

## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 1er juillet 2022

Par

Alice PATRY

Né(e) le 6 septembre 1994 à Le Blanc

### **Étude clinique et moléculaire du système de sécrétion de type VI, un facteur de virulence chez *Acinetobacter baumannii***

Thèse dirigée par Fabien GARNIER

Examineurs :

Mme Sylvie ROGEZ, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie

Mme Marie-Cécile PLOY, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Christophe BURUCOA, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Philippe LANOTTE, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Pharmacie

M. Fabien GARNIER, Praticien hospitalier, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU de Limoges





## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 1er juillet 2022

Par Alice PATRY

Né(e) le 6 septembre 1994 à Le Blanc

### **Étude clinique et moléculaire du système de sécrétion de type VI, un facteur de virulence chez *Acinetobacter baumannii***

Thèse dirigée par Fabien GARNIER

Examineurs :

Mme Sylvie ROGEZ, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie

Mme Marie-Cécile PLOY, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Christophe BURUCOA, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Philippe LANOTTE, Professeur des universités, Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Pharmacie

M. Fabien GARNIER, Praticien hospitalier, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU de Limoges

# Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2021

## Doyen de la Faculté

**Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand**

## Vice-doyen de la Faculté

**Monsieur LÉGER David, Maître de conférences**

## Assesseurs de la Faculté

**Monsieur le Professeur BATTU Serge**

**Monsieur le Professeur PICARD Nicolas**

## Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

<b>M. PICARD Nicolas</b>	Pharmacologie
<b>Mme ROGEZ Sylvie</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>M. SAINT-MARCOUX Franck</b>	Toxicologie

## Professeurs des Universités – Universitaires

<b>M. BATTU Serge</b>	Chimie analytique et bromatologie
<b>M. CARDOT Philippe</b>	Chimie analytique et bromatologie
<b>M. COURTIOUX Bertrand</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>M. DESMOULIERE Alexis</b>	Physiologie
<b>M. DUROUX Jean-Luc</b>	Biophysique et mathématiques
<b>Mme FAGNÈRE Catherine</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. LIAGRE Bertrand</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>Mme MAMBU Lengo</b>	Pharmacognosie
<b>M. TROUILLAS Patrick</b>	Biophysique et mathématiques

**Mme VIANA Marylène** Pharmacie galénique

**Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires**

**M. BARRAUD Olivier (\*)** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme. CHAUZEIX Jasmine** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**M. JOST Jérémie** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Maitres de Conférences des Universités – Universitaires**

**M. BASLY Jean-Philippe (\*)** Chimie analytique et bromatologie

**Mme BEAUBRUN-GIRY Karine** Pharmacie galénique

**Mme BÉGAUD Gaëlle** Chimie analytique et bromatologie

**M. BILLET Fabrice** Physiologie

**M. CALLISTE Claude** Biophysique et mathématiques

**M. CHEMIN Guillaume** Biochimie et biologie moléculaire

**Mme CLÉDAT Dominique** Chimie analytique et bromatologie

**M. COMBY Francis** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Mme COOK-MOREAU Jeanne** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DELEBASSÉE Sylvie** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DEMIOT Claire-Elise (\*)** Pharmacologie

**M. FABRE Gabin** Biophysique et mathématiques

**M. FROISSARD Didier** Botanique et cryptogamie

**Mme JAMBUT Anne-Catherine (\*)** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**M. LABROUSSE Pascal (\*)** Botanique et cryptogamie

**Mme LAVERDET Betty** Pharmacie galénique

<b>M. LAWSON Roland</b>	Pharmacologie
<b>M. LÉGER David</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>Mme MARRE-FOURNIER Françoise</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>M. MERCIER Aurélien</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>Mme MILLOT Marion (*)</b>	Pharmacognosie
<b>Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia</b>	Pharmacie galénique
<b>Mme POUGET Christelle (*)</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. TOUBLET François-Xavier</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. VIGNOLES Philippe (*)</b>	Biophysique et mathématiques

**(\*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)**

**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**

**Mme AUDITEAU Émilie**                      Épidémiologie, statistique, santé publique

**Enseignants d'anglais**

**M. HEGARTY Andrew**                      Chargé de cours

**Mme VERCELLIN Karen**                      Professeur certifié

## Remerciements

---

### Aux membres de ce jury,

À **Mme le Professeur Sylvie ROGEZ**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie pour vos enseignements pendant mes années de pharmacie, qui m'ont donné l'envie de me spécialiser en microbiologie, mais également pour toutes vos connaissances transmises pendant mes semestres. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

À **Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY**, merci de me faire l'honneur d'être membre de ce jury. Merci pour votre accueil au sein de votre service, pour votre bienveillance et pour vos connaissances transmises depuis mon premier semestre. Merci pour nos entretiens qui ont toujours été d'une grande aide pour moi. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

À **M. le Professeur Philippe LANOTTE**, vous me faites l'honneur d'être membre de ce jury, je vous remercie pour votre enthousiasme à la participation de cette thèse. Merci d'avance pour vos retours sur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

À **M. le Professeur Christophe BURUCOA**, vous me faites l'honneur d'être membre de ce jury, je vous remercie pour votre enthousiasme à la participation de cette thèse. Merci d'avance pour vos retours sur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

À **M. le Docteur Fabien GARNIER**, je vous remercie d'avoir dirigé ce travail. Mais également merci pour votre pédagogie, votre bienveillance, votre soutien et votre patience. Merci de m'avoir fait découvrir le versant recherche de notre métier, et surtout merci pour toutes vos connaissances transmises dans ce domaine mais également en paillasse. Merci de m'avoir fait confiance, c'est un plaisir de travailler quotidiennement avec vous. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

### Aux membres du service de BVH,

Merci à tous les biologistes du service pour votre patience en paillasse et vos enseignements. Merci à tous les techniciens avec lesquels j'ai tissé des liens pendant ces deux dernières années. Vous êtes une équipe en or !

### Aux membres de l'UMR 1092,

Un grand merci à Sandra, Margaux, Yohann et Thomas pour avoir contribué à la réalisation de ce travail. Merci d'avoir pris le temps de me former et de répondre à mes questions.

Merci à Medhi et Aurélien pour vos conseils pour mes « *Acineto* » en culture ! Un grand merci à Justine, pour tous nos moments partagés à extraire nos ARN et lancer nos qPCR sans oublier nos multiples mesures de DO ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci également à Éric DURAND, pour nos échanges sur les résultats de ce travail et pour m'avoir éclairée sur mes interrogations.

### **À ma famille,**

À la plus merveilleuse des mamans, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi jusqu'à aujourd'hui. Je n'en serais pas là sans toi. À mon père, tu es présent à ta façon mais je tiens surtout à te remercier pour ce magnifique bolide dont je prends grand soin. Merci à vous deux pour votre amour et votre bienveillance. Je vous aime.

À mon frère, Anthony, merci pour tous ces moments partagés depuis mon enfance. J'en aurai passé des heures sur mon vélo jaune pour faire comme mon grand frère. Tu étais peut-être un peu mon modèle finalement. Bien qu'on soit le jour et la nuit, tu as une place importante dans ma vie.

À mon oncle et ma tante, Francis et Frédérique, merci de m'avoir permise de partir avec vous en vacances toutes ces années et de m'avoir soutenue pendant toutes mes années de fac. Un grand merci à toi tata, pour tous nos échanges et pour ton soutien psychologique pendant toutes ces années.

À mes cousines, Caroline, Mathilde et Mélanie. Tout d'abord merci à toi Caro, pour tous nos moments passés ensemble dans notre enfance, nos balades dans les vignes en Espagne, mais surtout nos moments au bord de la piscine « un coup de bâton, un coup d'épuisette ». Merci à toi, Mathilde, pour ton calme et ta douceur. Tu me fais beaucoup penser à moi, ne change rien tu es parfaite ! Champi, mais où sont passés tes flotteurs, ta bouée, tes palmes et tes lunettes de plongée ? Tu as bien grandi et tu vas bientôt à ton tour aller sur les bancs de la fac, je te souhaite toute la réussite. Enfin merci au gendre préféré de la famille, Alexandre, pour ta bonne humeur à chacune de nos rencontres.

À mon oncle et ma tante, Bernard et Maryse, merci pour tous ces délicieux repas bien riches en calories partagés depuis mon arrivée sur Limoges.

À Pauline, Nicolas et Ciboulette, parce que bon je suis un petit peu votre adolescente 😊 ! Tout d'abord merci à toi Pauline, pour ta présence dans ma vie, pour tous nos moments partagés jusqu'à présent. Ta simple présence me redonne le sourire. Merci pour ton soutien depuis le début de mon internat, pour tous nos échanges sur nos vies futures mais surtout un grand merci pour ton soutien dans l'élaboration de ce travail. À Nicolas, merci pour ces soirées partagées avec Pauline, pour nos quelques parties de Monopoly parce qu'on aime te voir rager pendant tes défaites ! Pour finir, merci à votre merveilleuse fille, pour tous ses sourires charmeurs !

### **À mes co-internes,**

À Selena, merci pour ta présence et surtout merci de me soutenir dans tout. Tu es une personne formidable et tu pourras toujours compter sur moi.

À Lucie, je me souviendrai toujours du jour où je t'ai rencontrée. Ce jour-là je me suis dit « incroyable, enfin quelqu'un qui râle autant que moi ». Finalement tu es peut-être un peu « possédée » !

À Étienne, merci pour tout. N'oublie jamais que si tu gagnes à Mario-Kart c'est parce qu'on t'a tout appris avec Maud !! Merci également à toi Maud, tu es une belle personne. Et surtout mille léchouilles à Moustache !

À Benjamin, merci pour ton aide précieuse dans l'élaboration de ce travail. Merci pour ta patience (oui oui j'ai bien écrit patience), pour tes relectures et tes conseils même si parfois j'ai envie de t'arracher les yeux !

À Fifame, nous devons nous suivre pendant quelques semestres mais finalement nos chemins se sont séparés après nos 7 mois de biochimie ! Merci d'avoir supporté mes humeurs changeantes ma poule.

À mon binôme de TP, Valentin, merci pour tous nos moments passés ensemble à la fac depuis la P2, à ton soutien pendant les révisions du concours ! Et surtout merci de m'avoir hébergée à Rungis 😊 !

À ma Poufsouffle préférée, Cyrielle, merci pour tous nos tests HP réalisés dans le bdi. Finalement on ne sait toujours pas à quelle maison j'appartiens. À Léna, merci pour toutes ces magnifiques vidéos de chaton ! Promis après la thèse, je me mets à insta. À Camille, merci pour ta bonne humeur, tu auras rendu mes séjours à Poitiers nettement plus agréables (malgré quelques galères).

À Émilie, un grand merci pour tes relectures et ton soutien pendant ces deux dernières semaines !

À mes co-internes de BVH, Marwan, Wasfi, Victor, Marie-Sarah, Alix, Émilien, Intissar et Thibaut, Paul-Henri, merci pour tous ces moments partagés pendant nos semestres. Intissar, Alix, Camille, Marwan et Émilien, merci pour votre soutien particulier pendant ces dernières semaines !

À tous mes co-internes, d'un semestre ou plus (n'est-ce pas François !) merci pour toutes nos discussions, pour tous nos moments festifs partagés à l'internat ou ailleurs (Ines, Sarah, Selena, peut-être qu'un jour on arrivera à skier... 😊) !

