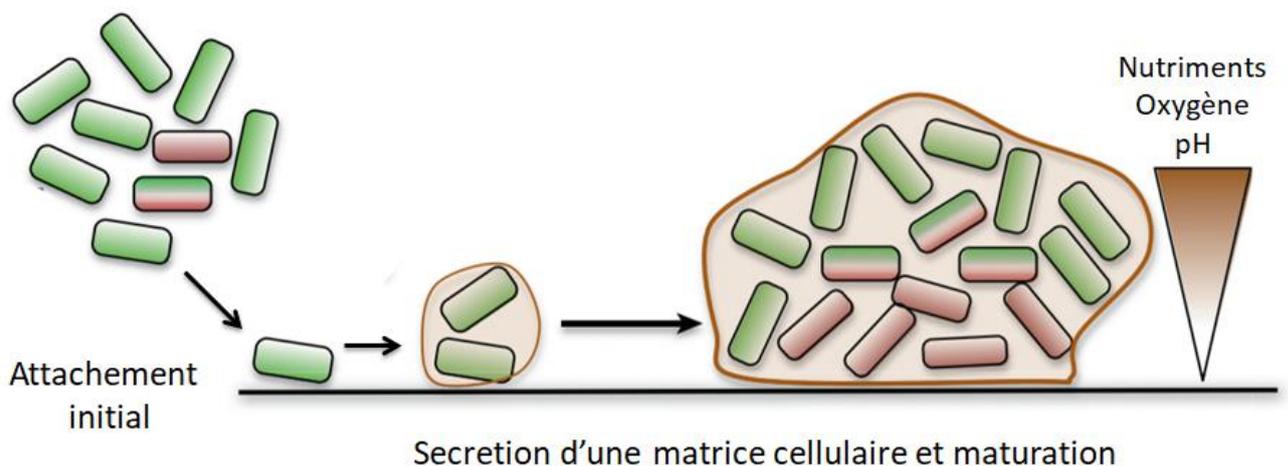
La production de ROS provoque des dommages importants dans les cellules, cependant des études sur *P. aeruginosa* semblent montrer que la survie des bactéries persistantes au sein de biofilm était dépendantes des enzymes de détoxification des ROS, sous le contrôle des (p)ppGpp, et des mécanismes similaires semblent avoir été observés chez *E. coli* (124,135).

## D. Formation de biofilm

Les biofilms sont des communautés multicellulaires de micro-organismes qui adhèrent entre eux et à une surface grâce à une matrice extracellulaire composée de substances polymères (Figure 23). La structure des biofilms leur permet d'agir comme un bouclier physique pour une communauté bactérienne dans le cadre de conditions hostiles (136,137) tels que la réponse immunitaire, les stress antibiotiques... La présence de biofilms rend les bactéries qui sont en son sein extrêmement tolérantes aux antibiotiques.

Les conditions environnementales rencontrées par les bactéries au sein d'un biofilm peuvent en être la cause. Plus un biofilm est imposant, plus le gradient entre sa surface et sa partie la plus profonde est important. Ce gradient concerne, par exemple, la disponibilité en nutriments et en oxygène qui est plus importante à la surface du biofilm qu'à l'intérieur (138). On retrouve également un gradient au niveau du pH, plus on s'enfonce dans un biofilm, plus le pH est acide (139). Enfin, on peut retrouver au sein d'un biofilm de nombreux signaux cellulaires tels que du NO, du (p)ppGpp (140) et des effecteurs du quorum sensing (141).

### Bactéries planctoniques



**Figure 23 : Etapes de constitution d'un biofilm**

En contact avec une surface, les cellules planctoniques s'attachent grâce aux protéines de surface. Après l'attachement, les cellules se divisent et produisent la matrice extracellulaire,

qui entraîne la formation de microcolonies. Comme la division cellulaire continue, la biomasse s'accumule et un biofilm mature est formé. Les signaux environnementaux à l'intérieur du biofilm entraînent l'activation des mécanismes de dissémination (noirs). Pendant la dispersion, les cellules ré-entrent dans une phase de croissance planctonique et peuvent ensemercer de nouveaux sites de formation de biofilm.

Par ailleurs, les biofilms constituent un obstacle physique aux antibiotiques. Il y a donc une diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm, ce qui conduit à un gradient de concentration. Les bactéries profondément ancrées dans un biofilm qui a été traité avec une dose d'antibiotique au-dessus de la CMI, pourront être, elles-mêmes, exposées à une concentration sub létale d'antibiotique.

Toutes ces conditions semblent donc être favorables à une augmentation de l'abondance de bactéries persistantes. En effet, il a été montré qu'un biofilm contient 100 à 1000 fois plus de cellules persistantes qu'une culture planctonique (36,60,139,142). On peut donc attribuer une partie de la tolérance aux antibiotiques induite par les biofilms à la présence de bactéries persistantes (60,137,139). De plus, la tolérance aux antibiotiques de *E. coli* et de *P. aeruginosa* dans le biofilm semble être dépendante du (p)ppGpp (54,68,109), de même que des protéines RelA et de protéines associées au nucléoïde (143).

## Les caractéristiques phénotypiques des persisters

### I. Une activité métabolique modifiée

Les bactéries persistantes sont souvent associées au ralentissement du métabolisme et de la vitesse de croissance.

Cependant, il est à présent établi que l'état de dormance des persisters n'est pas suffisant pour la survie car des conditions bactériostatiques n'induisent pas la tolérance aux antibiotiques (144). Une étude par cytométrie de flux a montré que la plupart des cellules dormantes ne sont pas tolérantes aux antibiotiques, bien que la fraction de persisters soit augmentée dans les populations physiologiquement quiescentes (5). Il est donc admis que les persisters ne sont pas seulement des cellules dont la division est inactive mais que la formation de persisters implique des changements quantitatifs de la physiologie bactérienne pour permettre la survie et surtout un retour à un état de division (51).

La tolérance et la persistance sont étroitement liées à la vitesse et aux phases de croissance bactérienne (145). Par exemple, une croissance très lente permet d'avoir des phénotypes tolérants et stables chez *E. coli* (146). *S. aureus* et *P. aeruginosa* montrent un nombre plus élevé de persisters à partir de la moitié de la phase exponentielle, tandis qu'ils restent faibles au début de la phase exponentielle (5). D'ailleurs, il a été montré qu'en maintenant une culture en début de phase exponentielle, on pouvait obtenir une culture sans persisters (11,23). De plus, des *E. coli* qui ont été exposés de façon répétée à des antibiotiques ont montré une capacité à moduler leur temps de r en fonction de la durée d'exposition à l'antibiothérapie (13). La modulation du temps de croissance semble être une réponse adaptative transitoire à l'exposition aux antibiotiques.

Un facteur majeur de la modulation de la vitesse de croissance est la richesse du milieu de culture. Plus l'accès aux nutriments est limité, plus on aura d'induction de persisters dans la culture. Le manque de glucose dans le milieu semble provoquer une formation accrue de persisters et de biofilm auxquels s'ensuit une tolérance aux fluoroquinolones et aux bêta-lactamines (54,68). A l'inverse, des *E. coli* en phase stationnaire peuvent être sensibilisées à

la ciprofloxacine par ajout dans le milieu d'oxygène et de sources de carbone (145). De plus, la croissance d'*E. coli* en milieu minimum avec une faible quantité de glucose montre une expression plus élevée de la pompe d'efflux AcrB qui est impliquée dans l'efflux d'antibiotiques. Ceci suggère que le métabolisme du sucre pourrait avoir des effets plus larges qui incluent l'efflux d'antibiotiques. Le manque d'acides aminés semble aussi être un facteur important de la tolérance. Ainsi, le manque simultané d'acides aminés et de glucose rendrait les bactéries hautement tolérantes aux bêta-lactamines, aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides (56).

Chez *Mycobacterium tuberculosis*, une carence prolongée réduit la sensibilité à la rifampicine, à l'isoniazide et au métronidazole. Elle induit également un changement de l'expression de voies métaboliques centrales telles que la biosynthèse d'acides aminés, le métabolisme énergétique et la synthèse des lipides (147). De plus, la carence régule négativement l'expression de plusieurs enzymes du cycle de Krebs et de la glycolyse. L'opéron de la NADH deshydrogénase et la plupart des complexes de l'ATP synthase qui contribuent à la production d'ATP sont également régulés négativement (147). Ces modifications métaboliques provoquent une diminution des niveaux d'ATP. Ces changements permettent à *M. tuberculosis* d'entrer dans un état de tolérance en réduisant la vitesse de croissance tout en restant viable.

De même, chez *S. aureus*, la diminution des niveaux d'ATP d'une population en phase exponentielle jusqu'à atteindre des niveaux d'ATP habituellement trouvés chez des bactéries en phase stationnaire a eu pour conséquence une augmentation drastique de la formation de persisters (325 fois plus de bactéries persistantes) (148).

Un autre exemple de modulation du métabolisme et d'induction de la persistance est le cas du gène *phoU* du métabolisme du phosphate (149) (Tableau II). Les mutants *E. coli* délétés pour le gène *phoU* ne semblent pas être capables de reprendre leur croissance après un traitement aux bêta-lactamines. Ils sont également plus sensibles à de nombreux antibiotiques et au stress. De plus, la perte de *phoU* semble sensibiliser les bactéries en phase stationnaire à l'ampicilline qui requiert habituellement une croissance active pour tuer les cellules sauvages (149). Il est apparu que les mutants délétés pour le gène *phoU* régulent positivement les gènes impliqués dans la production d'énergie, c'est pourquoi il est suggéré que le gène *phoU* régule

la persistance en réduisant l'expression de gènes métaboliques qui répondent aux stress ou aux senseurs de stress tels que la carence en nutriments ou l'exposition aux antibiotiques.

## II. Les colonies naines (ou Small Colony Variants)

Les Small Colony Variants (SCV) ou colonies naines, correspondent à un phénotype particulier, initialement découvert chez *S. aureus*. Depuis lors, les colonies naines ont été décrites dans de nombreuses bactéries : *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholera*, *Salmonella* et *L. acidophilus* (150). Ces SCV partagent un grand nombre de caractéristiques avec les bactéries persistantes, et le phénomène de persistance semblerait constituer une partie du cycle de vie des colonies naines (151).

Les SCV, de même que les persisters, ont une croissance ralentie (152) et ont une tolérance accrue aux antibiotiques. Elles semblent incapables d'initier une infection et présentent une inhibition de la virulence comparée à la population totale sur le modèle *Caenorhabditis elegans*.

La formation de SCV est fortement régulée par les signaux environnementaux et fait intervenir le facteur général de réponse aux stress, sigmaB, qui joue un rôle important dans la formation de SCV induite par les aminoglycosides (153) ou par une exposition prolongée aux stress acide, alcalin, osmotique et de température (153–155). De nombreuses mutations qui ont un rôle important dans l'expression de divers phénotypes, sont observées chez les SCV. Les mutations associées aux SCV de *S. aureus* les mieux caractérisées sont répertoriées dans le Tableau VI.

**Tableau VI : Mutations décrites chez les SCV de *S. aureus*.**

Les gènes mutés, sont indiqués avec leur produit d'expression et leur fonction biologique. Les phénotypes spécifiques font références aux caractéristiques des SCV imputables à la mutation du gène en question. Abréviations : SI Système Immunitaire.

| Gène muté   | Produit d'expression   | Rôle                                | Phénotype spécifique  | Références          |
|-------------|--|-------------------------------------|---|---------------------|
| <i>thyA</i> | Thymidylate synthase   | Biosynthèse de la thymidine         | Auxotrophie à la thymidine et à la médianone<br>Altération du transport d'électrons   | Proctor et al. 2006 |
| <i>menD</i> | 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase | Biosynthèse de la ménadione         | Auxotrophie à la médianone<br>Altération du transport d'électrons   | Proctor et al. 2006 |
| <i>hemB</i> | Porphobilinogene synthase                                      | Biosynthèse de l'hème               | Auxotrophie à l'hémine et à la médianone<br>Altération du transport d'électrons<br>Inhibition de la pigmentation et de l'activité hémolytique | Proctor et al. 2006 |
| <i>ctaA</i> | CtaA   | Assemblage du cytochrome c          | Auxotrophie à l'hémine<br>Altération du transport d'électrons   | Glue et al. 1999    |
| <i>rsh</i>  | (p)ppGpp   | Activateur de la réponse stringente | Activation permanente de la réponse stringente<br>responsable de l'inhibition de la synthèse protéique<br>Inhibition de la virulence          | Gao et al. 2010     |
|             |  |                                     | Résistance au SI de l'hôte  | Gao et al. 2013     |
| <i>rpoB</i> | ARN polymérase   | Transcription                       | Résistance à la rifampicine   | Gao et al. 2010     |
|             |  |                                     | Inhibition de la virulence<br>Résistance au SI de l'hôte  | Gao et al. 2013     |
| <i>parC</i> | Sous-unité A de  | Structuration                       | Tolérance aux quinolones  | Gao et al. 2010     |

|             |   |                                |   |                           |
|-------------|---|--------------------------------|---|---------------------------|
|             | l'ADN<br>topoisomérase IV                       | de l'ADN                       |   |                           |
| <i>rplF</i> | Protéine ribosomale<br>L16                      | Synthèse<br>protéique          | Dépigmentation  | Norstrom et al.<br>2007   |
|             |   |                                | Inhibition de la traduction   | Lannergard et al.<br>2011 |
| <i>mprF</i> | MprF (Multiple<br>peptide résistance<br>Factor) | Résistance à la<br>daptomycine | Résistance aux peptides<br>antimicrobiens cationiques<br>synthétisés par les cellules<br>immunitaires de l'hôte | Richards et al.<br>2015   |

L'ensemble de ces mutations et caractéristiques permettent aux SCV d'entrer et de persister à l'intérieur des cellules phagocytaires non professionnelles, telles que les cellules épithéliales et endothéliales (156). Pour les bactéries, le milieu intracellulaire représente une voie d'échappement, non seulement du système immunitaire, mais également d'éventuels traitements antibiotiques. Ainsi, une bactérie qui peut survivre dans le milieu intracellulaire sans induire la mort de la cellule hôte ou activer de réponse immune serait avantagée. C'est le cas des SCV dans lesquelles on retrouve une inhibition de l'expression des facteurs de virulence (157), ce qui leur confère un avantage pour la survie à long-terme dans le milieu intracellulaire. Malgré ces informations, les relations entre les bactéries persistantes et les colonies naines ne sont pas encore très claires.