### **À mes amis,**

À Marion, notre amitié a commencé en maternelle et n'a jamais cessé depuis. Merci de m'avoir soutenue jusqu'à présent.

À Guillaume, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien depuis le lycée. Malgré nos mauvais caractères respectifs, tu es une très belle personne. Je serai toujours présente pour toi.

Au futur grand chercheur, Eddy, merci pour tous nos moments partagés ensemble, les cours, les révisions du concours à la BU et surtout les soirées ! Même si tu es devenu un bobo parisien à bruncher les jours fériés, tu pourras toujours compter sur moi.

À Marie-Fleur, merci pour tous ces moments partagés pendant mon semestre de parasitomyco, pour toutes tes connaissances transmises. Tu es une personnes en or !

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Liste des abréviations

---

*A. baumannii* : *Acinetobacter baumannii*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Asa : Acinetobacter type six secretion system associated

BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

BHI : Brain Heart Infusion

CarO : Carbapenem-associated outer membrane protein

CAZ : Ceftazidime

C3G : Céphalosporine de troisième génération

CIP : Ciprofloxacine

CTX-M : Résistance au céfotaxime

DO : Densité optique

EGM : Élément génétique mobile

FEP : Céfépime

GES : Guyana extended spectrum  $\beta$ -lactamase

GM : Gentamicine

Hcp : Haemolysin co-regulated protein

I : Intermédiaire

IMI : Imipénème

IMP : Active-on-imipenem

ISAbal : *Acinetobacter* insertion sequence

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB : Lysogeny Broth

LPS : Lipopolysaccharide

LVX : Levofloxacine

MEM : Méropénème

NDM : New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase

Omp : Outer membrane protein

OXA : Oxacillinase

PAAR : Proline-alanine, alanine-arginine

PAVM : Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PER : *Pseudomonas* extended resistance

PIP : Pipéracilline

PLP : Protéine liant les pénicillines

PPi : Eau pour préparation injectable

PTZ : Piperacilline-tazobactam

qPCR : PCR quantitative

Qsp : Quantité suffisante pour

R : Résistant

S : Sensible

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SHV : Sulfi-hydroxile variable

STX : Triméthoprime-sulfaméthoxazole

T6SS : Système de sécrétion de type VI

Tag : T6SS associated genes

TCC : Ticarcilline/acide clavulanique

TIC : Ticarcilline

TOB : Tobramycine

Tss : Type six subunit

UV : Ultraviolet

VEB : Vietnam extended spectrum  $\beta$ -lactamase

VIM : Verona integron-mediated metallo- $\beta$ -lactamase

VME : Vésicule de membrane externe

VgrG : Valine-Glycine repeat protein G

## Table des matières

---

Introduction .....	17
I. Caractéristiques de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	18
I.1. Historique du genre <i>Acinetobacter</i> .....	18
I.2. Caractères généraux .....	19
I.3. Réservoir de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	20
I.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> en milieu hospitalier .....	21
I.5. Pouvoir pathogène.....	21
I.5.1. Infections nosocomiales .....	21
I.5.2. Infections communautaires.....	22
II. Problématique de la résistance chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	23
II.1. Définition.....	23
II.2. Résistances aux $\beta$ -lactamines.....	24
II.2.1. Résistances naturelles .....	24
II.2.2. Résistances acquises enzymatiques .....	24
II.2.2.1. Pénicillinases .....	24
II.2.2.2. Surexpression de <i>bla<sub>ampC</sub></i> et de <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> .....	24
II.2.2.3. $\beta$ -lactamases à spectre étendu .....	25
II.2.2.4. Résistances aux carbapénèmes .....	25
II.2.3. Résistances acquises non enzymatiques .....	26
II.3. Autres résistances .....	26
III. Problématique de la virulence chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	29
III.1. Définition.....	29
III.2. Les porines .....	30
III.3. La capsule polysaccharidique et le lipopolysaccharide.....	30
III.4. Les phospholipases .....	31
III.5. Les vésicules de la membrane externe .....	31
III.6. Formation du biofilm.....	31
III.7. Autres mécanismes de virulence .....	32
IV. Le système de sécrétion de type VI .....	33
IV.1. Généralités .....	33
IV.2. Architecture de T6SS.....	34
IV.3. Protéines effectrices de T6SS .....	36
IV.4. Initiation et régulation de l'assemblage .....	37
V. Particularités de T6SS chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
V.1. T6SS chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
V.2. Structure de T6SS chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
V.3. Activité et régulation de T6SS chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	39
VI. Objectifs.....	40
VII. Matériel et méthode .....	41
VII.1. Les souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	41
VII.2. In-Fusion .....	41
VII.2.1. Principe de la méthode In-Fusion.....	41
VII.2.2. Préparation des gènes pour la méthode In-Fusion .....	41
VII.3. Ligature des gènes .....	42

VII.4. Purification.....	42
VII.4.1. Electrophorèse.....	42
VII.4.2. Purification des produits de PCR.....	42
VII.5. Création du plasmide pSU38ΔtotΔ <i>lacZ</i> _hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60.....	42
VII.5.1. <i>Escherichia coli</i> DH5α/pSU38Δtot_ <i>lacZ</i> .....	42
VII.5.2. Extraction du plasmide.....	43
VII.5.3. Digestion du plasmide.....	43
VII.5.4. Ligature vecteur-insert grâce au kit In-Fusion® HD Cloning.....	44
VII.5.5. Transformation par choc thermique.....	44
VII.5.6. Sélection des transformants.....	44
VII.5.7. Extraction du plasmide.....	44
VII.6. Séquençage.....	45
VII.6.1. PCR de séquence.....	45
VII.6.2. Purification des produits de PCR de séquence.....	45
VII.6.3. Séquençage.....	45
VII.7. Test des amorces pour la qPCR.....	46
VII.8. Quantifications des transcrits.....	46
VII.8.1. Mise au point de la qPCR.....	46
VII.8.2. Extractions des ARN des souches.....	46
VII.8.3. Synthèse des ADNc.....	47
VII.8.4. qPCR.....	47
VII.8.5. Analyse statistique et représentation graphique des résultats.....	48
VIII. Résultats.....	49
VIII.1. Mise au point de la qPCR pour l'étude des transcrits.....	49
VIII.1.1. Création du plasmide pSU38ΔtotΔ <i>actZ</i> _hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60.....	49
VIII.1.2. Détermination des conditions pour la qPCR.....	51
VIII.1.3. Détermination du milieu de culture et test des conditions de la qPCR sur les souches T+ et T-.....	53
VIII.1.3.1. Extraction des ARN pour les souches T+ et T-.....	53
VIII.1.3.2. Quantification des transcrits pour les souches T+ et T-.....	53
VIII.1.4. Comparaison de la quantification des transcrits entre les milieux LB et BHI.....	55
VIII.2. Etude des transcrits.....	56
VIII.2.1. Extractions des ARN.....	56
VIII.2.2. Souches T6SS+.....	56
VIII.2.3. Souches T6SS-.....	57
VIII.2.4. Comparaison entre les souches T6SS+ et T6SS-.....	58
IX. Discussion.....	59
Conclusion et perspectives.....	62
Références bibliographiques.....	63
Annexes.....	72
Serment De Galien.....	80

## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Coloration de Gram (A) et culture sur gélose au sang de <i>A. baumannii</i> (B). Images issues d'une collection personnelle. ....	19
<b>Figure 2</b> : Vue d'ensemble des mécanismes de résistance chez <i>A. baumannii</i> , d'après Moubareck <i>et al.</i> , 2020. ....	23
<b>Figure 3</b> : Résumé des mécanismes de virulence chez <i>A. baumannii</i> , d'après Moubareck <i>et al.</i> , 2020. ....	29
<b>Figure 4</b> : Comparaison entre le bactériophage T4 et le système de sécrétion de type VI, d'après Ho BT <i>et al.</i> , 2014. ....	33
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du système de sécrétion de type VI, d'après Cherrak <i>et al.</i> , 2019. ME : membrane externe, MI : membrane interne. ....	35
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique des mécanismes de chargement des effecteurs. Les effecteurs sont représentés par des cercles rouges. Les effecteurs spécialisés sont des protéines PAAR, VgrG ou Hcp avec des extensions codant pour l'effecteur. Les effecteurs de cargaison sont des protéines indépendantes qui s'associent aux composants de l'aiguille (Hcp, VgrG et PAAR). La liaison des effecteurs de cargaison aux composants de l'aiguille pourrait être directe ou médiée par des modules adaptateurs qui sont des protéines indépendantes ou des extensions de VgrG et PAAR (adaptateurs internes), d'après Cherrak <i>et al.</i> , 2019. ....	36
<b>Figure 7</b> : Assemblage et mécanisme d'action de T6SS. La biogenèse de T6SS commence par le positionnement et l'assemblage du complexe membranaire ainsi que par l'assemblage de la plaque basale (1). Le recrutement et l'amarrage de la plaque basale sur le complexe membranaire (2) initie la polymérisation médiée par TssA de la structure tubulaire Hcp/gaine (3 à 5), qui est stoppée lors de l'impact sur la membrane opposée par le bouchon TagA (5). La contraction de la gaine propulse l'aiguille (tube/pointe) dans la cible (6). La ClpV ATPase est recrutée pour recycler les sous-unités de la gaine contractée (6). Les composants de l'aiguille, et les effecteurs qui leurs sont associés, sont délivrés à l'intérieur de la cible (7), d'après Cherrak <i>et al.</i> , 2019. ME : membrane externe, MI : membrane interne, ....	37
<b>Figure 8</b> : Modèle schématique de T6SS chez <i>A. baumannii</i> . Les gènes codant le complexe membranaire, la queue contractile et la plaque basale sont représentés respectivement en bleu, jaune et vert. Les gènes codant une protéine avec une fonction non caractérisée sont représentés en gris. Cinq protéines codées par des gènes uniquement identifiés dans les clusters de gènes de T6SS de <i>A. baumannii</i> sont écrits en gras. Certaines de ces protéines ont une signature protéique membranaire (étoiles vertes) et sont essentielles à la fonctionnalité de T6SS (étoiles rouges) et d'autres non essentielles (étoiles noires). (Étude en cours de publication, E. Durand <i>et al.</i> ) ....	39
<b>Figure 9</b> : Représentation des différents gènes et amorces pour la méthode de clonage In-Fusion. ....	41
<b>Figure 10</b> : Représentation du plasmide pSU38 $\Delta$ tot_ <i>lacZ</i> avant digestion. ....	43
<b>Figure 11</b> : Représentation du plasmide pSU38 $\Delta$ tot $\Delta$ <i>lacZ</i> _ <i>hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60</i> .....	45
<b>Figure 12</b> : Migration sur gel d'agarose 2% des PCR réalisées sur les gènes d'intérêt. ....	49