## Aspects thérapeutiques

Depuis la découverte du phénomène de persistance bactérienne par Bigger en 1940 et du gène *hipA* par Moyed & Bertrand en 1983, plusieurs études récentes ont démontré un lien direct entre la présence des bactéries persistantes et la nature chronique de certaines infections bactériennes. Des niveaux très élevés de persisters ont été retrouvés dans des isolats de *Candida albicans* issus d'un portage oral en comparaison à des isolats issus d'infection aigüe (158). Chez *E. coli*, un nombre important de mutants *hipA7* a été retrouvé chez des patients avec une infection urinaire (83). De plus, les isolats UPEC issus d'infections récurrentes montrent une capacité plus importante à entrer en état de persistance lors de l'antibiothérapie par rapport aux isolats issus d'infections aiguës (40).

Les infections chroniques en particulier présentent un challenge thérapeutique important, et l'un des cas le plus préoccupant est celui des patients atteints de mucoviscidose. La mucoviscidose est une maladie génétique due à une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui conduit à la sécrétion par les poumons d'un mucus visqueux propice à l'infection. Ainsi, aujourd'hui, la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose est l'infection des poumons par des bactéries, des levures et des fungi. Des isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose présentant des infections pulmonaires chroniques et provenant d'infections nosocomiales ont montré des taux augmentés de persisters pendant toute la durée de l'antibiothérapie (28,159) ainsi que la présence de mutants *hip* (159).

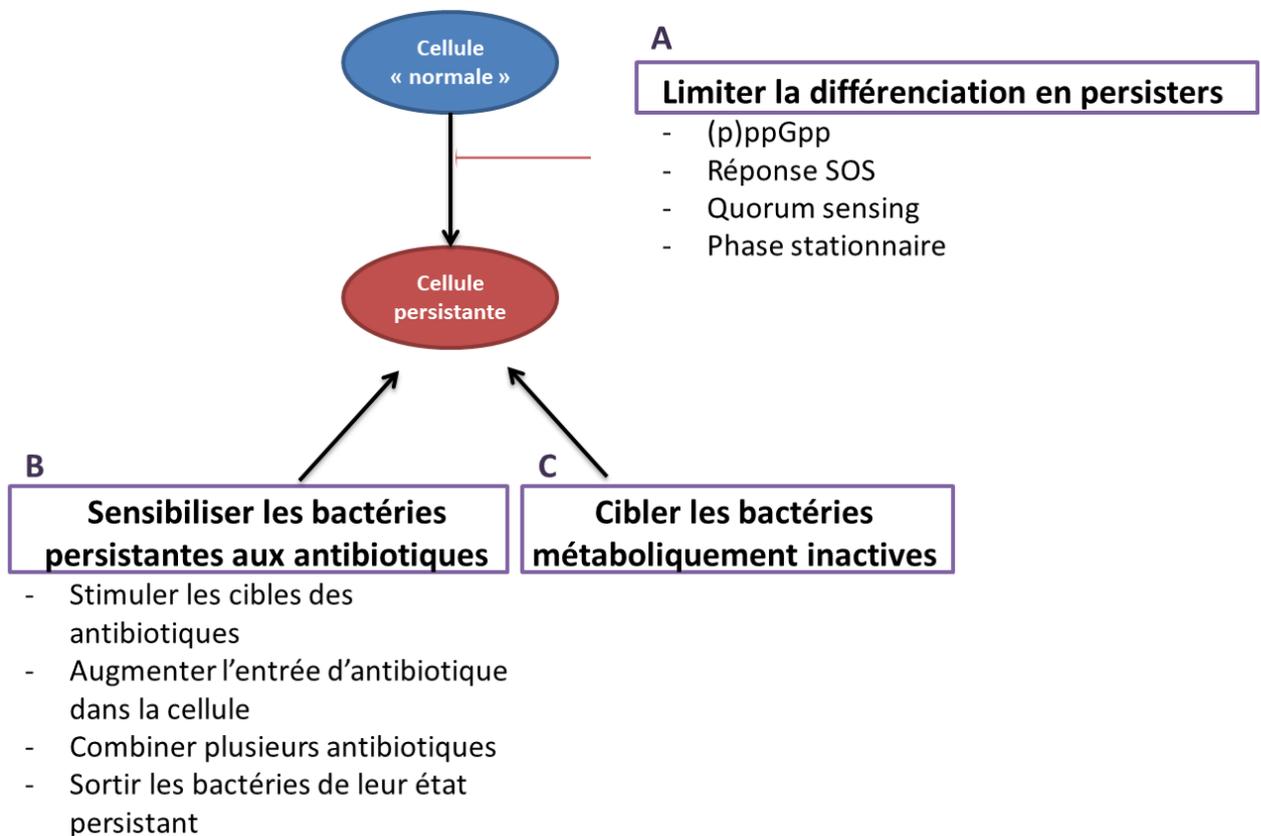
Des recherches complémentaires ont montré la présence de bactéries persistantes dans la plupart des pathogènes associés à des infections chroniques ou difficiles à traiter, notamment *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (160).

En général, les infections bactériennes mortelles peuvent apparaître chez des patients immunodéprimés (SIDA, cancers...) ou lorsque des bactéries persistantes sont capables d'échapper au système immunitaire dans les biofilms et dans les cellules de l'hôte. En effet, ces études corroborent l'importance de thérapies capables d'éradiquer le réservoir de persisters, réduisant ainsi l'évolution de la résistance aux antibiotiques pendant le traitement,

diminuant la nature récalcitrante des infections chroniques, et prévenant la recolonisation des tissus lorsque le traitement antibiotique cesse.

Les stratégies anti-persistence peuvent être divisées en trois groupes (Figure 24) :

- Limiter la formation de cellules persistantes
- Tuer directement les cellules persistantes
- Sensibiliser les cellules persistantes à un antibiotique



**Figure 24 : Stratégies permettant de lutter contre les bactéries persistantes :**

Limiter la différenciation des cellules en persisters, sensibiliser les bactéries persistantes aux antibiotiques auxquelles elles sont métaboliquement insensibles et cibler les bactéries inactives.

Il est intéressant de noter que, dès 1940, Bigger proposait déjà des stratégies afin d'éradiquer les bactéries persistantes lors d'une infection. Sa première piste consistait alors à fractionner le traitement antibiotique de façon précise afin de permettre la sortie de quiescence des bactéries persistantes avant de traiter de nouveau la population bactérienne (3). C'est une stratégie qui est encore d'actualité puisqu'on l'associe généralement à une autre stratégie telle que la combinaison d'antibiotiques dont l'action est synergique.

## I. Limiter la formation de bactéries persistantes

On sait de plus en plus de choses sur les voies qui potentialisent la formation de persisters, ce savoir s'accompagne donc de l'identification de plusieurs cibles pouvant interférer dans ces processus (Tableau VII). Par exemple, on a vu que l'augmentation du niveau de (p)ppGpp augmentait également la fréquence des persisters. Ainsi, des inhibiteurs prévenant l'accumulation de cette alarmone ont été utilisés chez plusieurs bactéries à gram négatif.

La relacine est une molécule conçue pour inhiber la production de (p)ppGpp induite par l'enzyme bactérienne et ubiquitaire RelA qui est responsable de la réponse stringente. *In vitro*, la relacine inhibe RelA, ce qui résulte d'une réduction de la production de (p)ppGpp *in vivo*. De plus, la relacine affecte l'entrée en phase stationnaire des bactéries à Gram positif, ce qui mène à une diminution drastique de la viabilité cellulaire. Quand la relacine est ajoutée à des colonies de *Bacillus subtilis* sporulantes, elle perturbe la formation de spores peu importe le moment où elle est ajoutée. La formation de spores est également gênée dans la bactérie pathogénique *Bacillus anthrax*. La relacine est à présent considérée comme un nouvel analogue du (p)ppGpp, ce qui en fait un agent antibiotique avec une activité antipersisters (161).

De même, l'inhibition de la réponse SOS ou de la réponse au stress oxydant peut être envisagée. Ainsi, des bactériophages peuvent être conçus pour surexprimer des protéines en particulier et attaquer des réseaux de gènes qui ne sont pas directement ciblés par les antibiotiques. Par exemple, il a été montré que la suppression des gènes impliqués dans la réponse SOS chez *E. coli* via un bactériophage augmente l'efficacité des *in vitro* (156).

*In vivo*, la suppression des gènes de la réponse SOS par un bactériophage augmente de façon significative la survie des souris infectées. De plus, il a été démontré que ces bactériophages pouvaient améliorer l'élimination des bactéries résistantes aux antibiotiques, des cellules persistantes, planctoniques ou au sein d'un biofilm ainsi que diminuer l'apparition de résistances chez les populations bactériennes traitées. En effet, la réponse SOS est impliquée dans tous ces mécanismes, y compris dans la fréquence d'apparition de mutations *de novo* (117). Les bactériophages peuvent donc agir comme un puissant adjuvant pour augmenter l'efficacité d'antibiotiques bactéricides tels que des aminoglycosides et des bêta-lactamines (156).

Un autre traitement qui peut être utilisé pour limiter la formation de bactéries persistantes est le traitement d'une culture avec du monoxyde d'azote (NO) qui inhibe également la respiration en phase stationnaire chez *E. coli*. Récemment, il a été établi qu'en ciblant la respiration de *E. coli* non métaboliquement actives, on pouvait viser les bactéries persistantes. Le NO diminue la dégradation de protéines et d'ARN pendant la phase stationnaire. De plus, en présence de NO, les populations produites sont plus promptes à produire des protéines et rentrer en phase de croissance exponentielle en cas de transfert dans un milieu frais. Ainsi, la présence de NO conditionnerait les bactéries pour rester métaboliquement actives et limiterait ainsi la différenciation en persisters (162,163).

Plusieurs autres molécules ont montré des effets inhibiteurs sur la formation de bactéries persistantes (Tableau VII).

**Tableau VII : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet sur la formation des bactéries persistantes**

| Molécule   | Espèce   | Mécanismes d'action connus   | Référence                                       |
|--|--|--|---|
| <b>Contrôle de la formation de persisters</b>              |  |  |   |
| Benzamide, composés benzimidazole                          | <i>P. aeruginosa</i>   | Inhibition d'un régulon du Quorum sensing                                      | Starkey et al. (2014), Allegretta et al. (2017) |
| Cadaverine   | <i>P. aeruginosa</i>   |  | Manuel et al. (2010)                            |
| Bactériophages conçus par ingénierie                       | <i>E. coli</i>   | Répression de la réponse SOS par un bactériophage                              | Lu and Collins (2009)                           |
| Mesalamine   | <i>E. coli, P. aeruginosa</i>                                    | Augmentation de la sensibilité au stress oxydant                               | Dahl et al. (2017)                              |
| MOPS, osmolytes (tréhalose, batatine, glycérol et glucose) | <i>E. coli</i>   | Inhibition de l'accumulation d'agrégats protéiques                             | Leszczynska et al. (2013)                       |
| N-acétylcystéine   | <i>M. tuberculosis</i>   | Conversion de la cystéine en cystine : active la respiration et le métabolisme | Vilchère et al. (2017)                          |
| NO   | <i>E. coli</i>   | Inhibition de la respiration en phase stationnaire                             | Orman and Brynildsen (2015,2016)                |
| Relacine, inhibiteurs de RelA                              | <i>E. coli, B. subtilis, B. anthracis, Groupe A streptococci</i> | Diminution de l'accumulation de l'alarmone (p)ppGpp                            | Wexselblatt et al. (2010,2012)                  |

## II. Tuer directement les bactéries persistantes

La majorité des antibiotiques agissent en bloquant ou en empêchant le fonctionnement normal d'une fonction spécifique essentielle à la bactérie.

Pour tuer les bactéries chez lesquelles ces mécanismes ne sont pas actifs, donc les bactéries dormantes dont font parties les bactéries persistantes, il faut alors trouver des cibles alternatives telles que la dépolarisation ou la destruction de la membrane, l'inhibition d'enzymes essentielles, la génération de ROS ou le alkylants de l'ADN.

Bien que dormantes, les bactéries ayant un métabolisme réduit ont besoin d'une membrane intègre pour survivre, ainsi des études ont montré que certaines molécules visant à détruire la paroi cellulaire et à dépolariser la membrane seraient efficaces à la fois contre les cellules en division et contre les cellules quiescentes (Tableau VIII).