<b>Figure 13</b> : Migration sur gel d'agarose 2% des fragments <i>cnp60-rpoB</i> et <i>1301-tssM</i> (A) et migration sur gel d'agarose 0,8% du fragment <i>cnp60-rpoB-1301-tssM-hcp</i> (B). .....	50
<b>Figure 14</b> : Aspect de la gamme (A) et détermination de l'efficacité de la gamme étalon et du R <sup>2</sup> de la droite de régression (B) pour le gène <i>tssM</i> .....	52
<b>Figure 15</b> : Migration des ARN pour les souches T+ et T- en milieu LB. ....	53
<b>Figure 16</b> : Expression des gènes des souches T+ et T- en milieu LB (A) et BHI (B).....	54
<b>Figure 17</b> : Différence d'expression des transcrits pour les trois gènes pour les souches T+ et T- .....	54
<b>Figure 18</b> : Comparaison de l'expression des transcrits pour la souche T+ en milieu LB et BHI .....	55
<b>Figure 19</b> : Comparaison de l'expression des transcrits pour la souche T- en milieu LB et BHI .....	55
<b>Figure 20</b> : Résultat de la quantification des transcrits de <i>hcp</i> (A), de <i>tssM</i> (B) et de <i>1301</i> (C) pour les souches T6SS+ .....	56
<b>Figure 21</b> : Résultat de la quantification des transcrits de <i>hcp</i> (A), de <i>tssM</i> (B) et de <i>1301</i> (C) pour les souches T6SS- .....	57
<b>Figure 22</b> : Comparaison de la quantification des transcrits de <i>tssM</i> (A), de <i>hcp</i> (B) et de <i>1301</i> (C).....	58

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Résumé des mécanismes de résistances aux antibiotiques chez <i>A. baumannii</i> , adapté d'après Moubareck <i>et al.</i> , 2020.....	28
<b>Tableau 2</b> : Volume de chaque réactif pour réaliser le clonage avec le kit In-Fusion .....	44
<b>Tableau 3</b> : Volume de chaque réactif pour réaliser la synthèse des ADNc .....	47
<b>Tableau 4</b> : Tableau récapitulatif des volumes pour la qPCR des gènes <i>cnp60</i> , <i>1301</i> , <i>tssM</i> , <i>Hcp</i> .....	48
<b>Tableau 5</b> : Résumé des efficacités et des R <sup>2</sup> obtenus pour les différentes concentrations finales en amorces pour chacun des gènes ciblés.....	51

## Introduction

---

Les antibiotiques sont essentiels pour la prévention et le traitement des infections bactériennes en santé humaine. Cependant, l'émergence de bactéries multirésistantes compromet leur efficacité. *Acinetobacter baumannii* est une bactérie particulièrement crainte en milieu hospitalier du fait de son implication dans les infections nosocomiales mais aussi par sa capacité à persister dans l'environnement hospitalier. Elle est également capable d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques pouvant engendrer des situations d'impasse thérapeutique. Afin de parvenir à traiter les patients dans ces situations, de nouvelles options thérapeutiques sont nécessaires de toute urgence.

Une nouvelle stratégie a récemment vu le jour : le blocage des facteurs de virulence. En effet, les molécules anti-virulences pourraient être une alternative prometteuse aux traitements antibiotiques conventionnels. Un des avantages de cette stratégie est la moindre pression de sélection. Les connaissances sur les nombreux facteurs de virulence de *A. baumannii* ne cessent d'augmenter ces dernières années. Ainsi, dans cette étude, nous avons ciblé une nanomachine de virulence : le système de sécrétion de type VI.

# I. Caractéristiques de *Acinetobacter baumannii*

---

## I.1. Historique du genre *Acinetobacter*

Le genre *Acinetobacter* a connu d'importantes variations taxonomiques au cours des dernières décennies. L'histoire de ce genre a débuté en 1911 lorsque le microbiologiste néerlandais Martinus W. Beijerinck a isolé du sol un micro-organisme nommé *Micrococcus calcoaceticus* à l'aide d'un milieu minimal contenant de l'acétate de calcium (1). Par la suite, plusieurs micro-organismes similaires ont été décrits et attribués à au moins 15 genres et espèces différents, dont *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* et *Achromobacter mucosus* (1).

La désignation du genre *Acinetobacter* (du grec ακίνητος [akinetos] signifiant non mobile) a été proposée en 1954 par Brisou et Prévot afin de séparer les micro-organismes mobiles des micro-organismes immobiles au sein du genre *Achromobacter* (2). Il aura fallu attendre 1968 pour que cette désignation soit acceptée lorsque Baumann *et al.* réalisèrent une étude approfondie des micro-organismes cités précédemment et conclurent leur appartenance à un seul genre (3). C'est sur la base de cette étude que le genre *Acinetobacter* a officiellement été reconnu par le sous-comité sur la taxonomie de *Moraxella* et des bactéries apparentées en 1971. D'abord classé dans la famille des *Neisseriaceae*, le genre a rejoint la famille des *Moraxellaceae* en 1991 sur la base d'analyses réalisées sur les ARN ribosomiaux (4).

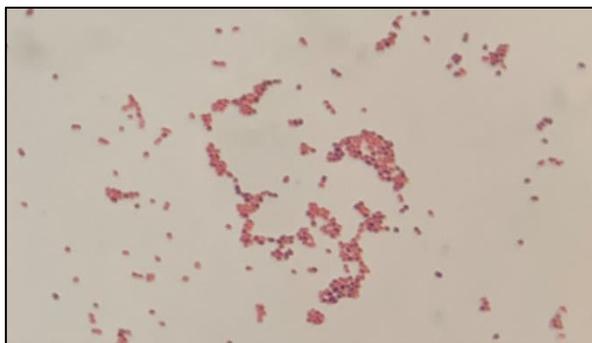
En 1974, dans le « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* », une unique espèce était citée : *A. calcoaceticus*. En revanche, en 1980, deux espèces étaient citées pour le genre *Acinetobacter* dans « *Approved Lists of Bacterial Names* » : *A. calcoaceticus* pour les souches oxydant le glucose et *A. lowfii* pour les souches ne l'oxydant pas (1). En 1986, la taxonomie du genre *Acinetobacter* a été remaniée par Bouvet et Grimont sur la base de caractères phénotypiques et d'hybridation ADN-ADN. Ils décrivent ainsi 12 espèces génomiques pour le genre *Acinetobacter*, dont seules les espèces génomiques 2, 4, 5, 7 et 12 se sont vues attribuer un nom : *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* et *A. radioresistens* (5).

## I.2. Caractères généraux

D'un point de vue taxonomique, *A. baumannii* appartient au règne des bactéries, au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Pseudomonadales*, à la famille des *Moraxellaceae* et au genre *Acinetobacter*. Le genre *Acinetobacter* comprend 100 espèces (www.bacterio.net), *A. baumannii* étant l'espèce la plus retrouvée en pathologie humaine.

*A. baumannii* est un bacille ou coccobacille à Gram négatif (figure 1-A), pouvant parfois résister à la décoloration. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, parfois capsulées et ayant comme caractéristiques microbiologiques principales une oxydase négative, une catalase positive, un métabolisme aérobie strict et une absence de fermentation. En phase exponentielle, les bacilles ont des dimensions qui varient entre 0,9 et 1,6  $\mu\text{m}$  pour la largeur et entre 1,5 et 2,5  $\mu\text{m}$  pour la longueur. En phase stationnaire, ils ont une forme plus coccoïde. La teneur en G + C de l'ADN varie entre 39 et 47% (1).

*A. baumannii* est une bactérie non exigeante dont l'isolement en culture peut être obtenu sur des milieux conventionnels (gélose au sang, gélose chocolat) ou sur des milieux permettant l'isolement des bacilles à Gram négatif (gélose MacConkey, gélose Drigalski) entre 30°C et 37°C. Contrairement aux autres espèces du genre *Acinetobacter*, la croissance à 41°C et 44°C est caractéristique de *A. baumannii*. Après 24h à 48h d'incubation, des colonies blanches-grisâtres, brillantes et lisses ou muqueuses sont observées (figure 1-B).



(A)



(B)

**Figure 1 :** Coloration de Gram (A) et culture sur gélose au sang de *A. baumannii* (B). Images issues d'une collection personnelle.

### I.3. Réservoir de *Acinetobacter baumannii*

*A. baumannii* est retrouvé dans l'environnement et a notamment été isolé de prélèvements de sols. Parmi 60 échantillons de sols réalisés dans des sites de la ville de Hong Kong, *A. baumannii* a été isolé dans cinq prélèvements (6). Cette bactérie a également été isolée de prélèvements d'eaux tels que des eaux usées ou dans des aquacultures d'eau douce (7–9). Quelques études ont montré la présence de *A. baumannii* dans des produits de l'alimentation tels que la viande, le poisson, le fromage cru et le lait de vache cru (6,7). Dans une étude réalisée au Royaume-Uni par Berlau *et al.*, 17% des légumes récupérés de supermarchés ou d'épiceries étaient colonisés par des *Acinetobacter spp.* dont *A. baumannii* (10).

Certains animaux sont porteurs asymptomatiques de *A. baumannii* (7). En effet dans une étude s'intéressant au milieu extrahospitalier, 379 échantillons d'animaux différents ont été récupérés et 8% d'entre eux étaient positifs à *A. baumannii* (7). Dans une autre étude menée en Ecosse, des porcs et des bovins d'élevages provenant de différentes exploitations ont été échantillonnés (fèces, peau, narine, oreille) pour l'isolement de *A. baumannii* et la prévalence du portage était de 1,2% (11). Enfin, *A. baumannii* a été isolé chez des animaux hospitalisés et est responsable d'infections nosocomiales au sein de cliniques vétérinaires, principalement dans les unités de soins intensifs (12). Cette bactérie cause différents types d'infections tels que des abcès, des infections urinaires et respiratoires ainsi que des bactériémies chez les chiens, les chats et les chevaux (12,13).

L'étude du portage humain de *A. baumannii* reste rare en communauté. Une étude réalisée aux Royaume-Uni et aux Pays-Bas s'est intéressée à la présence de *A. baumannii* dans des échantillons fécaux d'individus non hospitalisés. Ainsi un taux de portage de 0,8% est retrouvé dans un groupe de 126 individus aux Pays-Bas et de 1% dans un groupe de 100 individus aux Royaume-Uni. Ces résultats suggèrent que l'intestin ne constitue pas un réservoir important pour ce micro-organisme (14). Concernant le portage cutané, quelques études ont envisagé la possibilité que la peau puisse être un réservoir pour *A. baumannii*. Les résultats varient selon les pays : 0,5% pour le Royaume-Uni (15), 2,5% en Allemagne (16), entre 4 et 12% à Honk Kong (17). Un taux de portage de 10,4% au niveau des mains a été décrit aux États-Unis (18).

Devant de tels résultats, il semble difficile de définir un réservoir naturel pour cette espèce bactérienne.

## **I.4. *Acinetobacter baumannii* en milieu hospitalier**

Trois principaux facteurs peuvent contribuer à la persistance de *A. baumannii* en milieu hospitalier à savoir la résistance aux principaux antimicrobiens, la résistance aux désinfectants et la résistance à la dessiccation (1). Ces caractéristiques font de cette bactérie un pathogène redoutable, impliqué dans de nombreuses épidémies (1).

Le matériel médical contaminé utilisé pour la prise en charge des patients peut-être impliqué comme mode de transmission (tubulure de ventilation, respiromètre, dispositif de surveillance de la tension) (19–21). Certains matelas et oreillers se sont aussi avérés contaminés par *Acinetobacter spp.* et peuvent servir de réservoirs lors d'épidémies nosocomiales (22,23). Enfin, la propagation aérienne peut également servir de mode de transmission, Allen et Green étant les premiers à le décrire en 1985 (24). Différents facteurs de risque de colonisation des patients par *A. baumannii* ont été identifiés comme un séjour prolongé à l'hôpital, un séjour en unité de soins intensifs, une alimentation entérale et l'utilisation antérieure d'antibiotique à large spectre (25). Enfin, la colonisation transitoire des mains du personnel soignant après contact avec des patients porteurs de souches de *A. baumannii* peut être aussi impliquée dans la transmission (26).

## **I.5. Pouvoir pathogène**

### **I.5.1. Infections nosocomiales**

*A. baumannii* est responsable d'une grande variété d'infections nosocomiales parmi lesquelles on retrouve les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), les bactériémies, les infections de la peau et des tissus mous ainsi que les méningites post-neurochirurgie (27).

Les infections les plus courantes à *A. baumannii* sont les PAVM et les bactériémies. Les facteurs de risque de développement d'une bactériémie comprennent des facteurs liés au patient, tels que l'immunosuppression ou une intervention chirurgicale lourde, et des facteurs liés aux traitements médicaux, tels que la présence d'un cathéter veineux central ou une ventilation mécanique. Ces facteurs de risque expliquent que les bactériémies surviennent le plus souvent dans les unités de soins intensifs (25). Les taux des PAVM à *A. baumannii* varient en fonction des pays allant de 8% aux Etats-Unis à 14% dans les pays d'Europe. Des taux beaucoup plus élevés sont également observés, allant de 19% en Asie à 50% en Amérique latine (28). Une étude a mis en évidence certains facteurs de risque de PAVM à *A. baumannii* parmi lesquels on retrouve un séjour de longue durée, la durée de la ventilation mécanique, une réintubation, l'utilisation ultérieure d'antibiotiques ainsi qu'un antécédent de bactériémie (29).

La méningite nosocomiale représente une menace croissante dans les unités de soins intensifs de neurochirurgie avec un risque de mortalité élevé (27). Une étude rétrospective incluant 72 patients avec une méningite ou une ventriculite post-chirurgicale à *A. baumannii* a mis en évidence des facteurs de risque de mortalité comme un âge supérieur à 40 ans, la présence d'un drain ventriculaire externe et la présence de comorbidités (diabète et hypertension notamment) (30).

Des surinfections de la peau et des tissus mous avec des souches résistantes ont été décrites dans des services de grands brûlés (31). Récemment, un cas de fasciite nécrosante à *A. baumannii* multi-résistant a été décrit chez une patiente immunodéprimée prise en charge chaque semaine dans une clinique pour un ulcère du membre inférieur gauche (32). Enfin, des infections urinaires, liées à un sondage urinaire à demeure (27), des ostéomyélites (33) et des endocardites ont été rapportées (34).

### **I.5.2. Infections communautaires**

*A. baumannii* est responsable d'infections communautaires survenant essentiellement dans les pays chauds et humides et semblant soumises à une saisonnalité, avec une plus haute incidence sur la période estivale (35). Elles sont associées à des facteurs de risque tels que le diabète, la bronchopneumopathie chronique obstructive, le cancer, l'insuffisance rénale, le tabagisme et la consommation excessive d'alcool (36).

Les pneumonies aiguës communautaires ont principalement été décrites en Chine, à Taïwan et en Australie (27). Ces infections sont caractérisées par une évolution rapide avec une dyspnée, une toux, de la fièvre, une haute incidence de bactériémie, et une évolution rapide vers la détresse respiratoire et le choc septique. Elles sont responsables d'hospitalisations en unité de soins intensifs et sont associées à un taux de mortalité élevé pouvant atteindre 64% (36,37). Des infections de la peau et des tissus mous chez des soldats suite à des blessures ou traumatismes sur des zones de conflits ont été rapportées (38). De rares cas d'infections suite à des catastrophes naturelles (tremblements de terre, tsunamis) ont également été décrits (39,40).

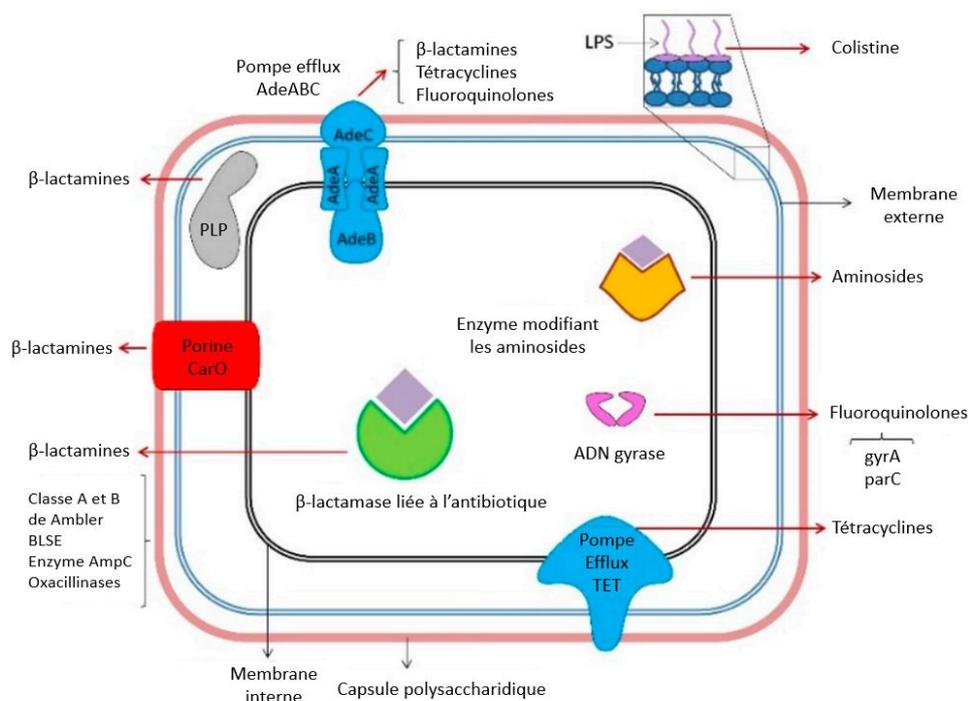
## II. Problématique de la résistance chez *Acinetobacter baumannii*

### II.1. Définition

La résistance aux antibiotiques (ou antibiorésistance) est définie par la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets d'un ou plusieurs antibiotiques, voire une ou plusieurs classes d'antibiotiques. On distingue deux types de résistance :

- la résistance naturelle, liée à la présence de gène de résistance au sein du chromosome de la bactérie ;
- la résistance acquise, liée à des gènes de résistance présents au sein d'éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les plasmides ou les transposons, ou à des mutations au sein du chromosome de la bactérie.

Dans les années 1970, *A. baumannii* était décrit comme un microorganisme sensible à tous les antibiotiques alors disponibles (41). Depuis, de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été décrits pour cette espèce bactérienne et certaines souches sont connues pour être résistantes aux antibiotiques de derniers recours tels que les carbapénèmes. Par conséquent, il est actuellement considéré comme l'un des six agents pathogènes multirésistants les plus courants et les plus graves, avec *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*, également connus sous l'acronyme ESKAPE (42). L'émergence d'une multirésistance aux antibiotiques chez *A. baumannii* constitue un défi supplémentaire dans la prise en charge des patients conduisant l'Organisation mondiale de la Santé à le désigner comme pathogène prioritaire posant une menace pour la santé humaine (43). Les principaux mécanismes de résistance sont résumés sur la figure 2.



**Figure 2 :** Vue d'ensemble des mécanismes de résistance chez *A. baumannii*, d'après Moubareck *et al.*, 2020.

BLSE : β-lactamase à spectre étendu ; PLP : protéine liant les pénicillines ; LPS : lipopolysaccharide

## II.2. Résistances aux $\beta$ -lactamines

### II.2.1. Résistances naturelles

L'étude du génome de *A. baumannii* a révélé la présence d'un gène (*bla<sub>ampC</sub>*) codant une céphalosporinase de classe C de Ambler, dénommée AmpC (44). Un total de 48 variants alléliques ont été décrits pour *A. baumannii* et sont regroupés dans la famille des ADC (Acinebacter-Derived-Cephalosporinase) (45). Le séquençage du génome entier de certaines souches a permis la détection de nouveaux allèles de AmpC, par exemple un nouveau variant allélique codé par *bla<sub>ADC-196</sub>* a récemment été identifié dans un isolat clinique de *A. baumannii* en Chine (46). À la différence de certaines entérobactéries du groupe III, comme *Enterobacter cloacae* ou *Morganella morganii*, la céphalosporinase de *A. baumannii* n'est pas inductible du fait de l'absence de gène régulateur en amont du gène *bla<sub>ampC</sub>*.

D'autre part, *A. baumannii* possède une oxacillinase chromosomique de classe D de Ambler dénommée OXA-51 dont la capacité d'hydrolyse est faible et dont le rôle dans la résistance aux antibiotiques est négligeable (41). À ce jour 95 variants ont été identifiés indiquant que ces enzymes ont été soumises à une pression sélective considérable due à l'utilisation d'antibiotiques (47). Le groupe d'enzyme OXA-51-like, étant omniprésent et spécifique à *A. baumannii*, peut servir de cible pour l'identification de cette espèce bactérienne (48).

### II.2.2. Résistances acquises enzymatiques

#### II.2.2.1. Pénicillinases

Dès le début des années 1980, différentes pénicillinases plasmidiques ont été décrites chez *A. baumannii*. Il s'agit principalement d'enzymes appartenant à la classe A de Ambler (enzymes sérine-dépendantes), à savoir TEM-1 (49) suivi de son variant TEM-2 (50). La pénicillinase CARB-5 a par la suite été décrite, ainsi que SCO-1 (51,52). Ces enzymes confèrent la résistance aux pénicillines à large spectre (ticarcilline et pipéracilline) et sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. L'oxacillinase OXA-21, appartenant à la classe D de Ambler, portée par un intégron et ayant un phénotype de pénicillinase, a été décrite en 1997 (53).

#### II.2.2.2. Surexpression de *bla<sub>ampC</sub>* et de *bla<sub>OXA-51</sub>*

Comme décrit précédemment, *A. baumannii* produit naturellement une céphalosporinase chromosomique. La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est liée à une surexpression de cette enzyme via une séquence d'insertion *ISAb<sub>a1</sub>* située en amont du gène *bla<sub>ampC</sub>*. Cette séquence, apportée par un EGM, est reconnue comme promotrice et permet d'élever significativement le niveau de production de l'enzyme (54). Le céfépime et les carbapénèmes semblent stables vis-à-vis de ces enzymes. De la même manière, lorsque la séquence d'insertion *ISAb<sub>a1</sub>* est située en amont du gène *bla<sub>OXA-51</sub>*, ce dernier tend à augmenter son expression à un niveau conférant une résistance aux carbapénèmes (55).