Par exemple, le HT61 (4-méthyl-8-phénoxy-1-phényl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,2-c]quinoline) est un petit dérivé de quinolone dont la masse moléculaire avoisine les 400 Da et qui est actif contre les bactéries métaboliquement inactives, y compris les bactéries résistantes à la méticilline ainsi que les bactéries résistantes à la mupirocine qui représentent une menace au niveau des infections à *Staphylococcus aureus* (164,165).

Le HT61 agit en dépolarisant la membrane et en détruisant la paroi cellulaire en environ deux heures. Elle est active dans *in vivo* comme *in vitro* et est beaucoup plus efficace que les molécules traditionnelles pour tuer les bactéries quiescentes (6 logs contre 1 log) (164). De plus, elle n'interagit pas avec la mupirocine qui agit en inhibant la synthèse des protéines bactériennes en se fixant de façon réversible et spécifique à l'isoleucyl t-RNA synthétase. De ce fait, la combinaison de HT61 avec de la mupirocine permettrait une efficacité augmentée ainsi qu'une diminution de l'émergence de résistances à la mupirocine qui est très surveillée du fait de l'apparition rapide de résistances peu après sa mise sur le marché (165).

Le HT61 a montré son efficacité lors d'essais cliniques de phase II dans lesquels il augmentait l'effet des antibiotiques conventionnels dans le cadre d'une décolonisation des

voies nasales (2010-021193-11). Il est également actuellement en cours d'essais cliniques de phase II pour comparer les effets de la combinaison HT61/Chlorexidine avec ceux de la mupirocine (2009-017398-39).

Dans la recherche de molécules pouvant affecter l'intégrité de la membrane, des screenings sont effectués pour identifier des molécules pouvant être actives seules ou en combinaison avec un antibiotique afin de cibler les bactéries persistantes. Ainsi, une sélection sur une librairie de petites molécules a permis de mettre en évidence une molécule SPI009 qui, en combinaison avec l'ofloxacine (une fluoroquinolone) réduit le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* persistantes par rapport au nombre de cellules lors d'un traitement avec l'antibiotique seul.

Le 1-((2,4-dichlorophenethyl)amino)-3-phenoxypropan-2-ol (SPI009) a été sélectionné pour une caractérisation plus avancée. La combinaison de SPI009 avec plusieurs antibiotiques de familles ayant des mécanismes d'actions différents réduit le nombre de persisters d'environ  $10^6$  fois et ce, chez les souches de laboratoire comme sur les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*. Une caractérisation plus avancée a révélé que SPI009 avait un effet direct sur la mort de cellules persistantes, et que cet effet ne dépend pas de la présence d'ofloxacine. Il est alors considéré comme un anti-persisters (166).

Le mécanisme d'action du SPI009 a ensuite été étudié plus précisément : il est capable de tuer les bactéries à Gram négatif et à Gram positif et son activité antibiotique est retrouvée à la fois *in vivo* et *in vitro* chez plusieurs modèles d'infections. Il compromet également l'activité biofilmisante des bactéries. Cette activité antibiotique serait due à des dommages importants au niveau de la membrane (42).

L'une des stratégies de screening utilisées pour découvrir de nouveaux anti-infectieux est de se focaliser sur des molécules déjà existantes. Des chercheurs ont trouvé des similarités entre les infections bactériennes et des tumeurs en cours d'expansion. C'est ainsi que plusieurs anticancéreux ont montré des effets sur une souche d'*Acenitobacter baumannii* responsable d'infections récalcitrantes. Il s'agit de l'antimétabolite 5-fluorouracile et de trois alkylants de l'ADN : le cisplatine, la mitomycine C (MMC), et le merphalane (167).

Ces molécules ont été testées sur des isolats cliniques, et la plus efficace de ces trois molécules est la mitomycine C avec une inhibition complète à 25 µg/ml. Elle est également capable de tuer des bactéries en phase stationnaire, des bactéries persistantes ainsi que des bactéries incluses dans un biofilm (167). Les tests ont été effectués sur de nombreuses souches, y compris des souches multi-résistantes notamment à la colistine, et la mitomycine C a un effet similaire sur toutes ces souches.

La colistine est un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines, elle agit par interaction avec les groupes polysaccharides de la membrane bactérienne ce qui rend la membrane perméable : il y a alors une fuite du contenu intracellulaire. Les résistances à la colistine sont encore rares mais ont une capacité de propagation importante, ainsi des politiques de santé publique ont qualifié cet antibiotique comme étant de dernière intention. La découverte de molécules permettant de tuer des bactéries multi-résistantes portant la résistance à la colistine donne un nouvel espoir à l'antibiothérapie.

Bien qu'il existe de nombreuses molécules ayant montré une activité antibiotique sur les bactéries persistantes (Tableau VIII), seulement quelques-unes d'entre elles ont passé la phase des essais cliniques chez l'humain, et en particulier celles qui ont une activité cytolytique (Tableau IX).

La lysine encodée via un bactériophage CF-301 (168,169) a complété la phase I des essais cliniques et est en cours de recrutement pour la phase II, pour évaluer la sécurité, l'efficacité et la pharmacocinétique de CF-301 dans le traitement des infections systémiques à *S. aureus* (NCT03163446) (Tableau IX).

La molécule XF-73, qui est active à la fois sur les cellules métaboliquement actives et sur les cellules dormantes (170) a validé avec succès les tests cliniques de phase I/I-II pour étudier l'activité du principe actif dans des gels à application nasale afin de diminuer la colonisation par *S. aureus* chez le sujet sain (NCT01592214 and NCT02282605) (Tableau IX).

Le PA-824 (ou prétomanide) est une prodrogue du nitroimidazole (171,172) et a récemment passé la phase II des essais cliniques permettant de tester l'activité antibactérienne lors d'un traitement oral de la tuberculose à un stade précoce (NCT00567840) (Tableau IX).

De plus, la combinaison PA-824/moxifloxacine/pyrazinamide a été étudiée sur certains cas de tuberculose pendant 8 semaines, et les résultats semblent avoir été concluants (NCT01498419) (173) (Tableau IX).

**Tableau VIII : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet direct de mort cellulaire sur les bactéries persistantes**

| Molécule  | Espèce                                      | Mécanismes d'action connus  | Référence                                      |
|---|---|---|--|
| <b>Effet direct de mort cellulaire</b>                                |   |   |  |
| 2D-24   | <i>P. aeruginosa</i>                        | Perturbe la membrane bactérienne<br>Augmente l'activité de ciprofloxacine, tobramycine, carbeniciline | Bahar et al. (2015a)                           |
| 5-Iodoindole  | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>           | Formation de persisters<br>Formation de biofilms  | Lee et al. (2016)                              |
| ADC111-ADC113<br>Analogues de :<br>nitrofurantoïne et<br>tilbroquinol | <i>E. coli</i>                              |   | Fleck et al. (2014)                            |
| ADEP4   | <i>S. aureus</i>                            | Active la protéase ClpP<br>Activité protéase non spécifique   | Conlon et al. (2013)                           |
| AM-0016   | <i>M. tuberculosis</i> ,<br><i>M. bovis</i> | Dommages au niveau de la membrane interne<br>Spectre d'activité : Gram positif                        | Zou et al., (2013),<br>Mukherjee et al. (2016) |
| Anthracyclines  | <i>B. burgdorferi</i>                       |   | Feng et al. (2015a)                            |

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| Peptides antimicrobien contenant Trp et Arg | <i>E. coli</i>   | Pénétration à travers la membrane bactérienne   | Chen et al. (2011)                            |
| Art-175                                     | <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>   |   | Briers et al. (2014), Defraigne et al. (2016) |
| Boromycine                                  | <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> | Dépolarisation de la membrane<br>chute de l'ATP et fuite des protéines cytoplasmiques                           | Moreira et al. (2016)                         |
| Carvacrol                                   | <i>B. burgdorferi</i>  | Phase stationnaire<br>corruption de la membrane   | Feng et al. (2017)                            |
| Cisplatine                                  | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>   | Alkylant de l'ADN   | Chowdhury et al. (2016)                       |
| Clofazimine                                 | <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i>   | Stimulation de ROS  | Grant et al. (2012)                           |
| D157070/D155931 (rhodanine)                 | <i>M. tuberculosis</i>   |   | Bryk et al. (2008)                            |
| DG70  | <i>M. tuberculosis</i>   | Inhibition de MenG<br>Synergie avec d'autres antituberculose  | Sukheja et al. (2017)                         |
| Courant électrique                          | <i>P. aeruginosa</i>   | Atteinte de l'intégrité de la membrane, synergie avec la tobramycine  | Niepa et al. (2012, 2016, 2017)               |
| H généré électrochimiquement                | <i>P. aeruginosa</i>   | Augmentation des ROS intracellulaires<br>Atteinte de l'intégrité de la membrane<br>Synergie avec la tobramycine | Sultana et al. (2016)                         |
| Phénazines halogénées                       | <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>M. tuberculosis</i>  |   | Garrison et al. (2015, 2016)                  |

|                    |  |   |  |
|--------------------|--|---|--|
| HT61               | <i>S. aureus</i>   | Dépolarisation de la membrane cellulaire<br>Destruction de la paroi cellulaire<br>Augmente l'activité de Gentamicine, Mupiromyine, Neomycine, Chlorhexidine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | Hu et al. (2010), Hu and Coates (2013), Hubbard et al. 2017        |
| Lassomycine        | <i>M tuberculosis</i>  | Liaison à la ClpC1<br>ATPase : augmentation de l'activité ATPase et inhibition de l'activité protéolytique de ClpP1/P2  | Gavrish et al. (2014)  |
| Lipidated lysine 9 | <i>E. coli, S. aureus</i>  |   | Ghosh et al. (2016)  |
| LysH5; CF-301      | <i>S. epidermidis, S. aureus</i>                                       | Lyse cellulaire via une endolysine  | Gutiérrez et al. (2014), Schuch et al. (2014, 2017)                |
| Mitomycine C       | <i>E. coli, S. aureus, P. aeruginosa B. burgdorferi, A. baumannii,</i> | Alkylants de l'ADN  | Sharma et al. (2015), Kwan et al. (2015), Cruz-Muñiz et al. (2016) |
| NCK-10             | <i>S. aureus</i>   | Dépolarisation de la membrane<br>Perméabilisation membranaire   | Ghosh et al. (2015)  |
| NH125              | <i>S. aureus</i>   | Perméabilisation membranaire  | Kim et al. (2015, 2016)  |
| NH125 analogues    | <i>S. aureus</i>   |   | Basak et al. (2017), Abouelhassan et al. (2017a)                   |
| nTZDpa             | <i>S. aureus</i>   | Dommages membranaires   | Kim et al. (2018)  |

|                                      |   |   |  |
|--------------------------------------|---|---|--|
| Nitroxoline                          | <i>S. aureus</i>  | Chélation du fer et du zinc   | Abouelhassan et al. (2017b)                    |
| PA-824                               | <i>M. tuberculosis</i>  | Donneur de NO intracellulaire   | Lenaerts et al. (2005), Singha et al. (2008)   |
| Piscidine p3                         | <i>P. aeruginosa</i>  | Dommages membranaires<br>Activité endonucléasique                       | Libardo et al. (2017)                          |
| Pyrazinamide, KKL-35                 | <i>M. tuberculosis</i>  | Corruption de la traduction   | Shi et al. (2011), Alumasa et al. (2017)       |
| QACs (QAC-10)                        | <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>E. faecalis</i>   | Dommages membranaires   | Jennings et al. (2014)                         |
| SPI009                               | <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>ESKAPE pathogens</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>S. Typhimurium</i> | Perméabilisation membranaire  | Liebens et al. (2017), Defraigne et al. (2017) |
| Extrait de feuille entière de Stévia | <i>B. burgdorferi</i>   | Entrée de produits phytochimiques<br>Atteinte à la structure du biofilm | Theophilus et al. (2015)                       |
| TCA1                                 | <i>M. tuberculosis</i>  | Diminution de la synthèse de la paroi cellulaire                        | Wang et al. (2013)                             |
| TN-5                                 | <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>   | Interaction avec la membrane bactérienne ?                              | Bahar et al. (2015b)                           |
| Colistine                            | <i>E. coli</i>  | Dommages membranaires ?   | Niu et al. (2015a), Dörr et al. 2010           |
| Tosufloxacin                         | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>   |   | Niu et al. (2015a,b)                           |
| XF-70 and XF-73                      | <i>S. aureus</i>  | Atteinte de l'intégrité de la membrane                                  | Ooi et al. (2009a,b)                           |
| Métronidazole                        | <i>M. tuberculosis</i> et <i>B. burgdorferi</i>   | Liaison covalente à l'ADN, à des protéines, à la membrane bactérienne   | Keren et al. (2012), Wayne and Sramek (1994)   |