### II.2.2.3. $\beta$ -lactamases à spectre étendu

L'acquisition de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) chez *A. baumannii* est rare. Les enzymes décrites appartiennent à la classe A de Ambler et sont d'origine plasmidique. Une étude chinoise a rapporté l'émergence d'une souche épidémique comportant une BLSE de type SHV-12 (56). Une autre BLSE de type CTX-M, très répandue chez les entérobactéries, nommée CTX-M-2, a été décrite dans seulement trois souches de *A. baumannii* (57). L'enzyme PER-1, très répandue chez *P. aeruginosa* en Turquie, a été identifiée dans quelques souches de *A. baumannii* (58) notamment en France (59). Par la suite d'autres BLSE ont été identifiées telles que VEB-1, PER-7, TEM-92, SHV-5 et CTX-M-15 (41).

### II.2.2.4. Résistances aux carbapénèmes

La résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* ne cesse d'augmenter ces dernières années. Divers types d'enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes ont été décrits. Les carbapénémases de classe B de Ambler, correspondant à des métallo- $\beta$ -lactamases zinc dépendantes (ou MLB), identifiées à ce jour chez *A. baumannii* appartiennent principalement au groupe IMP avec les variants IMP-1, IMP-2 (60), ainsi qu'au groupe VIM avec par exemple les variants VIM-1 et VIM-2 (60). NDM-2 a été caractérisée chez une souche de *A. baumannii* en Allemagne chez un patient revenant d'Égypte (61).

Les enzymes de type oxacillinases ont été mises en évidence dans des souches de sensibilités intermédiaires ou résistantes à l'imipénème. OXA-23 fut la première enzyme isolée d'une souche de *A. baumannii* en Écosse (62). Depuis, les gènes *bla*<sub>Oxa-23-like</sub> ont été retrouvés partout dans le monde (27). La séquence d'insertion *ISAba1* a également été signalée en amont de gènes *bla*<sub>Oxa-23-like</sub> (47). Le deuxième groupe de type OXA retrouvé chez *A. baumannii* était OXA-24. Renommée par la suite OXA-40, elle a été identifiée dans des isolats en 1997 en Espagne (63). Depuis six autres variants d'OXA24/40 ont été découverts (47). OXA-58 a été identifiée pour la première fois en France en 2003 et ne possède que 3 variants (64). En 2004, trois isolats de *A. baumannii* résistants à presque toutes  $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes, ont été identifiés chez des patients au Brésil (65). La recherche par PCR, dans ces trois souches, de  $\beta$ -lactamases acquises connues comme hydrolysant les carbapénèmes, s'était avérée négative. Une enquête plus approfondie a identifié une nouvelle enzyme, nommée OXA-143 (65). De la même manière, OXA-235, ainsi que deux variants OXA-236 et OXA-237 ont été isolés à partir de souches présentes aux États-Unis et au Mexique (66).

Enfin, des carbapénémases du groupe KPC, KPC-5 (67), KPC-2 et KPC-3 (68) ont été décrites chez *A. baumannii*. Certaines enzymes GES ayant une activité hydrolysante des carbapénèmes, telles que GES-11, ont également été détectées (69).

### II.2.3. Résistances acquises non enzymatiques

La résistance aux  $\beta$ -lactamines est en outre attribuée à des mécanismes non-enzymatiques tels que la modification des protéines liant les pénicillines (PLP), des systèmes d'efflux ou encore une modification de la perméabilité de la membrane externe (27,70,71). Au total, sept PLP modifiées ont été décrites chez *A. baumannii* : PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3, PLP5/6, PLP6b et PLP7/8 (70). Une étude sur un clone endémique résistant aux carbapénèmes dans un hôpital espagnol a identifié une séquence d'insertion perturbant le gène codant la protéine de liaison à la pénicilline PBP6b (également connue sous le nom de dacD) (70). Concernant les systèmes d'efflux, la pompe RND AdeABC est impliquée dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines (71). L'imperméabilité joue également un rôle dans la résistance aux carbapénèmes, notamment par la perte de certaines protéines de surface comme la protéine CarO (27).

### II.3. Autres résistances

La résistance aux aminosides est liée à la production d'enzymes inactivatrices, parmi lesquelles on retrouve les acétyltransférases (AAC), les aminosides nucléotidyltransférases (ANT) et les aminosides phosphotransférases (APH) (41). Ces enzymes modifient les aminosides avec pour conséquence une modification de l'affinité de la molécule pour sa cible. Les gènes codant ces enzymes sont portés par des plasmides, des transposons, ou des cassettes de gène au sein d'intégrons de classe 1 (72). Plus récemment, des ARNr 16S méthylases (ArmA et RmtA) ont été décrites comme conférant une résistance de haut niveau aux aminosides utilisés en clinique (73). Bien que les mécanismes enzymatiques restent le principal mécanisme de résistance, la gentamicine est soumise à un efflux efficace par les pompes de type RND AdeABC (71) et de type MATE AbeM (74), alors que ces deux pompes sont moins efficaces pour extruder les aminosides plus hydrophiles tels que l'amikacine et la kanamycine.

La résistance aux fluoroquinolones est due à des mutations au niveau des gènes *gyrA* et *parC*, codant respectivement pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Pour atteindre un niveau de résistance élevé, plusieurs mutations sont nécessaires (75). Des systèmes d'efflux sont aussi impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones avec les pompes de types RND AdeABC (71) et AdelJK (76), et de type MATE avec AbeM (77).

Semblable à d'autres microorganismes à Gram négatif, la résistance à la tétracycline se produit via des pompes d'efflux (27). Les pompes d'efflux de type RND AdeABC sont là aussi impliquées, mais on retrouve également les pompes d'efflux Tet, avec TetA conférant une résistance à la tétracycline uniquement et TetB entraînant une résistance à la tétracycline et la minocycline (78).

La résistance à la colistine est liée à des modifications au niveau du lipide A du lipopolysaccharide (LPS). Un des mécanismes décrits est lié à l'ajout de phosphoéthanolamine (PetN) au lipide A via une PetN transférase. Celle-ci peut être codée par le gène *pmrC*, dont des mutations au niveau de son opéron *pmrCAB* entraîne une surexpression (79). Des mutations rendant inactifs les gènes nécessaires à la synthèse du lipide A (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*) induisent également une résistance à la colistine (27).

Le tableau 1 résume les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques retrouvés chez *A. baumannii*.

**Tableau 1 :** Résumé des mécanismes de résistances aux antibiotiques chez *A. baumannii*, adapté d'après Moubareck *et al.*, 2020

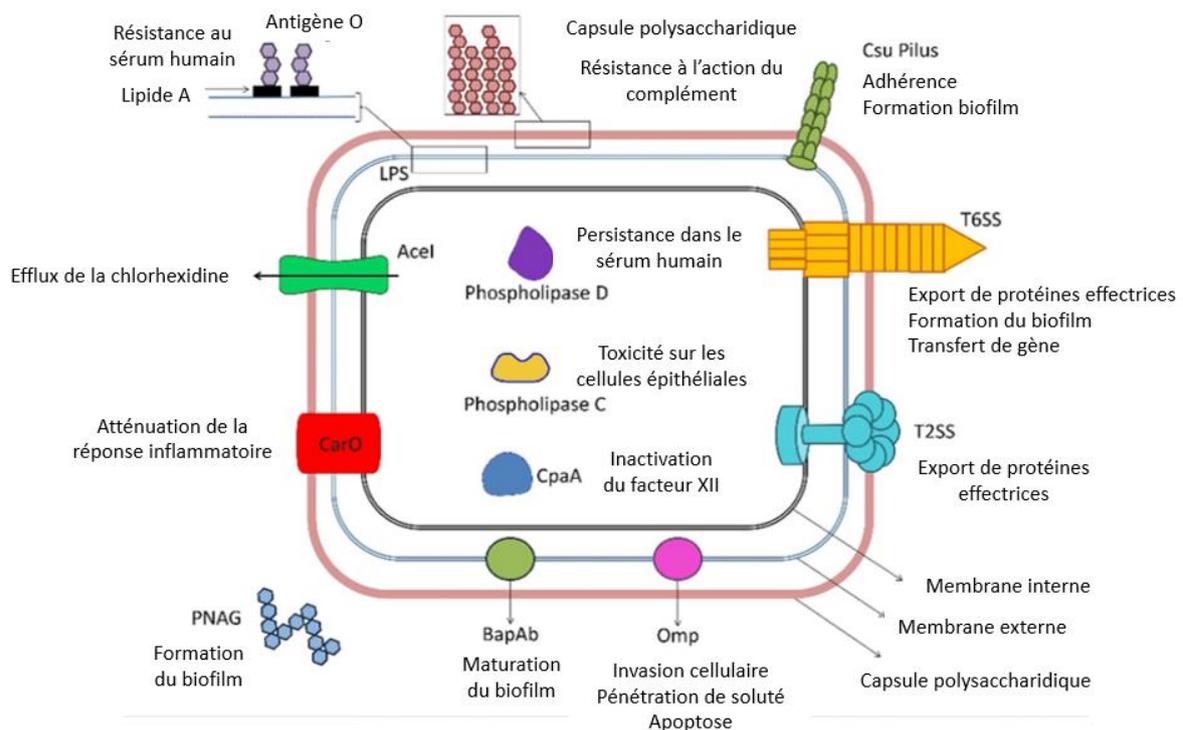
Antibiotiques	Mécanismes de résistances	Enzymes/cibles/ pompes d'efflux	Exemples	Sources
<b>β-lactamines</b>	β-lactamases		Pénicillinases : TEM, CARB, SCO	51-54
		Classe A de Ambler	BLSE : SHV, CTX-M, PER, VEB, TEM	43 ; 58-60
			Carbapénémases : KPC, GES	69-71
		Classe B de Ambler	Carbapénémases : IMP, VIM, NDM	62-63
		Classe C de Ambler	Céphalosporinase : AmpC	46
		Classe D de Ambler	Oxacillinases	64-68
	Perméabilité membrane externe	Perte de porine	Porine CarO	29
	Pompe d'efflux	Famille RND	AdeABC	73
	Modification des PLP	PLP	PLP6b	72
<b>Aminosides</b>	Modifications enzymatiques	Aminosides	AAC, ANT, APH	43
	Mutation	ARNr 16S méthylases	ArmA, RmtA	75
	Pompes d'efflux	Famille RND	AdeABC	73
		Famille MATE	AbeM	76
<b>Fluoroquinolones</b>	Mutations	ADN gyrase	GyrA	77
		ADN topoisomérase IV	ParC	
	Pompes d'efflux	Famille RND	AdeABC, AdeIJK	73 ; 78
		Famille MATE	AbeM	79
<b>Tétracycline</b>	Pompes d'efflux	Famille RND	AdeABC	29
		Tet	TetA et TetB	80
<b>Colistine</b>	Mutation	Lipide A	<i>pmrC</i>	81
			<i>lpxA, lpxC, lpxD</i>	29

### III. Problématique de la virulence chez *Acinetobacter baumannii*

#### III.1. Définition

La virulence bactérienne est définie comme la capacité d'une bactérie à entrer, se multiplier et persister dans un site de l'hôte normalement stérile. Elle représente donc la capacité d'un micro-organisme à causer des dommages chez l'hôte. Elle peut être évaluée expérimentalement par l'estimation du nombre de bactéries nécessaires pour induire une lésion, la maladie ou encore la mort d'un modèle animal. La virulence est donc directement liée à la capacité d'un micro-organisme à déclencher une pathologie malgré les défenses immunitaires de l'hôte.