Tableau IX : Tableau non exhaustif des essais cliniques les plus récents de molécules prometteuses

| Composé     | Essais  | Type d'essai clinique  | Nombre de patients | Type d'infection                    | Date du début des essais | Etat des essais cliniques           |
|-------------|---|--|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <b>HT61</b> | Gel contenant 1% de HT61 appliqué une à trois fois  | Simple aveugle contrôlé par placebo sur un seul centre pendant une semaine | 12                 | Infection nasale à <i>S. aureus</i> | 18/06/2008               | Phase II complétée                  |
|             | Gel contenant 2% de HT61 et de la chlorhexidine pour application externe                    | Essai ouvert, randomisée, avec doses multiples de HT61                     | 33                 | Infection nasale à <i>S. aureus</i> | 14/09/2010               | Phase II complétée                  |
|             | Gel contenant 1% de HT61 et de la chlorhexidine pour application externe                    | Double aveugle randomisé, contrôlé par placebo                             | 56                 | Infection nasale à <i>S. aureus</i> | 02/02/2010               | <b>Phase III</b><br><b>En cours</b> |
|             | Comparaison du HT61 avec :<br>- Nasaseptine<br>- Neomycine<br>- Chlorhexidine hydrochloride | Essai ouvert, doses multiples  | 96                 | Infection nasale à <i>S. aureus</i> | 21/02/2012               | Phase arrêté prématurément          |

|                 |   |  |                       |   |            |                                    |
|-----------------|---|--|-----------------------|---|------------|------------------------------------|
| <b>CF-301</b>   | Solution concentrée pour infusion   | Double aveugle contrôlé par placebo sur plusieurs centres            | 115 (dans les 5 pays) | Infection systémique à <i>S. aureus</i> | 02/22/2017 | <b>Phase II</b><br><b>En cours</b> |
| <b>Mannitol</b> | Inhalation sur le long terme de poudre de manitol   | Essai ouvert randomisé à double aveugle contrôlé par placebo         | 6                     | Mucoviscidose                           | 27/09/2007 | Phase III complétée                |
|                 | Inhalation sur le long terme de poudre de manitol   | Essai ouvert randomisé à double aveugle contrôlé par placebo         | 2                     | Mucoviscidose                           | 14/03/2017 | Phase III arrêtée prématurément    |
| <b>PA-824</b>   | Administration par voie orale de doses de 200, 600, et 1200 mg par jour PA-824 en comprimés   | Essai randomisé à dose unique, en quadruple aveugle                  | 69                    | Tuberculose pulmonaire récente          | Aout 2007  | Phase II complétée                 |
|                 | Comparaison des combinaisons :<br>- PA-824 (200mg) + rifampine (600 mg)<br>- PA-824 (200mg) + rifabutine (300 mg)<br>- Rifampine + Ethambutol | Essai ouvert, sur un seul site, randomisé, trois groupes de patients | 183                   | Tuberculose                             | 29/04/2015 | <b>Phase II</b><br><b>En cours</b> |

|              |   |   |     |  |                |                      |
|--------------|---|---|-----|--|----------------|----------------------|
|              | Comparaison de combinaisons de PA-824 + Bedaquiline + pyrazinamide + Isoniazide/Rifampicine/pyrazinamide/ethambutol à des doses variées | Essai ouvert, partiellement randomisé sur plusieurs centres et quatre groupes de patients | 240 | Tuberculose résistante                   | 23/10/2014     | Phase II complétée   |
|              | Administration orale de PA-824 pendant 14j  | Essai randomisé, à quadruple aveugle  | 69  | Tuberculose                              | Aout 2009      | Phase II complétée   |
| <b>XF-73</b> | Gel contenant 2% de XF-73 et de la chlorhexidine pour application externe   | Essai randomisé à double aveugle, contrôlé par placebo sur un seul centre                 | 60  | Colonisation nasale par <i>S. aureus</i> | Septembre 2014 | Phase I/II complétée |
|              | Gels contenant 2% et 4% de XF-73 appliqués une à trois fois   | Essai randomisé à double aveugle sur plusieurs centres                                    | 48  | Colonisation nasale par <i>S. aureus</i> | Aout 2012      | Phase I complétée    |

### III. Sensibiliser les bactéries persistantes aux antibiotiques

#### A. Stimuler les cibles des antibiotiques et stimuler la sortie de quiescence

L'activité diminuée des principales fonctions vitales des bactéries persistantes diminue, voire fait totalement disparaître l'abondance des cibles des antibiotiques. Des études ont identifié des molécules capables de stimuler l'activité métabolique de *P. aeruginosa* et de *E. coli* (Tableau X).

Le 3-[4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]piperidin-4-ylbiphenyl-4-carboxylate (C10) a été découvert par screening, et cible sélectivement les bactéries persistantes sans affecter les autres bactéries. Le C10 stimule le métabolisme des bactéries persistantes sans affecter la croissance des bactéries « normales ». Ainsi, cette molécule a pour effet de sortir les bactéries persistantes de leur état quiescent et de les rendre de nouveau sensible aux antibiotiques. Ainsi, le C10 ajouté à un traitement par fluoroquinolone diminue drastiquement la fréquence de bactéries persistantes au sein des copies traitées (174).

Une autre molécule capable de stimuler le métabolisme de bactéries quiescentes est l'acide cis-2 décanoïque, qui est un acide gras impliqué dans la signalisation. L'acide cis-2-décanoïque est capable de changer le statut de *P. aeruginosa* et de *E. coli* persistants d'un état dormant vers un état métaboliquement actif sans pour autant augmenter le nombre de cellules. Ce réveil des cellules dormantes est dû à une augmentation de l'activité respiratoire des cellules persistantes ainsi qu'un changement de l'abondance de protéines et une augmentation des niveaux d'expression de plusieurs marqueurs métaboliques tels que l'ARN 16S. La plupart des antibactériens étant actifs sur des cellules métaboliquement actives, l'ajout de l'acide cis-2-décanoïque à des antibiotiques a été testé et ces combinaisons diminuaient drastiquement la survie des cellules ainsi que le nombre de persisters (175).

Alors que la présence d'acide cis-2-décanoïque est corrélée à une augmentation de l'activité respiratoire chez les persisters, il n'est pas utilisé comme source de carbone et ce chez *E. coli* comme chez *P. aeruginosa*. De plus, il n'induit pas d'effet anti-biofilm, ce qui est

plutôt rare chez les molécules anti-persisters. L'acide cis-2-décanoïque serait alors une molécule signal permettant d'activer le métabolisme des bactéries en état de dormance. Cependant, il n'a jamais été montré que la sortie de quiescences des bactéries persistantes était due à une molécule signal (175).

Pourtant dans le même temps, des peptides signaux ont été décrits comme étant également capables de sortir des bactéries de leur état de quiescence. Cette étude, effectuée sur *S. aureus*, montre que les cellules peuvent sortir de quiescence lors de l'addition de surnageant de culture de la même bactérie (provenant de la fin de la phase exponentielle). Après analyse des effets de ce surnageant, il s'est avéré que son activité de sortie de quiescence était due à des peptides sécrétés par les bactéries en croissance (125).

On peut penser que la découverte de ces peptides signaux ou d'autres molécules sécrétées par les bactéries elles-mêmes permettrait de réguler la fraction de persisters au sein de la population. Une mise en contexte de ces molécules au sein de voies métaboliques permettrait également une meilleure compréhension de la sortie de quiescence des bactéries persistantes.

## **B. Stimuler l'entrée d'antibiotique dans la cellule**

Beaucoup d'antibiotiques nécessitent un transport actif pour entrer dans les bactéries, d'où leur inefficacité face à des cellules dormantes.

La Gentamicine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides. Il agit en se liant à l'ARN ribosomique 16S au niveau du site A qui est le site de décodage des codons de l'ARN messenger. La fixation de la Gentamicine corrompt donc la traduction et mène à la synthèse de protéines anormales dont l'accumulation est létale pour la bactérie.

Il a été montré qu'un signal métabolique particulier pouvait permettre aux aminoglycosides de tuer des bactéries *E. coli* et *S. aureus* persistants. Cette potentialisation de l'effet des aminoglycosides est active en conditions aérobies comme anaérobies, et serait due à la génération d'une force proto-motrice qui facilite l'entrée des aminoglycosides. Ainsi, la

combinaison d'aminoglycosides avec des métabolites spécifiques tels que le glucose, le mannitol, le fructose et le glycérol permettrait d'augmenter l'efficacité du traitement sur les cellules dormantes (176).

D'autre part, il a également été montré que la combinaison de Gentamicine et de l'acide aminé L-arginine augmente *in vitro* la sensibilité à la Gentamicine des bactéries planctoniques comme biofilmisées. *In vivo*, les tests sur une application locale de Gentamicine supplémenté de L-arginine ont également montré une éradication quasi complète des bactéries. Cet effet de la L-arginine est dû à la modification du gradient de pH au niveau de la membrane (137).

Les effets de la Gentamicine dépendent de la force proto-motrice qui est composée du potentiel de membrane et de la différence transmembranaire de pH. Alors que le mannitol et le fructose mènent à la formation de NADH, ce qui permet la stimulation de la force proto-motrice à travers une augmentation du potentiel de membrane (176), la L-arginine a un effet sur la différence transmembranaire de pH (137).

L'argent a été utilisé comme antimicrobien depuis l'antiquité, et bien que les mécanismes d'action des ions argent restent encore peu connus, il a été prouvé que l'argent était capable de corrompre plusieurs mécanismes bactériens tels que les ponts disulfures ou l'homéostasie du fer et son métabolisme. L'action de l'argent mène alors à la formation de ROS et augmente la perméabilité membranaire des bactéries Gram négatif. De cette façon, elles sont rendues plus sensibles à l'action de certains antibiotiques. Les ions argent permettraient donc d'augmenter le spectre d'activité des antibiotiques aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et d'ainsi éradiquer les bactéries persistantes ainsi que les biofilms (177).

Plusieurs molécules ont à ce jour montré une activité sur la sensibilisation des bactéries persistantes aux antibiotiques (Tableau X).

**Tableau X : Résumé des molécules décrites dans la littérature connues pour avoir un effet de sensibilisation des bactéries persistantes**

| Molécule                             | Espèce                                   | Mécanismes d'action connus   | Référence                           |
|--------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| <b>Sensibilisation</b>               |  |  |                                     |
| BF8                                  | <i>P. aeruginosa</i>                     | Sensibilité augmentée à Ciprofloxacine, Tobramycine  | Pan et al. (2012, 2013b)            |
| C10                                  | <i>E. coli, P. aeruginosa</i>            | Sortie de quiescence   | Kim et al. (2011)                   |
| Acide cis-2-decenoïque               | <i>P. aeruginosa, E. coli</i>            | Sortie de quiescence   | Marques et al. (2014)               |
| Inhibiteurs de la pompe d'efflux     | <i>E. coli, M. marinum</i>               | Combinaison avec des antibiotiques aux mécanismes d'actions variés                             | Adams et al. (2011), Pu et al. 2016 |
| Bactériophages conçus par ingénierie | <i>E. coli</i>                           | Surexpression d'une protéine   | Lu and Collins (2009)               |
| Glucose                              | <i>S. aureus</i>                         | Sensibilité augmentée à la daptomycine   | Prax et al. (2016)                  |
| GM-CSF                               | <i>P. aeruginosa</i>                     | Sensibilité augmentée à la ciprofloxacine et à la tobramycine                                  | Choudhary et al. (2015)             |
| Choc hypotonique                     | <i>E. coli</i>                           | Augmentation de l'entrée d'aminoglycosides par les canaux à ions                               | Jiafeng et al. (2015)               |
| L-arginine                           | <i>P. aeruginosa, S. aureus, E. coli</i> | Augmentation de la sensibilité à la Gentamicine par modification du gradient de pH membranaire | Lebeaux et al. (2014b)              |

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| L-sérine   | <i>E. coli</i>   | Augmentation de la sensibilité à la Gentamicine par inhibition de la synthèse d'acides aminés et augmentation de l'entrée d'antibiotiques.<br>Combinaison avec l'ofloxacin et la moxifloxacine :<br>Atteinte des clusters Fe-S et augmentation de la production de ROS | Shan et al. (2015),<br>Duan et al. (2016) |
| Métabolites :<br>Glucose, fructose, pyruvate, mannitol | <i>E. coli, S. aureus</i>                                    | Augmentation de la sensibilité à la Gentamicine via une force promotrice au niveau de la membrane.   | Allison et al. (2011a)                    |
| Mannitol   | <i>P. aeruginosa</i>   | Sortie de quiescence   | Barraud et al. (2013)                     |
| Moxifloxacine et gatifloxacine                         | <i>M. tuberculosis, E. coli</i>                              |  | Hu et al. (2003)                          |
| P14LR-kanamycine (P14KanS)                             | <i>S. aureus, S. epidermidis, P.aeruginosa, A. baumannii</i> | Augmentation de la sensibilité à la Kanamycine par atteinte de la membrane cellulaire  | Mohamed et al. (2017)                     |
| Pentobra   | <i>E. coli, S. aureus</i>                                    | Augmentation de l'entrée d'antibiotiques   | Schmidt et al. (2014)                     |
| Ions argent  | <i>E. coli</i>   | Augmentation de la sensibilité à l'ampiciline, à la Gentamicine et à l'ofloxacin par perméabilisation de la membrane   | Morones-Ramirez et al. (2013)             |
| Milieu de culture non-frais                            | <i>S. aureus</i>   | Sortie de quiescence   | Pascoe et al. (2014)                      |

### C. Combiner plusieurs antibiotiques

Des recherches ont montré que les bactéries persistantes aux antibiotiques étaient en réalité composées de plusieurs sous-populations tolérantes à un ou plusieurs antibiotiques (176). L'utilisation simultanée de plusieurs antibiotiques visant des mécanismes différents pourrait réduire considérablement le nombre de persisters (Tableau XI).