Un facteur de virulence correspond à toute protéine exprimée ou sécrétée par la bactérie afin de l'aider à franchir les barrières de l'hôte, à provoquer une pathologie ou à échapper au système immunitaire. De nombreux facteurs de virulence ont été décrits chez *A. baumannii* dont certains peuvent servir de potentielles cibles thérapeutiques. Les principaux facteurs de virulence sont représentés sur la figure 3.



**Figure 3 :** Résumé des mécanismes de virulence chez *A. baumannii*, d'après Moubareck *et al.*, 2020.  
PNAG : exopolysaccharide poly- $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine ; Omp : outer membrane protein ; T2SS et T6SS : système de sécrétion de type II et de type VI

### III.2. Les porines

Ces protéines localisées dans la membrane externe permettent de moduler la perméabilité cellulaire. OmpA, protéine de 38 kDa permettant la pénétration de petits solutés, est la principale porine étudiée chez *A. baumannii* et possède plusieurs propriétés biologiques (27). Elle permet l'adhésion et l'invasion par *A. baumannii* des cellules épithéliales de l'hôte via la liaison à la fibronectine (27). OmpA joue également un rôle dans la formation du biofilm, puisque les souches mutantes pour OmpA ne parviennent pas à en produire (80). OmpA peut aussi se lier au facteur H dans le sérum humain, permettant à *A. baumannii* d'éviter la mort médiée par le complément, et ainsi de disséminer dans la circulation sanguine (81). Enfin, les isolats cliniques de *A. baumannii* surexprimant OmpA sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité plus élevées chez les patients (82). Ainsi, en raison de son rôle important dans la pathogénicité de *A. baumannii*, la protéine OmpA est considérée comme une cible potentielle de traitement (80).

La protéine CarO serait impliquée dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales pulmonaires humaines (83). En effet, dans l'étude de *Gema et al.*, la perte de la protéine CarO réduit l'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires. L'adhérence est cependant récupérée après restauration de la protéine CarO dans les mutants  $\Delta$ CarO (83). Enfin une expression accrue de CarO pourrait retarder l'infiltration des polynucléaires neutrophiles via l'atténuation de la réponse inflammatoire dans la trachée et les poumons, et serait ainsi responsable d'une pneumonie sévère (27,84).

Enfin, Omp 33-36, protéine de 33 à 36 kDa, agit comme un canal permettant le passage de l'eau chez *A. baumannii* et dont l'expression est impliquée dans la résistance aux carbapénèmes (27). De plus, dans l'étude de *Rumbo et al.*, les résultats suggèrent que la porine Omp 33-36 pourrait être impliquée dans l'apoptose des cellules humaines (85).

### III.3. La capsule polysaccharidique et le lipopolysaccharide

La capsule polysaccharidique est un facteur de virulence majeur puisqu'elle est responsable de la résistance à la destruction médiée par le complément (86). En effet, les souches dépourvues de capsule sont avirulentes et rapidement éliminées par le complément (86). La capsule crée également une barrière contre les agents désinfectants (27).

Le LPS est composé d'un lipide A, d'un noyau oligosaccharidique et d'un antigène O répétitif. Le rôle du LPS dans la pathogénicité de *A. baumannii* a été déterminé à l'aide de bactéries mutantes dépourvues de glycotransférase LpsB. Il en résulte un LPS hautement tronqué constitué de deux résidus glucidiques associés au lipide A, aboutissant à une moindre résistance vis-à-vis du sérum humain (87). Enfin, dans un modèle murin, l'inhibition de l'enzyme impliquée dans la biosynthèse des lipides A, LpxC, supprimerait l'activation de TLR4 (Toll Like Receptor 4) médiée par le LPS et améliorerait la clairance de *A. baumannii* (88).

### III.4. Les phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes possédant une activité lipolytique contre les phospholipides des membranes cellulaires humaines et sont un facteur de virulence chez de nombreuses bactéries. La phospholipase C et la phospholipase D ont été identifiées comme facteur de virulence chez *A. baumannii* (89,90). La phospholipase D lui permet de persister dans le sérum humain (89), tandis que la phospholipase C est toxique pour les cellules épithéliales (90). Récemment, la protéase CpaA a été identifiée comme un facteur de virulence par sa capacité à inhiber la coagulation sanguine via l'inactivation du facteur XII (91). Ceci permet d'atténuer la formation de thrombus dans les sites intravasculaires et favorise la dissémination sanguine de *A. baumannii* (91).

### III.5. Les vésicules de la membrane externe

Les vésicules de membrane externe (VME) sont des structures sphériques de 20 à 300 nm qui se détachent de la membrane externe afin d'encapsuler des composants de l'espace périplasmique, de la membrane interne ou certaines protéines cytoplasmiques (92). Peu de choses sont décrites sur l'implication des VME dans la pathogenèse de *A. baumannii* mais elles pourraient être impliquées dans le transport de OmpA au sein des mitochondries induisant une fragmentation mitochondriale qui entraîne ultérieurement la mort cellulaire (92,93). Elles sont reconnues comme vésicules d'échanges des effecteurs bactériens aux cellules hôtes. Ainsi, comme OmpA, d'autres facteurs de virulence pourraient être transportés via les VME (93).

### III.6. Formation du biofilm

Comme décrit précédemment, la faculté d'adhérence aux surfaces environnementales et aux équipements médicaux est un élément clé dans la pathogénèse de *A. baumannii*. Cette faculté est en partie liée à la capacité de *A. baumannii* à produire un biofilm (27). Par définition, le biofilm est une matrice extracellulaire recouvrant les micro-organismes, les rendant ainsi résistants à la clairance du système immunitaire et aux antibiotiques (27).

*A. baumannii* possède un système connu sous le nom de pili Csu. L'expression de ces pili induit une forte adhérence aux plastiques hydrophobes (polystyrène, polypropylène, polyéthylène) et est impliquée dans la formation de biofilm (94). Ce système est également associé à la production de la protéine BapAb, similaire à la protéine Bap de *S. aureus*, et est impliqué dans l'adhésion intercellulaire au sein du biofilm mature (95).

La formation du biofilm est également sous la dépendance du quorum sensing, un mode de communication entre les bactéries afin de maintenir la densité de population. Chez *A. baumannii*, le quorum sensing est principalement composé de Abal, de AbaR et de AHL. Des études ont montré que l'atténuation du quorum sensing empêche la formation de biofilm mature (96). La production de l'exopolysaccharide poly- $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine (PNAG) est un facteur notable qui aide *A. baumannii* à produire un biofilm (97).

### III.7. Autres mécanismes de virulence

*A. baumannii* n'a pas de flagelle, d'où son immobilité. Cependant l'analyse de son génome indique des gènes codant l'expression et l'assemblage de pili de type IV. Ces types de pili sont impliqués dans la motilité des contractions et permettent à *A. baumannii* de se propager sur les surfaces (98).

*A. baumannii* est capable de capturer les micronutriments de l'hôte, notamment le fer et le zinc (27). La capture du fer implique des molécules chélatrices appelées sidérophores. Des transporteurs et des récepteurs pour l'absorption directe du fer sont également impliqués, tels que FecA et FecI (27). L'endommagement des transporteurs de fer induit une réduction de la virulence de *A. baumannii* en diminuant la production de biofilm et sa résistance au stress oxydatif (27). Concernant le zinc, son absorption est assurée par le transporteur ZnuABC (27). L'enzyme ZigA GTPase est quant à elle responsable de son métabolisme. Ceci lui permet de contourner la calprotectine, protéine naturellement capable de complexer le zinc et impliquée dans l'inhibition de la croissance bactérienne (27).

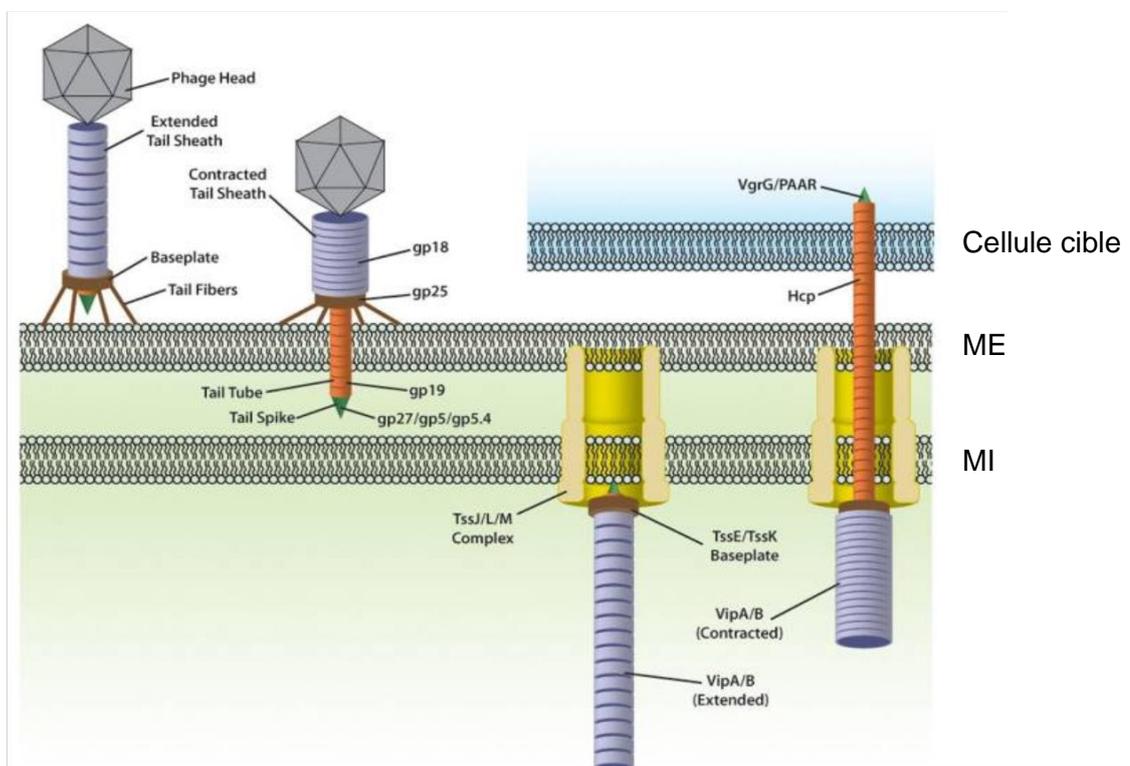
Cinq systèmes de sécrétion sont décrits chez *A. baumannii* : I, II, IV, V et VI, les types II et VI étant les plus étudiés (99). Le système de sécrétion de type II (T2SS) est un complexe multiprotéique composé de 12 à 15 protéines permettant la translocation de plusieurs protéines effectrices de l'espace périplasmique vers le milieu extracellulaire. Les effecteurs du T2SS chez *A. baumannii* comprennent par exemple les lipases LipA et LipH, qui permettent l'hydrolyse des acides gras à longue chaîne comme source de carbone pour la croissance, ou la métallo-endopeptidase CpaA qui est responsable de la dégradation du fibrinogène et du facteur V (99). Le système de sécrétion de type VI (T6SS) est très répandu parmi les bactéries à Gram négatif et peut être utilisé pour la toxicité contre d'autres bactéries et des cellules eucaryotes.