La doxycycline ou l'amoxicilline peuvent être utilisées pour tuer *Borrelia burgdorferi*, la bactérie responsable de la maladie de Lyme. Une étude a montré que quatre traitements espacés au ceftriaxone permettaient d'éradiquer les *B. burgdorferi* persistantes *in vitro* en cours de croissance. Cette stratégie antibiotique n'étant pas efficace sur les cultures en phases stationnaires (qui sont plus riches en persisters), il s'est avéré que la combinaison d'un traitement fractionné et d'une autre molécule telle que la daptomycine était efficace. Par ailleurs, la combinaison daptomycine-doxycycline-ceftriaxone est efficace pour tuer les *B. burgdorferi* persistantes, planctoniques comme incluses dans un biofilm, et ce, sans utiliser de stratégie de fractionnement du traitement (178,179).

La colistine est un antibiotique qui cible la membrane bactérienne et qui est très active contre les *E. coli* persistantes à concentrations élevées (25 µg/ml). Au niveau clinique et à plus faible concentration (10 µg/ml), la colistine ne semble pas avoir d'effet sur les *E. coli* persistantes. Cependant, en la combinant avec d'autres molécules telles que la Gentamicine (180), on retrouve une activité anti-persister augmentée par rapport à celle de la Gentamicine seule. Cet effet serait dû à une entrée accrue de la Gentamicine en présence de la colistine. Dans le modèle murin, on retrouve cet effet avec les combinaisons colistine-ofloxacin et colistine-nitrofurantoïne, mais pas avec la Gentamicine.

L'érythromycine est un antibiotique agissant au niveau de la traduction bactérienne capable d'inhiber la mobilité et le quorum sensing de *P. aeruginosa*. Des études ont montré que cette molécule peut augmenter l'efficacité de l'éradication d'un biofilm par la colistine (181).

Ces expériences montrent que l'association d'un antibiotique ciblant une fonction intracellulaire essentielle avec un antibiotique qui atteint à l'intégrité de la membrane peut augmenter significativement l'activité anti-persister (180).

Par ailleurs, l'association de plusieurs antibiotiques de classes mécanistiques différentes permet de limiter l'émergence de nouvelles résistances.

**Tableau XI : Résumé des combinaisons de molécules décrites dans la littérature connues pour avoir montré leur efficacité dans l'éradication de bactéries persistantes**

| Molécule  | Espèce                | Mécanismes d'action connus  | Référence           |
|---|-----------------------|---|---------------------|
| <b>Combinaison de molécules</b>   |                       |   |                     |
| Colistine et Gentamicine, ofloxacin   | <i>E. coli</i>        | Les dommages membranaires provoqués par la colistine augmentent les effets de la Gentamicine et de l'ofloxacin chez les <i>E.coli</i> uropathogènes.  | Cui et al. (2016)   |
| Colistine et érythromycine  | <i>P. aeruginosa</i>  | La combinaison de colistine avec l'érythromycine éradique complètement les populations tolérantes de <i>P. aeruginosa</i>   | Chua et al. (2016)  |
| Daptomycine ou céfoperazone/ doxycycline  | <i>B. burgdorferi</i> | La combinaison d'un antibiotique actif contre les bactéries métaboliquement actives (doxycycline) et d'un antibiotique actif sur les cellules quiescentes (daptomycine, céfoperazone) éradique totalement les cultures en phase stationnaire, y compris les cellules persistantes | Feng et al. (2015b) |
| Ciprofloxacine / vancomycine  | <i>S. epidermidis</i> |   | Yang et al. (2016)  |
| Artémisinine/ céfoperazone/doxycycline et Sulfachlorpyridazine/daptomycine/ doxycycline | <i>B. burgdorferi</i> | Diminution de la formation de persisters par l'amoxicilline   | Feng et al. (2016)  |
| Polymyxine B / méropénème   | <i>A. baumannii</i>   |   | Gallo et al. (2017) |

## Conclusion

La menace représentée par l'antibiorésistance est à présent clairement établie et fortement étudiée, ce qui n'est pas le cas des bactéries persistantes. Pourtant l'insuffisance des antibiotiques modernes devient de plus en plus visible en particulier chez les patients dont le système immunitaire est déficient (patients infectés par le VIH, en cours de chimiothérapie...) et du fait de l'utilisation de matériel invasif tel que des cathéters, des prothèses ou des valves cardiaques. La raison de cette différence entre ces cas particuliers et celui d'une personne saine est un système immunitaire capable d'éliminer les bactéries qui ne sont pas atteintes par les antibiotiques, à savoir des bactéries ancrées dans un biofilm ou alors des bactéries persistantes (ou persisters). Les antibiothérapies actuelles sont efficaces contre des bactéries en cours de croissance mais sont, pour la plupart, inefficaces pendant la phase stationnaire, c'est alors à ce niveau-là que le système immunitaire fait la différence. Les patients immunodéprimés représenteraient environ la moitié des cas d'infections dans les pays développés.

Par ailleurs, les phénomènes de résistance et de persistance ne peuvent être dissociés ; en effet, même au sein des mutants résistants, on retrouve un phénomène de sélection, cette fois pour les colonies produisant le plus haut niveau de bactéries persistantes chez les pathogènes testés : *P. aeruginosa* (159), *E. coli* (83) et *M. tuberculosis* (182). Cependant, une différence flagrante entre la résistance et la persistance est que l'antibiorésistance est très étudiée et que ses phénomènes sont plutôt bien connus, ce qui n'est pas le cas de la persistance.

Les persisters peuvent souvent être tolérants aux antibiotiques via des modes d'actions variés. Selon le paradigme classique de la persistance, cette tolérance est principalement due à un état de dormance et de disparition des cibles des antibiotiques.

La plupart des antibiotiques ciblent des mécanismes propres à la phase de croissance bactérienne tels que l'inhibition de la synthèse protéique, de la synthèse de la paroi

bactérienne ou de la synthèse et de l'utilisation des acides nucléiques. En cas d'arrêt de la croissance, ces cibles sont donc inatteignables voire n'existent qu'en trop faible quantité (comme la topoisomérase 4, cible des quinolones). C'est pourquoi une souche capable de survivre longtemps dans un milieu sans se multiplier devient de fait résistante sans pour autant avoir développé de mécanisme de résistance à proprement parler (c'est-à-dire génétiquement acquise ou innée). Ceci mène à une diminution de l'efficacité des antibiothérapies en particulier dans le cadre de traitements longs, et la prolongation de ces traitements mène à l'acquisition de résistances par transfert horizontal.

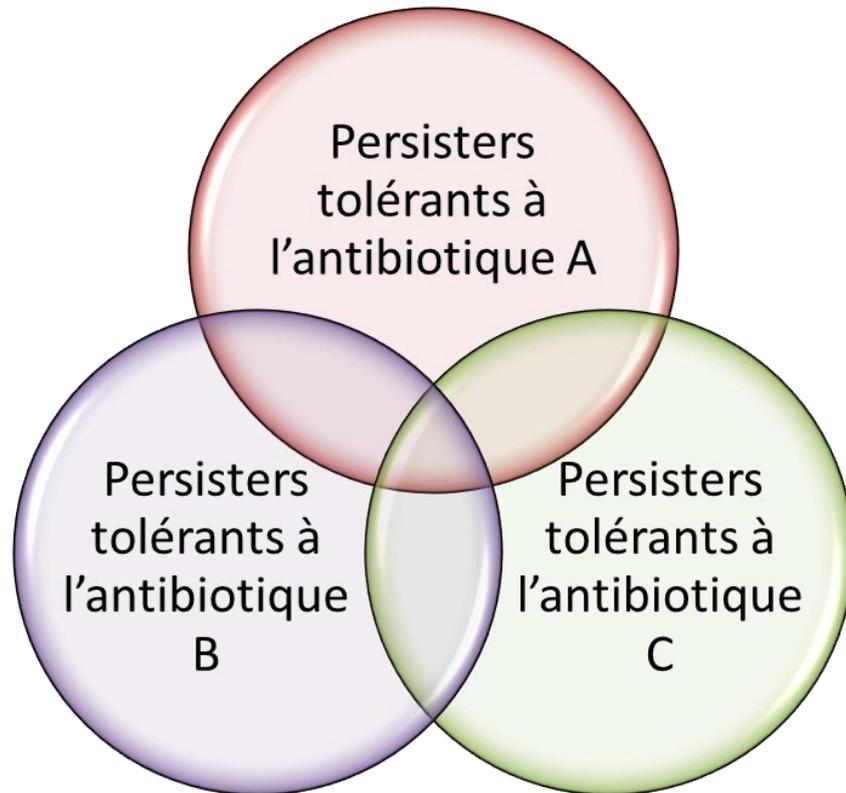
Les connaissances concernant les bactéries persistantes se sont largement étendues, en particulier ces dernières décennies, probablement du fait que ce soit devenu une préoccupation de santé publique et de santé vétérinaire importante, au même titre que les bactéries multi-résistantes. En effet, il s'est avéré que la persistance pouvait avoir un rôle dans l'accroissement des résistances acquises et que les antibiothérapies à répétition pouvaient induire un accroissement de l'abondance en persisters d'une population. La distinction entre résistance et persistance a même été mise à mal dans certains cas (6,183).

L'importance de la problématique que représente la capacité des bactéries à se mettre ainsi en dormance a mené à l'étude des mécanismes impliqués dans la formation de bactéries persistantes, dans leur sortie de dormance, mais également les processus par lesquels les bactéries persistantes sont de fait tolérantes à de nombreux stress. Les informations fondamentales obtenues ont également aidé les chercheurs à approfondir leur étude des conséquences cliniques de l'existence de persisters au sein d'une infection.

Les expériences menées sur les bactéries persistantes ont été faites dans des conditions très variées, ce qui a permis de mettre en exergue des caractéristiques communes aux bactéries persistantes. Par ailleurs, il s'est avéré qu'il n'y avait pas de mécanismes propres aux bactéries persistantes : les bactéries persistantes sont hétérogènes. En effet, bien qu'il existe des persisters tolérants à un antibiotique en particulier, la sous-population représentée par les persisters reste hétérogène en termes de tolérance (Figure 25).

Un persister n'a pas besoin d'être totalement dormant pour être tolérant. Ceci est d'ailleurs cohérent avec l'idée de plus en plus largement répandue selon laquelle la présence

de bactéries persistantes au sein d'une population répond à une stratégie de « bet-hedging », c'est-à-dire une stratégie qui consiste à toujours prévoir une sous-population multi-tolérante afin de survivre en cas de survenue d'un stress.



**Figure 25 : Représentation de l'hétérogénéité des persisters.**

Les bactéries sont persistantes à un antibiotique car le mécanisme ciblé par cet antibiotique est en dormance. Ainsi au sein d'une sous-population de bactéries persistantes, on retrouve plusieurs types de tolérances différents et la population en elle-même est multi-tolérante bien que ce ne soit pas forcément le cas des bactéries persistantes qui la composent.

Par ailleurs, bien que cette stratégie de survie soit communément admise, il a également été montré que les persisters ne sont pas toujours formés de façon stochastique mais qu'ils pouvaient également être induits par un signal environnemental. La différenciation de cellules en bactéries persistantes dépend d'un processus actif (48,162), et elle est fortement activée lors de la réponse stringente, mais également lors du stress oxydatif ou de la réponse SOS.

La nature hétérogène des persisters permet de découvrir sans cesse de nouveaux gènes impliqués dans la persistance et de mieux comprendre les mécanismes impliqués. C'est également une difficulté rencontrée dans l'étude des bactéries persistantes. En effet, même si certains mécanismes sont impliqués de façon indéniable dans les processus de persistance, tels que la toxine de type II HipA, la protéase Lon et l'alarmone (p)ppGpp (111), d'autres mécanismes sont actifs chez certaines bactéries persistantes et pas chez d'autres.

Au début de l'étude des persisters, des tentatives de classier les bactéries persistantes ont vu le jour, en particulier une classification qui consistait à diviser les persisters en deux types. Le type II correspondait aux bactéries persistantes apparues de façon stochastique et le type I, à celles qui apparaissaient en réponse à un stimulus. Cette classification est encore utilisée lorsque l'on veut techniquement différencier ces deux types de persisters. On pourrait également envisager une classification des persisters en fonction des mécanismes qui sont en dormance, ce qui se recouperait avec un spectre de tolérance particulier en fonction des mécanismes visés. Une telle classification permettrait de simplifier la prise en charge thérapeutique.

La quantité d'information concernant les bactéries persistantes est en constante augmentation, néanmoins, les difficultés présentées par leur étude rendent ces connaissances lacunaires. Cependant, l'étude des stratégies anti-persisters apporte également des informations fondamentales. En effet, beaucoup de molécules anti-persisters ont été découvertes par screening, et leur mode d'action a ensuite été étudié. Ces modes d'actions ont parfois pu apporter des informations utiles concernant les métabolismes des bactéries persistantes ou leur entrée en quiescence. De nombreuses molécules ont d'ores et déjà montré une activité anti-persisters. Pour la plupart d'entre elles, il s'agit de porter atteinte à l'intégrité de la membrane. Beaucoup d'entre elles ciblent également toutes les bactéries et pas seulement les bactéries persistantes.

Par ailleurs, les mécanismes qui permettent aux bactéries persistantes de sortir de leur phase de quiescence sont encore peu connus, cependant une stratégie qui consisterait à viser les facteurs favorisant ce processus pourrait être envisagée. En effet, une inhibition irréversible de la sortie de quiescence ne tuerait pas les bactéries persistantes mais inhiberait le processus infectieux.