## IV. Le système de sécrétion de type VI

### IV.1. Généralités

Le système de sécrétion de type VI est un facteur de virulence largement répandu, retrouvé chez plus de 25% des bacilles à Gram négatif (100). T6SS est généralement composé de 13 protéines de base de type Type six subunit (Tss), essentielles à sa fonctionnalité et conservées entre les espèces bactériennes. Elles sont généralement organisées en un seul cluster de gènes, qui contient également un nombre variable de gènes « T6SS associated genes » (Tag), codant des protéines non essentielles souvent de fonctions inconnues (101). Les 13 protéines s'assemblent en une structure contractile cytoplasmique ancrée dans l'enveloppe cellulaire par un complexe transmembranaire (figure 4). De nombreux composants du T6SS sont structurellement proches des composants des bactériophages T4 (figure 4) (102) :

- les protéines VgrG (Valine-Glycine repeat protein G) sont structurellement proches du complexe gp5-gp27 du phage ;
- la protéine gp25, composant de la plaque basale du phage, est homologue à la protéine TssE ;
- la structure de la gaine de T6SS ressemble à la gaine du phage, la protéine Hcp (Haemolysin Co-regulated Protein) s'est avérée être structurellement proche d'une protéine de tube gp19 du phage ;
- les protéines TssB et TssC partagent des similitudes structurelles et fonctionnelles avec la gaine gp18 du phage.



**Figure 4 :** Comparaison entre le bactériophage T4 et le système de sécrétion de type VI, d'après Ho BT *et al.*, 2014.

ME : membrane externe ; MI : membrane interne

Il est maintenant bien démontré que T6SS intervient dans diverses activités de la bactérie (103) :

- activité antibactérienne qui lui permet de s'implanter dans un milieu en éliminant des bactéries qui pourraient l'en empêcher ;
- acquisition de matériel génétique étranger ;
- activité anti-cellules eucaryotes ;
- formation du biofilm ;
- acquisition d'ions métalliques.

## IV.2. Architecture de T6SS

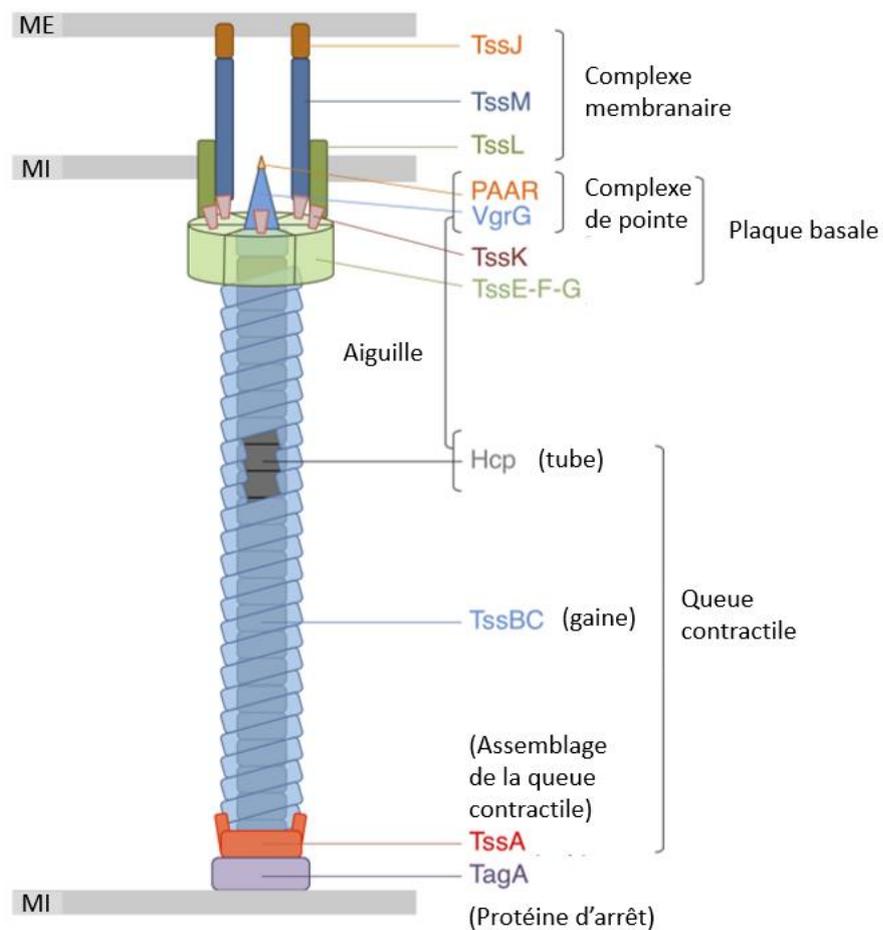
T6SS peut être divisé en trois sous-complexes : un complexe membranaire, une plaque basale associée à un complexe de pointe et la queue contractile (figure 5) (101).

Le complexe membranaire est composé de trois protéines : TssJ, TssL et TssM. TssJ est une lipoprotéine se fixant à la membrane externe et faisant saillie dans le périplasme. TssL comporte un segment membranaire C-terminal et un domaine cytoplasmique. TssM, qui représente la majeure partie du complexe, contient un domaine cytoplasmique N-terminal avec trois hélices transmembranaires. Le domaine C-terminal de la région périplasmique de TssM interagit avec TssJ. TssL et TssM interagissent à travers leurs segments transmembranaires et médient les contacts avec la plaque basale permettant ainsi son ancrage. Ce complexe sert également de canal pour permettre le passage de la queue contractile afin de maintenir l'intégrité de la cellule attaquante (101).

La plaque basale est composée de quatre protéines TssE, TssF, TssG et TssK ainsi que du complexe de pointe VgrG/PAAR (proline-alanine, alanine-arginine). La plaque basale sert de plateforme pour initier la polymérisation de la gaine TssB/TssC (ou VipA/VipB selon les sources) et du tube interne Hcp. Les protéines TssE, -F et -G s'assemblent entre elles, la protéine TssG étant le noyau central. Deux sous-unités TssF enveloppent TssG pour réaliser une forme triangulaire. Deux extensions de TssG établissent des contacts avec deux trimères de TssK. Le domaine C-terminal de TssK se lie spécifiquement aux domaines cytoplasmiques TssL et TssM. Enfin, la protéine TssE est considérée comme un composant important de la plaque de base dont le rôle pourrait être d'ancrer la gaine TssB/C à la plaque de base (101).

La queue contractile forme une structure tubulaire d'environ 1  $\mu\text{m}$  de long, constituée du tube interne et de la gaine contractile. Le tube interne, creux en son centre, est formé à partir d'hexamères d'Hcp (ayant une structure en anneau), dans une orientation tête-bêche. La gaine est composée de deux protéines TssB et TssC formant un dimère stable. Six dimères de TssB/C sont nécessaires pour former une enveloppe autour d'un anneau Hcp (101).

L'assemblage du tube Hcp et de la gaine est dépendant de la protéine TssA. TssA se localise à l'extrémité distale de la queue contractile à l'endroit où les anneaux Hcp et les brins de TssB/C sont incorporés. TssA présente une structure en forme d'étoile de mer à six bras avec un noyau central. Des études ont suggéré que le noyau central de cette protéine subirait d'importants changements de conformation afin d'insérer de nouveaux hexamères Hcp. Les bras quant à eux, pourraient faciliter la polymérisation de la gaine. La protéine TagA interagit avec TssA pour stopper l'assemblage de la queue contractile et maintenir la gaine sous la conformation allongée. Cependant, la protéine TagA ne fait pas partie des gènes conservés entre les espèces, suggérant que d'autres mécanismes interviennent dans l'arrêt de la formation de la queue contractile (101).



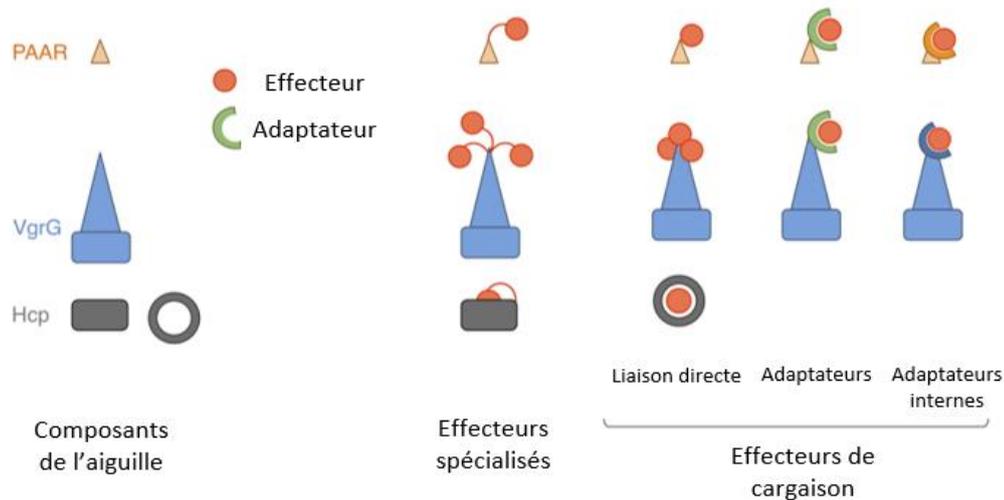
**Figure 5 :** Représentation schématique du système de sécrétion de type VI, d'après Cherrak *et al.*, 2019. ME : membrane externe, MI : membrane interne.

### IV.3. Protéines effectrices de T6SS

Les effecteurs présentent une large gamme de fonctions capables de cibler les cellules eucaryotes et les cellules procaryotes. T6SS a développé plusieurs stratégies pour la livraison des effecteurs. Ainsi, ils peuvent être classés comme effecteurs « spécialisés » ou de « cargaisons » (figure 6) (101).

Les effecteurs dits de « cargaison » se fixent directement sur l'un des composants de l'aiguille, ou peuvent nécessiter une protéine chaperonne (ou adaptateur) pour s'y fixer (104). Plusieurs effecteurs ont été décrits. Par exemple, la superfamille Tae (effector amidase de type VI) fonctionne comme des amidases qui hydrolysent le peptidoglycane. Les protéines Tle, de type phospholipases, ciblent directement la membrane bactérienne en hydrolysant les composants lipidiques. Des effecteurs porogènes ont également été décrits, notamment chez *Vibrio cholerae* (105). Enfin, des nucléases qui induisent une dégradation de l'ADN chez la cellule cible et une inhibition de la division cellulaire ont été décrites (106).

Lorsque le module effecteur se trouve sur le même polypeptide que l'un des composants de l'aiguille, la sous-unité T6SS est alors appelée « spécialisée ». Par exemple des extensions C-terminal de VgrG ont été décrites chez *V. cholerae*, VgrG1 (107) et VgrG3 (108) qui permettent respectivement de réticuler l'actine et d'hydrolyser le peptidoglycane via une peptidoglycane glycoside hydrolase. Autre exemple, VgrG5 chez *Burkholderia pseudomallei* induit la fusion de la membrane de la cellule hôte (109). Les protéines Hcp avec une extension C-terminal semblent être décrites uniquement chez les *Enterobacterales* (110). Enfin, les protéines PAAR peuvent également avoir des domaines d'extension. En effet, la nucléase RhsA délivrée par T6SS chez *Dickeya dadantii*, a été identifiée comme étant une protéine PAAR (111).