Une question qui continue de se poser, et ce dans tous les domaines de recherche biomédicale, est celle de la place des modèles expérimentaux *in vivo*, et en particulier, en microbiologie celle des modèles d'infection expérimentaux pour aider à optimiser le traitement des états infectieux graves chez l'homme. En effet, on pourrait considérer que les données *in vitro* intégrées aux données pharmacocinétiques de phase I chez l'homme puissent suffire pour définir la meilleure stratégie d'utilisation des antibiotiques et de traitement des infections bactériennes sévères qui mettent en jeu le pronostic vital. C'est une tendance qui est apparue d'autant plus clairement que les conditions d'utilisation de tels modèles sont devenues complexes et contraignantes, tant au niveau éthique que logistique. Il devient donc nécessaire d'analyser de façon critique les apports de ces modèles et leur significativité. Les modèles *in vivo* ont l'avantage d'intégrer la totalité des effets potentiels d'une modification donnée dans un contexte physiologique (Tableau XII).

**Tableau XII : Résumé des différents modèles d'infection utilisés dans la recherche anti-persisters**

| Composé anti-persisters | Espèce bactérienne      | Type d'infection                | Référence                              |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|--|
| <b>Souris</b>           |                         |                                 |  |
| ADEP4                   | <i>S. aureus</i> (MRSA) | Infection profonde de la cuisse | Conlon et al. (2013)                   |
| CF-301                  | <i>S. aureus</i> (MRSA) | Bactériémie                     | Schuch et al. (2014)                   |
| Colistine + ofloxacine  | <i>E. coli</i>          | Infection du tractus urinaire   | Cui et al. (2016)                      |
| HT61                    | <i>S. aureus</i> (MRSA) | Infection cutanée superficielle | Hu et al. (2010), Hu and Coates (2013) |
| M64                     | <i>P. aeruginosa</i>    | Infection d'une brûlure cutanée | Starkey et al. (2014)                  |

|                          |   |  |   |
|--------------------------|---|--|---|
| Mannitol                 | <i>E. coli</i><br>Uropathogénique   | Infection chronique due à un biofilm sur cathéter dans le tractus urinaire | Allison et al. (2011a)                          |
| NCK-10                   | <i>S. aureus</i> (MRSA)   | Infection d'une lésion cutanée   | Ghosh et al. (2015)                             |
| PA-824                   | <i>M. tuberculosis</i>  | Infection pulmonaire   | Stover et al. (2000),<br>Lenaerts et al. (2005) |
| Ions argent              | <i>E. coli</i>  | Infection chronique due à un biofilm sur cathéter<br>Péritonite            | Morones-Ramirez et al. (2013)                   |
| TCA1                     | <i>M. tuberculosis</i>  | Infection pulmonaire chronique   | Wang et al. (2013)                              |
| <b>Rat</b>               |   |  |   |
| Gentamicine + L-arginine | <i>E. coli</i>  | Infection chronique due à cathéter veineux                                 | Lebeaux et al. (2014b)                          |
| <b>Cochon d'inde</b>     |   |  |   |
| PA-824                   | <i>M. tuberculosis</i>  | Infection pulmonaire   | Stover et al. (2000)                            |
| <b><i>C. elegans</i></b> |   |  |   |
| P14KanS                  | <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ;<br><i>A. baumannii</i> ;<br><i>S. epidermis</i> | Infection du système digestif  | Mohamed et al. (2017)                           |
| SPI009                   | <i>P. aeruginosa</i>  | Infection du système digestif  | Defraigne et al. (2017)                         |

La plupart des thérapies anti-persisters présentées jusqu'à présent ont été testées sur des modèles *in vivo* afin de démontrer leur efficacité, leur comportement pharmacodynamique et pharmacocinétique et leur toxicité. Cependant, il n'existe toujours pas, à ce jour, de modèle animal spécifique à l'étude de bactéries persistantes. Cependant, des persisters ont été

identifiés chez plusieurs modèles d'infection, ce qui permet d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules anti-persisters.

La majorité des modèles étudiés l'ont été chez la souris, mais des thérapies anti-persisters ont également été testées chez le rat, chez le cochon d'inde et chez *C. elegans* (un nématode). Alors que le modèle murin reste populaire, *C. elegans* semble être la pierre angulaire avec des modèles animaux plus complexes. C'est un modèle facile d'utilisation qui n'est pas concerné par les règles éthiques et qui peut donner une première indication de l'efficacité anti-persisters d'un composé. De plus, il s'agit d'un modèle qui peut être utilisé pour plusieurs espèces bactériennes.

D'autres modèles *in vivo* sont utilisés pour étudier les caractéristiques des cellules persistantes (184). Il ne s'agit alors pas de l'étude de l'efficacité de nouvelles thérapies mais bien de l'étude du comportement *in vivo* des cellules persistantes afin de mieux comprendre certains mécanismes. C'est le cas des modèles murins pour l'étude de *S. Typhimurium* (129,185,186) ou le poisson zèbre pour l'étude de *M. marinum* (48). Par exemple, il a été montré que l'hétérogénéité de l'activité de *M. tuberculosis* dans les poumons d'une souris étaient dus à une tolérance interféron- $\gamma$ -dépendante à l'isoniazide (187).

Les essais cliniques chez l'humain répondent, en Europe et aux Etats-Unis, à des réglementations très strictes, rendant difficile le passage aux tests cliniques. Lors de ces essais, il est par exemple nécessaire de décrire très précisément les affections pour lesquelles les nouvelles molécules sont testées, c'est-à-dire dans le cas des bactéries persistantes, le site de l'infection, le type d'infection, la bactérie par laquelle elle est causée etc. En dépit du challenge que représente le développement clinique de composés ayant une activité anti-persisters, plusieurs molécules ou combinaisons de molécules sont actuellement en cours d'essais cliniques pour l'humain. C'est le cas de la prodrogue PA-824 (171,172), des bactériophages CF-301 (168,169), ou de la molécule XF-73 (170), par exemple. Les résultats prometteurs de ces différents essais en phases cliniques ont donné un nouvel espoir à l'essor de nouvelles thérapies antibiotiques capables d'éradiquer les bactéries persistantes.

Une corrélation a souvent été faite entre les tumeurs cancéreuses et les bactéries persistantes du fait de leur caractère persistant *in vivo*. De façon surprenante, il s'est avéré que certains anticancéreux tels que la mitomycine C avaient une activité anti-persisters au-delà de leur activité antibactérienne connue. Ainsi, la résistance à une chimiothérapie peut évoluer de deux façons : le cancer ou l'infection. Les cellules cancéreuses n'ont pas de mémoire, elles évoluent au sein de cellules somatiques et ne se transmettent pas. Les bactéries pathogènes en revanche, ne se contentent pas de développer leurs propres résistances car elles peuvent s'approprier celles d'autres bactéries qui ont évolué pendant des milliers d'années dans l'environnement. De plus, l'infection d'un individu par une bactérie ne menace pas seulement l'individu infecté, mais toute la communauté qui l'entoure, ce qui fait de l'infection bactérienne un challenge mondial / global contre lequel il est important de lutter.

## Bibliographie

1. Guespin-Michel JF. Phenotypic reversion in some early blocked sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. Genetic study of polymyxin resistant partial revertants. *Mol Gen Genet*. 1971;112(3):243-54.
2. Levin BR, Concepción-Acevedo J, Udekwu KI. Persistence: a copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*. oct 2014;21:18-21.
3. Bigger JW. The bactericidal action of penicillin on staphylococcus pyogenes. *Irish Journal of Medical Science*. déc 1944;19(12):585-95.
4. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1 juin 1942;50(2):281-5.
5. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(5):320-30.
6. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*. 10 sept 2004;305(5690):1622-5.
7. Handwerker S, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:349-80.
8. Barry, L. A. et al. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999). [Internet]. [cité 23 août 2018]. Disponible sur: [https://clsi.org/media/1462/m26a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf)
9. Ishida K, Guze PA, Kalmanson GM, Albrandt K, Guze LB. Variables in demonstrating methicillin tolerance in *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 1982;21(4):688-90.
10. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 1990;34(10):1938-43.
11. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 15 janv 2004;230(1):13-8.
12. Pasticci MB, Moretti A, Stagni G, Ravasio V, Soavi L, Raglio A, et al. Bactericidal activity of oxacillin and glycopeptides against *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis: looking for a relationship between tolerance and outcome. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 9 juin 2011;10:26.

13. Fridman O, Goldberg A, Ronin I, Shores N, Balaban NQ. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*. sept 2014;513(7518):418-21.
14. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol*. mai 1986;132(5):1297-304.
15. Regoes RR, Wiuff C, Zappala RM, Garner KN, Baquero F, Levin BR. Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 2004;48(10):3670-6.
16. Johansen HK, Jensen TG, Dessau RB, Lundgren B, Frimodt-Moller N. Antagonism between penicillin and erythromycin against *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*. déc 2000;46(6):973-80.
17. de Steenwinkel JEM, de Knecht GJ, ten Kate MT, van Belkum A, Verbrugh HA, Kremer K, et al. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. déc 2010;65(12):2582-9.
18. Jøers A, Kaldalu N, Tenson T. The Frequency of Persisters in *Escherichia coli* Reflects the Kinetics of Awakening from Dormancy. *Journal of Bacteriology*. 1 juill 2010;192(13):3379-84.
19. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 avr 2008;105(16):6145-9.
20. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol*. 18 mars 2012;8(5):431-3.
21. Hengge R. Stationary-Phase Gene Regulation in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. déc 2011;4(2).
22. Landini P, Egli T, Wolf J, Lacour S.  $\sigma^S$ , a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ Microbiol Rep*. févr 2014;6(1):1-13.
23. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357-72.
24. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*. avr 2014;157(3):539-48.
25. Moyed HS, Bertrand KP. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of bacteriology*. 1983;155(2):768-775.
26. Amato SM, Brynildsen MP. Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. *Curr Biol*. 17 août 2015;25(16):2090-8.

27. Bergh BV den, Michiels JE, Wenseleers T, Windels EM, Boer PV, Kestemont D, et al. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nature Microbiology*. mai 2016;1(5):16020.
28. Stepanyan K, Wenseleers T, Duéñez-Guzmán EA, Muratori F, Van den Bergh B, Verstraeten N, et al. Fitness trade-offs explain low levels of persister cells in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Ecol*. avr 2015;24(7):1572-83.
29. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science*. 10 janv 2014;343(6167):204-8.
30. Stewart B, Rozen DE. Genetic variation for antibiotic persistence in *Escherichia coli*. *Evolution*. mars 2012;66(3):933-9.
31. Hofsteenge N, van Nimwegen E, Silander OK. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiology*. 2013;13(1):25.
32. Wu N, He L, Cui P, Wang W, Yuan Y, Liu S, et al. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol*. 2015;6:1003.
33. Arnoldini M, Mostowy R, Bonhoeffer S, Ackermann M. Evolution of stress response in the face of unreliable environmental signals. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(8):e1002627.
34. de Jong IG, Haccou P, Kuipers OP. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays*. mars 2011;33(3):215-23.
35. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*. avr 2005;169(4):1807-14.
36. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*. 29 août 2013;154(5):1140-50.
37. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*. 12 juin 2006;6:53.
38. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848049>
39. Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol*. juill 2012;5(4):509-22.
40. Goneau LW, Yeoh NS, MacDonald KW, Cadieux PA, Burton JP, Razvi H, et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2089-97.
41. Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2012;56(9):4922-6.

42. Defraigne V, Fauvart M, Michiels J. Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat.* mai 2018;38:12-26.
43. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* déc 2004;186(24):8172-80.
44. Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Mitsuhashi S. Antibacterial activity of ofloxacin and its mode of action. *Infection.* 1 juill 1986;14(4):S226-30.
45. Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* [Internet]. 11 déc 2009;5(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2780357/>
46. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 23 févr 2010;8(2):e1000317.
47. Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, et al. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Mol Cell.* 21 2016;62(2):284-94.
48. Adams KN, Takaki K, Connolly LE, Wiedenhoft H, Winglee K, Humbert O, et al. Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism. *Cell.* 1 avr 2011;145(1):39-53.
49. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance. *Cell Host & Microbe.* 12 juin 2013;13(6):632-42.
50. Al Mamun AAM, Lombardo M-J, Shee C, Lisewski AM, Gonzalez C, Lin D, et al. Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science.* 7 déc 2012;338(6112):1344-8.
51. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science.* 16 déc 2016;354(6318):aaf4268.
52. Cashel M, Gallant J. Two Compounds implicated in the Function of the RC Gene of *Escherichia coli*. *Nature.* mars 1969;221(5183):838-41.
53. Traxler MF, Zacharia VM, Marquardt S, Summers SM, Nguyen H-T, Stark SE, et al. Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the « feast to famine » gradient in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* févr 2011;79(4):830-45.
54. Amato SM, Orman MA, Brynildsen MP. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol Cell.* 23 mai 2013;50(4):475-87.
55. Gao W, Chua K, Davies JK, Newton HJ, Seemann T, Harrison PF, et al. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog.* 10 juin 2010;6(6):e1000944.
56. Yamanaka K, Inouye M. Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the *CspA* family in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* août 1997;179(16):5126-30.

57. Kim Y, Wood TK. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 janv 2010;391(1):209-13.
58. Cyclic AMP Receptor Protein Regulates cspD, a Bacterial Toxin Gene, in *Escherichia coli* [Internet]. [cité 10 août 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993361/>
59. Nakagawa A, Oshima T, Mori H. Identification and characterization of a second, inducible promoter of relA in *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst*. oct 2006;81(5):299-310.
60. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. déc 2001;183(23):6746-51.
61. Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio*. 2011;2(3):e00100-00111.
62. Lago M, Monteil V, Douche T, Guglielmini J, Criscuolo A, Maufrais C, et al. Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/ $\sigma$ S in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation. *Sci Rep*. 18 mai 2017;7(1):2127.
63. Lévi-Meyrueis C, Monteil V, Sismeiro O, Dillies M-A, Monot M, Jagla B, et al. Expanding the RpoS/ $\sigma$ S-network by RNA sequencing and identification of  $\sigma$ S-controlled small RNAs in *Salmonella*. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e96918.
64. Murakami K, Ono T, Viducic D, Kayama S, Mori M, Hirota K, et al. Role for rpoS gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiol Lett*. 1 janv 2005;242(1):161-7.
65. Hansen S, Lewis K, Vulić M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2008;52(8):2718-26.
66. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. juill 2015;59(7):3838-47.
67. Völzing KG, Brynildsen MP. Stationary-Phase Persisters to Ofloxacin Sustain DNA Damage and Require Repair Systems Only during Recovery. *MBio*. 1 sept 2015;6(5):e00731-00715.
68. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppée J-Y, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003144.
69. Czajkowski R, Jafra S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(1):1-16.

70. Möker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules. *J Bacteriol.* avr 2010;192(7):1946-55.
71. Høyland-Kroghsbo NM. Interspecies quorum sensing as a stress-anticipation signal in *E. coli* [PhD Thesis]. University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Biology; 2014.
72. Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:189-213.
73. Leung V, Lévesque CM. A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance. *J Bacteriol.* mai 2012;194(9):2265-74.
74. Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1986;83(10):3116-20.
75. Van Melderen L, Saavedra De Bast M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* mars 2009;5(3):e1000437.
76. Gurnev PA, Ortenberg R, Dörr T, Lewis K, Bezrukov SM. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 30 juill 2012;586(16):2529-34.
77. Wilmaerts D, Bayoumi M, Dewachter L, Knapen W, Mika JT, Hofkens J, et al. The Persistence-Inducing Toxin HokB Forms Dynamic Pores That Cause ATP Leakage. *MBio.* 14 août 2018;9(4).
78. Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Drèze P, Van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* juill 2011;39(13):5513-25.
79. Chan WT, Espinosa M, Yeo CC. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Front Mol Biosci.* 2016;3:9.
80. Schureck MA, Maehigashi T, Miles SJ, Marquez J, Cho SE, Erdman R, et al. Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)<sub>2</sub>-HigB toxin-antitoxin complex. *J Biol Chem.* 10 janv 2014;289(2):1060-70.
81. Bøggild A, Sofos N, Andersen KR, Feddersen A, Easter AD, Passmore LA, et al. The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure.* 10 oct 2012;20(10):1641-8.
82. Li G-Y, Zhang Y, Inouye M, Ikura M. Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *J Biol Chem.* 22 mai 2009;284(21):14628-36.

83. Schumacher MA, Balani P, Min J, Chinnam NB, Hansen S, Vulić M, et al. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature*. 6 août 2015;524(7563):59-64.
84. Hayes F, Kędzierska B. Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins (Basel)*. 15 janv 2014;6(1):337-58.
85. Blower TR, Salmond GPC, Luisi BF. Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners. *Curr Opin Struct Biol*. févr 2011;21(1):109-18.
86. Hayes F, Van Melderen L. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. oct 2011;46(5):386-408.
87. Kędzierska B, Hayes F. Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. *Molecules*. 17 juin 2016;21(6).
88. Yamaguchi Y, Park J-H, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet*. 2011;45:61-79.
89. Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qing G, Inouye M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell*. oct 2003;12(4):913-23.
90. Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*. 5 août 1992;226(3):735-45.
91. Yuan J, Yamaichi Y, Waldor MK. The three vibrio cholerae chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *J Bacteriol*. févr 2011;193(3):611-9.
92. Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A. A Novel Mechanism of Programmed Cell Death in Bacteria by Toxin–Antitoxin Systems Corrupts Peptidoglycan Synthesis. *PLoS Biol* [Internet]. 22 mars 2011;9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062530/>
93. Goeders N, Chai R, Chen B, Day A, Salmond GPC. Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins (Basel)*. 28 sept 2016;8(10).
94. Bélanger M, Moineau S. Mutational Analysis of the Antitoxin in the Lactococcal Type III Toxin-Antitoxin System AbiQ. *Appl Environ Microbiol*. juin 2015;81(11):3848-55.
95. Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 janv 2009;106(3):894-9.
96. Samson JE, Bélanger M, Moineau S. Effect of the abortive infection mechanism and type III toxin/antitoxin system AbiQ on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages. *J Bacteriol*. sept 2013;195(17):3947-56.

97. Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu K-P, Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* juin 2012;84(5):979-89.
98. Wang X, Lord DM, Cheng H-Y, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, et al. A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol.* oct 2012;8(10):855-61.
99. Aakre CD, Phung TN, Huang D, Laub MT. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the  $\beta$  sliding clamp. *Mol Cell.* 12 déc 2013;52(5):617-28.
100. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:103-23.
101. Schuster CF, Bertram R. Toxin-Antitoxin Systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel).* 05 2016;8(5).
102. Albrethsen J, Agner J, Piersma SR, Højrup P, Pham TV, Weldingh K, et al. Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. *Mol Cell Proteomics.* mai 2013;12(5):1180-91.
103. Wang X, Wood TK. Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. *Appl Environ Microbiol.* 15 août 2011;77(16):5577-83.
104. Verstraeten N, Knapen WJ, Kint CI, Liebens V, Van den Bergh B, Dewachter L, et al. Opg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Mol Cell.* 2 juill 2015;59(1):9-21.
105. Cheverton AM, Gollan B, Przydacz M, Wong CT, Mylona A, Hare SA, et al. A *Salmonella* Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. *Mol Cell.* 07 2016;63(1):86-96.
106. Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nature Reviews Microbiology.* août 2013;11(8):587-91.
107. Correia FF, D'Onofrio A, Rejtar T, Li L, Karger BL, Makarova K, et al. Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* déc 2006;188(24):8360-7.
108. Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of hipA, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol.* mai 1986;166(2):399-403.
109. Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol.* nov 2003;50(4):1199-213.
110. Yang QE, Walsh TR. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 1 mai 2017;41(3):343-53.

111. Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 avr 2015;112(16):5171-6.
112. Korch SB, Hill TM. Ectopic overexpression of wild-type and mutant hipA genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J Bacteriol*. juin 2006;188(11):3826-36.
113. Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol Cell*. 24 oct 2013;52(2):248-54.
114. Osbourne DO, Soo VWC, Konieczny I, Wood TK. Polyphosphate, cyclic AMP, guanosine tetraphosphate, and c-di-GMP reduce in vitro Lon activity. *Bioengineered*. août 2014;5(4):264-8.
115. Shan Y, Lazinski D, Rowe S, Camilli A, Lewis K. Genetic Basis of Persister Tolerance to Aminoglycosides in *Escherichia coli*. *mBio* [Internet]. 7 avr 2015;6(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4453570/>
116. Chowdhury N, Kwan BW, McGibbon LC, Babitzke P, Wood TK. Toxin MqsR cleaves single-stranded mRNA with various 5' ends. *Microbiologyopen*. 2016;5(3):370-7.
117. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*. nov 2014;38(6):1126-45.
118. Wagner EGH, Unoson C. The toxin-antitoxin system tisB-istR1: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA Biol*. déc 2012;9(12):1513-9.
119. Vogel J, Argaman L, Wagner EGH, Altuvia S. The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol*. 29 déc 2004;14(24):2271-6.
120. Unoson C, Wagner EGH. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. oct 2008;70(1):258-70.
121. Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EGH. An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell*. 11 mai 2007;26(3):381-92.
122. Brantl S, Jahn N. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiol Rev*. mai 2015;39(3):413-27.
123. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*. 18 mars 2016;12(4):208-14.
124. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*. 18 nov 2011;334(6058):982-6.
125. Pascoe B, Dams L, Wilkinson TS, Harris LG, Bodger O, Mack D, et al. Dormant Cells of *Staphylococcus aureus* Are Resuscitated by Spent Culture Supernatant. *PLoS One* [Internet]. 11 févr 2014;9(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921112/>

126. Laureti L, Matic I, Gutierrez A. Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. *Antibiotics (Basel)*. 14 mars 2013;2(1):100-14.
127. Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance  $\nabla$ . *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2011;55(5):2438-41.
128. Baharoglu Z, Krin E, Mazel D. RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet*. 2013;9(4):e1003421.
129. Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C, Holden DW. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 févr 2010;107(8):3746-51.
130. Blanchard JL, Wholey W-Y, Conlon EM, Pomposiello PJ. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS ONE*. 14 nov 2007;2(11):e1186.
131. Touati D. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*--how many ways are there to trigger soxRS response? *Redox Rep*. 2000;5(5):287-93.
132. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. avr 2011;27(4):405-12.
133. Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol*. juill 2002;45(2):501-10.
134. Pomposiello PJ, Demple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*. 2002;46:319-41.
135. Khakimova M, Ahlgren HG, Harrison JJ, English AM, Nguyen D. The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J Bacteriol*. mai 2013;195(9):2011-20.
136. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. mai 2013;(136):1-51.
137. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. sept 2014;78(3):510-43.
138. Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrêne YF, Gomelsky M, Moroni A, Ramstedt M, et al. Biofilm formation - what we can learn from recent developments. *J Intern Med*. 1 juin 2018;
139. Stewart PS. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr*. juin 2015;3(3).
140. Liu H, Xiao Y, Nie H, Huang Q, Chen W. Influence of (p)ppGpp on biofilm regulation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiol Res*. nov 2017;204:1-8.

141. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr Pharm Des.* 2015;21(1):5-11.
142. Fauvart M, De Grootte VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of Medical Microbiology.* 2011;60(6):699-709.
143. Amato SM, Brynildsen MP. Nutrient Transitions Are a Source of Persisters in *Escherichia coli* Biofilms. *PLoS One* [Internet]. 25 mars 2014;9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965526/>
144. Michiels JE, Van den Bergh B, Verstraeten N, Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist Updat.* 2016;29:76-89.
145. Gutierrez A, Jain S, Bhargava P, Hamblin M, Lobritz MA, Collins JJ. Understanding and Sensitizing Density-Dependent Persistence to Quinolone Antibiotics. *Mol Cell.* 21 déc 2017;68(6):1147-1154.e3.
146. Fung DKC, Chan EWC, Chin ML, Chan RCY. Delineation of a bacterial starvation stress response network which can mediate antibiotic tolerance development. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2010;54(3):1082-93.
147. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* févr 2002;43(3):717-31.
148. Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol* [Internet]. 2016;1. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932909/>
149. Li Y, Zhang Y. PhoU Is a Persistence Switch Involved in Persister Formation and Tolerance to Multiple Antibiotics and Stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2007;51(6):2092-9.
150. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
151. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 28 juill 2014;4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112797/>
152. Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, et al. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol.* 2014;5:70.
153. van Schaik W, Abee T. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol.* avr 2005;16(2):218-24.

154. Onyango LA, Hugh Dunstan R, Roberts TK, Macdonald MM, Gottfries J. Phenotypic variants of staphylococci and their underlying population distributions following exposure to stress. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77614.
155. Sendi P, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*. févr 2009;17(2):54-8.
156. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 mars 2009;106(12):4629-34.
157. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev*. avr 2016;29(2):401-27.
158. Lafleur MD, Qi Q, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persisters mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2010;54(1):39-44.
159. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *J Bacteriol*. 1 déc 2010;192(23):6191-9.
160. Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr Opin Microbiol*. févr 2007;10(1):30-8.
161. Wexselblatt E, Oppenheimer-Shaanan Y, Kaspy I, London N, Schueler-Furman O, Yavin E, et al. Relacin, a Novel Antibacterial Agent Targeting the Stringent Response. *PLoS Pathog* [Internet]. 20 sept 2012;8(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3447753/>
162. Orman MA, Brynildsen MP. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2013;57(7):3230-9.
163. Orman MA, Brynildsen MP. Persister formation in *Escherichia coli* can be inhibited by treatment with nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. avr 2016;93:145-54.
164. Hu Y, Shamaei-Tousi A, Liu Y, Coates A. A New Approach for the Discovery of Antibiotics by Targeting Non-Multiplying Bacteria: A Novel Topical Antibiotic for Staphylococcal Infections. *PLoS One* [Internet]. 27 juill 2010;5(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2910736/>
165. Hu Y, Coates ARM. Enhancement by novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* compound HT61 of the activity of neomycin, gentamicin, mupirocin and chlorhexidine: in vitro and in vivo studies. *J Antimicrob Chemother*. févr 2013;68(2):374-84.
166. Liebens V, Defraigne V, Knapen W, Swings T, Beullens S, Corbau R, et al. Identification of 1-((2,4-Dichlorophenethyl)Amino)-3-Phenoxypropan-2-ol, a Novel Antibacterial Compound Active against Persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 24 août 2017;61(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5571286/>

167. Cruz-Muñiz MY, López-Jacome LE, Hernández-Durán M, Franco-Cendejas R, Licona-Limón P, Ramos-Balderas JL, et al. Repurposing the anticancer drug mitomycin C for the treatment of persistent *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents*. janv 2017;49(1):88-92.
168. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, et al. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis*. 1 mai 2014;209(9):1469-78.
169. Schuch R, Khan BK, Raz A, Rotolo JA, Wittekind M. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(7).
170. Ooi N, Miller K, Hobbs J, Rhys-Williams W, Love W, Chopra I. XF-73, a novel antistaphylococcal membrane-active agent with rapid bactericidal activity. *J Antimicrob Chemother*. oct 2009;64(4):735-40.
171. Lenaerts AJ, Gruppo V, Marietta KS, Johnson CM, Driscoll DK, Tompkins NM, et al. Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of in vitro and in vivo models. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2005;49(6):2294-301.
172. Singh R, Manjunatha U, Boshoff HIM, Ha YH, Niyomrattanakit P, Ledwidge R, et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science*. 28 nov 2008;322(5906):1392-5.
173. Dawson R, Diacon AH, Everitt D, van Niekerk C, Donald PR, Burger DA, et al. Efficiency and safety of the combination of moxifloxacin, pretomanid (PA-824), and pyrazinamide during the first 8 weeks of antituberculosis treatment: a phase 2b, open-label, partly randomised trial in patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Lancet*. 2 mai 2015;385(9979):1738-47.
174. Kim J-S, Heo P, Yang T-J, Lee K-S, Cho D-H, Kim BT, et al. Selective Killing of Bacterial Persisters by a Single Chemical Compound without Affecting Normal Antibiotic-Sensitive Cells  $\nabla$ . *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2011;55(11):5380-3.
175. Marques CNH, Morozov A, Planzos P, Zelaya HM. The Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid Increases Metabolic Activity and Reverts Persister Cells to an Antimicrobial-Susceptible State. *Appl Environ Microbiol*. nov 2014;80(22):6976-91.
176. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-Enabled Eradication of Bacterial Persisters by Aminoglycosides. *Nature*. 12 mai 2011;473(7346):216-20.
177. Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-negative Bacteria. *Sci Transl Med*. 19 juin 2013;5(190):190ra81.
178. Feng J, Zhang S, Shi W, Zhang Y. Ceftriaxone Pulse Dosing Fails to Eradicate Biofilm-Like Microcolony *B. burgdorferi* Persisters Which Are Sterilized by Daptomycin/ Doxycycline/Cefuroxime without Pulse Dosing. *Front Microbiol*. 2016;7:1744.

179. Feng J, Shi W, Zhang S, Zhang Y. Persister mechanisms in *Borrelia burgdorferi*: implications for improved intervention. *Emerg Microbes Infect.* août 2015;4(8):e51.
180. Cui P, Xu T, Zhang W, Zhang Y. Molecular mechanisms of bacterial persistence and phenotypic antibiotic resistance. *Yi Chuan.* 20 2016;38(10):859-71.
181. Chua SL, Yam JKH, Hao P, Adav SS, Salido MM, Liu Y, et al. Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Commun.* 19 févr 2016;7:10750.
182. Torrey HL, Keren I, Via LE, Lee JS, Lewis K. High Persister Mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. Kaufmann GF, éditeur. *PLOS ONE.* 13 mai 2016;11(5):e0155127.
183. Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, Schneider K, Signorino-Gelo F, Leibler S, et al. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science.* 4 janv 2013;339(6115):91-5.
184. Van den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews.* 1 mai 2017;41(3):219-51.
185. Kaiser P, Regoes RR, Dolowschiak T, Wotzka SY, Lengefeld J, Slack E, et al. Cecum Lymph Node Dendritic Cells Harbor Slow-Growing Bacteria Phenotypically Tolerant to Antibiotic Treatment. *PLOS Biology.* févr 2014;12(2):e1001793.
186. Claudi B, Spröte P, Chirkova A, Personnic N, Zankl J, Schürmann N, et al. Phenotypic Variation of *Salmonella* in Host Tissues Delays Eradication by Antimicrobial Chemotherapy. *Cell.* 14 août 2014;158(4):722-33.
187. Dhar N, Manina G. Single-cell analysis of mycobacteria using microfluidics and time-lapse microscopy. *Methods Mol Biol.* 2015;1285:241-56.

## Bactéries persistantes : Vers un nouvel angle d'attaque dans la thérapeutique antimicrobienne ?

Auteur : Metaane Selma  
 Date de soutenance : 8 octobre 2018  
 Directeur de thèse : Pinel Marie-Laure

### Qu'est-ce qu'une bactérie persistante ?

Les bactéries persistantes, à ne pas confondre avec des bactéries résistantes ou avec des bactéries tolérantes, sont une sous-population de bactéries tolérantes au sein d'une population de bactéries sensibles. Généralement, ce sont des bactéries au moins partiellement quiescentes, leur métabolisme est ralenti, mais parfois, il s'agit de bactéries chez lesquelles se déclenche un mécanisme de tolérance à partir d'une certaine dose d'antibiotiques.

Les bactéries persistantes sont :

- ⇒ Peu nombreuses au sein d'une population bactérienne
- ⇒ Quiescentes c'est-à-dire qu'elles ne se multiplient pas
- ⇒ Tolérantes aux antibiotiques
- ⇒ Capables de se multiplier de nouveau à la fin d'une antibiothérapie

**Bactéries résistantes** : portent une modification génétique qui leur permet de survivre aux antibiotiques

**Bactéries sensibles** : meurent en cas d'exposition à des antibiotiques

**Bactéries tolérantes** : sont capables de survivre aux antibiotiques, mais ce n'est pas le fait d'une mutation

**Bactéries persistantes** : sous-population de bactéries tolérantes

### Comment sont-elles persistantes ?

Deux principaux types de persistance

Bactéries persistantes  
Dose-dépendantes

*Si la bactérie est exposée à une dose seuil d'antibiotique, elle activera un mécanisme de tolérance*

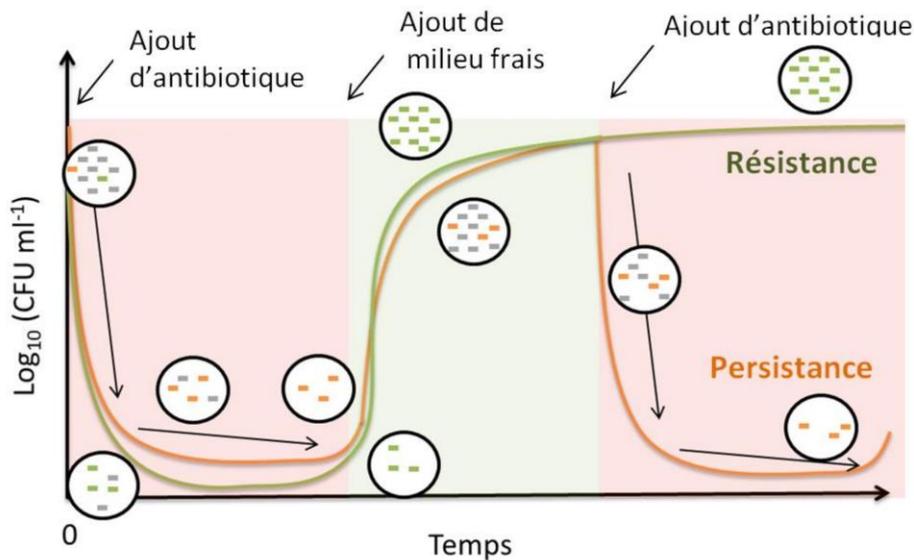
Bactéries persistantes  
Temps-dépendantes

*Les antibiotiques ciblent des mécanismes qui ne fonctionnent pas chez la bactérie puisqu'elle est en quiescence*

### Quelles implications, en pratique ?

Lors d'un traitement antibiotique, les bactéries meurent et on peut voir la population décroître au fil du temps. Cependant, dans le cas de bactéries persistantes, lorsque le traitement antibiotique est terminé et que la population est en contact avec un milieu moins hostile, les bactéries persistantes se multiplient à nouveau. En clinique, on assistera alors à des infections chroniques récurrentes.

Contrairement aux bactéries résistantes, si une population contenant des bactéries persistantes est de nouveau en contact avec un antibiotique, alors on verra de nouveau la population décroître. Ceci est dû au fait qu'en l'absence d'antibiotique, la population est redevenue sensible aux antibiotiques.



### Sont-ils toujours présents ?

Il y a toujours quelques bactéries persistantes dans une population bactérienne, mais il existe quelques facteurs environnementaux qui favorisent la formation de bactéries persistantes :

- La phase stationnaire de croissance
- Les traitements sublétaux d'antibiotiques
- La phagocytose
- La formation de biofilm

### Pourquoi représentent-ils une menace de santé publique ?

La déficience des antibiotiques modernes devient de plus en plus visible, en particulier chez les patients dont le système immunitaire est déficient (patients infectés par le VIH, en cours de chimiothérapie...) et du fait de l'utilisation de matériels invasifs tel que des cathéters, des prothèses ou des valves cardiaques. La différence entre ces cas particuliers et celui d'une personne saine est due à un système immunitaire capable d'éliminer les bactéries qui ne sont pas atteintes par les antibiotiques, à savoir des bactéries ancrées dans un biofilm ou alors des bactéries persistantes. Les antibiothérapies actuelles sont efficaces contre des bactéries en cours de croissance mais sont pour la plupart inefficaces pendant la phase stationnaire, c'est alors à ce niveau-là qu'un système immunitaire actif fait la différence. Les cas particuliers où une déficience immunitaire mène à une maladie chronique représentent environ la moitié des cas d'infections dans les pays développés.

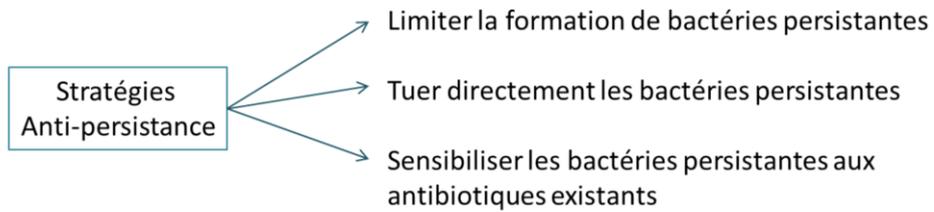
*Une corrélation a souvent été faite entre les tumeurs cancéreuses et les bactéries persistantes du fait de leur caractère persistant in vivo. De façon surprenante, il s'est avéré que certains anticancéreux tels que la mitomycine C avaient une activité anti-persisters au-delà de leur activité antibactérienne connue. Ainsi, la résistance à une chimiothérapie peut évoluer de deux façons : le cancer ou l'infection. Les cellules cancéreuses n'ont pas de mémoire, elles évoluent au sein de cellules somatiques et ne se transmettent pas. Les bactéries pathogènes, en revanche, ne se contentent pas de développer leurs propres résistances car elles peuvent s'approprier celles d'autres bactéries qui ont évolué pendant des milliers d'années dans l'environnement.*

### Existe-t-il des traitements pour les éradiquer ?

La recherche de stratégies antibiotiques pour éradiquer les bactéries persistantes est très active. A ce jour, bien qu'il existe des antibiotiques qui ont une activité anti-persistence, la grande majorité des nouvelles molécules identifiées ciblent la membrane bactérienne, et il semble difficile de trouver des molécules actives *in vivo* capables de cibler les bactéries persistantes *via* d'autres mécanismes.

*Dès la découverte des bactéries persistantes par Joseph Bigger en 1944, des stratégies ont été mises en place pour limiter ce phénomène. La première stratégie proposée par Bigger afin d'éradiquer les bactéries persistantes lors d'une infection consistait à fractionner le traitement antibiotique de façon précise afin de permettre la sortie de quiescence des bactéries persistantes avant de traiter de nouveau la population bactérienne.*

Les stratégies thérapeutiques des antibiothérapies anti-persisters en développement sont basées sur trois principaux mécanismes :



***L'infection d'un individu par une bactérie ne menace pas seulement l'individu lui-même, mais toute la communauté, ce qui fait des infections bactériennes un challenge mondial / global contre lequel il est important de lutter.***

**METAANE, Selma – Bactéries persistantes : Vers un nouvel angle d’attaque dans la thérapeutique antimicrobienne ?**

99 pages, 25 illustrations, 12 tableaux , 30 cm.-

Thèse : Microbiologie ; Rennes 1 ; 2018 ; N° .

**Résumé français**

Le terme « persisters » a été utilisé pour la première fois dans les années 1940 pour qualifier des sous-populations bactériennes de variants phénotypiques capables de survivre à divers chocs tels que des antibiotiques, un stress oxydant ou une variation brutale de pH ou de température. Avec la notion de persisters est apparue l’idée selon laquelle la plupart des antibiotiques ne permettaient pas de stériliser totalement une culture bactérienne, et de ce fait, des stratégies thérapeutiques ont émergé afin d’éradiquer totalement ces persisters.

**Résumé anglais**

The term of « persisters » has been used for the first time in the early 1940s to qualify sub-populations of bacterial phenotypic variants that are able to survive to many stresses such as antibiotics, oxidative stress or a sudden variation of pH or temperature. With the notion of persisters, appeared the idea that most of the antibiotics are not efficient to sterilize completely a bacterial culture. That’s why many therapeutic strategies arose to find a way to fully eradicate these bacterial persisters cells.

Rubrique de classement :                   **MICROBIOLOGIE**

Mots-clés :                                   **Persisters, persistance bactérienne, tolérance aux antibiotiques**

Mots-clés anglais MeSH :                   **Persisters, bacterial persistence, antibiotic tolerance**

Président :                   Mme Odile Sergent

Assesseurs :                   Mme Marie-Laure Pinel [directeur de thèse]  
M. Pierre-Yves Donio  
Mme. Alexandra Maure