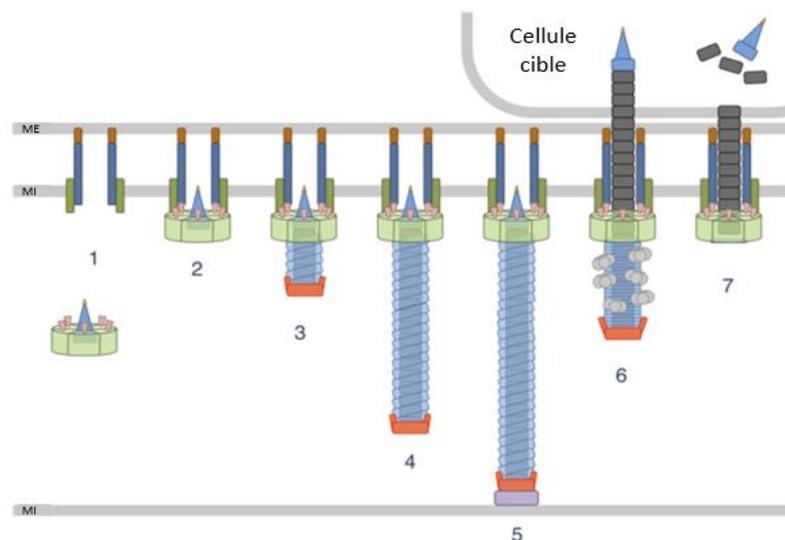
**Figure 6 :** Représentation schématique des mécanismes de chargement des effecteurs. Les effecteurs sont représentés par des cercles rouges. Les effecteurs spécialisés sont des protéines PAAR, VgrG ou Hcp avec des extensions codant pour l'effecteur. Les effecteurs de cargaison sont des protéines indépendantes qui s'associent aux composants de l'aiguille (Hcp, VgrG et PAAR). La liaison des effecteurs de cargaison aux composants de l'aiguille pourrait être directe ou médiée par des modules adaptateurs qui sont des protéines indépendantes ou des extensions de VgrG et PAAR (adaptateurs internes), d'après Cherrak *et al.*, 2019

En plus des effecteurs fonctionnant à l'intérieur des cellules cibles, des études récentes suggèrent que certains effecteurs pourraient fonctionner de manière extracellulaire. Les effecteurs extracellulaires identifiés fonctionnent pour lier ou faciliter l'absorption des ions métalliques (112).

Enfin, les effecteurs étant néfastes pour les cellules cibles, les bactéries qui les produisent sont également pourvues de protéines immunitaires afin de s'en protéger. Généralement, les protéines immunitaires sont localisées dans les compartiments cellulaires cibles des effecteurs (103).

#### IV.4. Initiation et régulation de l'assemblage

L'assemblage de T6SS commence par la formation d'un complexe membranaire intégral sur lequel la plaque basale s'assemble avec le complexe de pointe VgrG/PAAR. La formation de la plaque basale est indispensable pour initier l'assemblage de la queue contractile composée du tube interne Hcp et de la gaine TssB/C (101). La contraction de la gaine de T6SS qui se produit en moins de cinq millisecondes, pousse la pointe et le tube interne hors de la cellule dans une cellule voisine, conduisant à la délivrance d'effecteurs associés à la pointe VgrG/PAAR ou au tube interne Hcp (101). Point intéressant, la polymérisation de la queue contractile et de la gaine se poursuit dans le cytoplasme et est arrêtée lorsque l'extrémité distale touche la membrane opposée de la cellule bactérienne (101). La gaine contractée est immédiatement reconnue et désassemblée par l'ATPase cytoplasmique ClpV, rendant les sous-unités TssB et TssC disponibles pour l'assemblage d'un nouveau T6SS (113,114) (figure 7). La détection de la sécrétion de Hcp est un indicateur de l'activité de T6SS (115).



**Figure 7 :** Assemblage et mécanisme d'action de T6SS. La biogenèse de T6SS commence par le positionnement et l'assemblage du complexe membranaire ainsi que par l'assemblage de la plaque basale (1). Le recrutement et l'amarrage de la plaque basale sur le complexe membranaire (2) initie la polymérisation médiée par TssA de la structure tubulaire Hcp/gaine (3 à 5), qui est stoppée lors de l'impact sur la membrane opposée par le bouchon TagA (5). La contraction de la gaine propulse l'aiguille (tube/pointe) dans la cible (6). La ClpV ATPase est recrutée pour recycler les sous-unités de la gaine contractée (6). Les composants de l'aiguille, et les effecteurs qui leur sont associés, sont délivrés à l'intérieur de la cible (7), d'après Cherrak *et al.*, 2019. ME : membrane externe, MI : membrane interne,

## V. Particularités de T6SS chez *Acinetobacter baumannii*

---

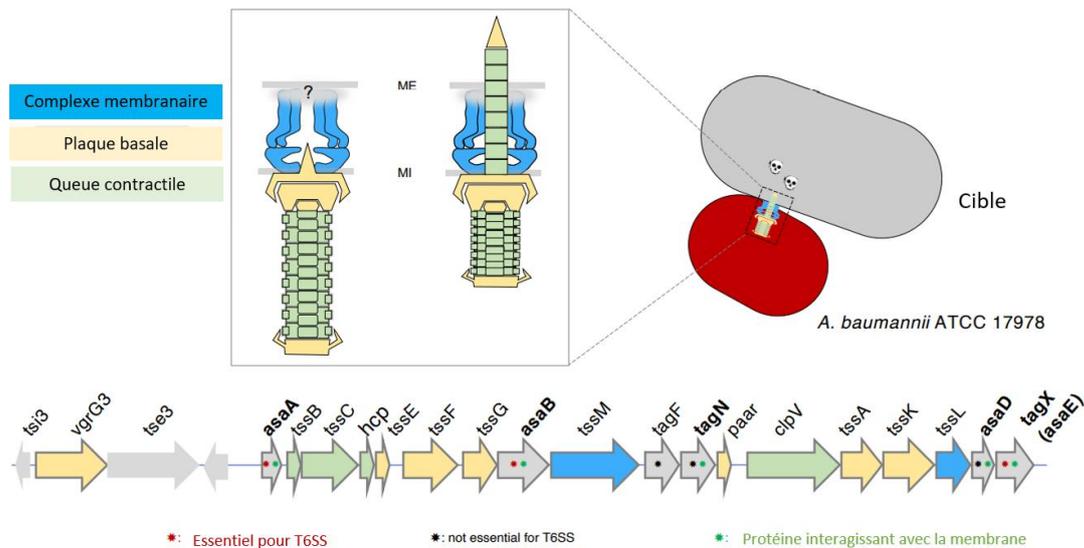
### V.1. T6SS chez *Acinetobacter baumannii*

Les rares études portant sur T6SS chez *A. baumannii* ont été réalisées sur des souches cliniques anciennes, avec un nombre de souches hébergeant T6SS variant entre 30% et 50% (116,117). Ceci semble peu refléter la présence de T6SS chez les souches actuelles. De plus, des analyses bio-informatiques ont révélé la présence de deux types de T6SS chez les *Acinetobacter spp.*, désignés par T6SS-1 et T6SS-2 (118). Le T6SS-1 est le plus omniprésent et sa composition génétique coïncide avec celle rapportée pour *A. baumannii* (118). Concernant la présence de T6SS chez *A. baumannii*, certaines souches semblent montrer une délétion plus ou moins complète du cluster T6SS. Par exemple, dans l'étude de Repizo *et al.*, 27 souches sur 110 ont montré une délétion du cluster T6SS et 15 souches contenaient des délétions ou des insertions partielles conduisant à un T6SS non fonctionnel (118). La perte de gènes de T6SS a également été rapportée dans des souches cliniques (119).

### V.2. Structure de T6SS chez *Acinetobacter baumannii*

Chez *A. baumannii* les protéines Tss sont conservées à l'exception de la lipoprotéine TssJ qui permet l'ancrage du complexe de membrane à la membrane externe. Étonnamment, l'absence de TssJ ne semble pas affecter l'activité de T6SS (figure 8). Des études se sont intéressées à des protéines potentiellement capables de remplacer la fonction de la lipoprotéine TssJ. Par exemple, les protéines Asa (*Acinetobacter type six secretion system associated*), spécifiques à *A. baumannii*, sont associées au complexe membranaire. AsaA a été étudiée mais il a été montré qu'elle ne se comportait pas comme une lipoprotéine mais plutôt comme une protéine périplasmique (120). TagX (ou AsaE) est une hydrolase active sur le peptidoglycane qui facilite le passage du tube contractile en créant un trou à travers la paroi cellulaire. Son activité nécessite probablement des interactions et une collaboration avec d'autres composants de T6SS (121).

Récemment, l'équipe du Dr Durand à Marseille (CNR UMR 7255) s'est intéressée à la protéine AsaB codée par le gène *1301* et à son interaction avec la protéine TssM. L'analyse de séquence du gène *tssM* de *Acinetobacter spp.* a mis en évidence la présence d'un motif conservé GxxGxxxG (nommé G-zip) dans le domaine C-terminal. Ce motif n'est pas observé chez d'autres espèces bactériennes mais semble crucial pour le fonctionnement de T6SS chez *Acinetobacter spp.* Pour étudier le lien entre le *tssM* G-zip, la présence de *AsaB* et l'absence de *tssJ* chez *Acinetobacter spp.*, l'analyse de 807 génomes de *Acinetobacter spp.* a été effectuée. La configuration prédominante était la présence du *tssM* G-zip avec le gène *AsaB* en l'absence de *tssJ* et a été retrouvé respectivement dans 88,4% et 82,8% des génomes de *A. baumannii* et non *baumannii*. En parallèle, l'analyse d'un ensemble de 1096 génomes non *Acinetobacter* a été réalisée et la configuration prédominante était l'absence du motif *tssM* G-zip et de *AsaB* et la présence de *tssJ*. Enfin, l'analyse bio-informatique de la protéine AsaB a permis l'identification de deux hélices transmembranaires nécessaires à la stabilisation du complexe transmembranaire. Ces résultats peuvent faire penser que la protéine AsaB remplacerait la lipoprotéine TssJ chez *A. baumannii* (étude en cours de publication, E. Durand *et al.*)



**Figure 8 :** Modèle schématique de T6SS chez *A. baumannii*. Les gènes codant le complexe membranaire, la queue contractile et la plaque basale sont représentés respectivement en bleu, jaune et vert. Les gènes codant une protéine avec une fonction non caractérisée sont représentés en gris. Cinq protéines codées par des gènes uniquement identifiés dans les clusters de gènes de T6SS de *A. baumannii* sont écrits en gras. Certaines de ces protéines ont une signature protéique membranaire (étoiles vertes) et sont essentielles à la fonctionnalité de T6SS (étoiles rouges) et d'autres non essentielles (étoiles noires). (Étude en cours de publication, E. Durand *et al.*)

### V.3. Activité et régulation de T6SS chez *Acinetobacter baumannii*

Chez *A. baumannii*, T6SS semble cibler spécifiquement les cellules bactériennes en sécrétant différentes toxines telles que des hydrolases de peptidoglycane, des nucléases et des toxines ciblant les membranes cellulaires (122). T6SS lui permet d'établir une niche favorable à son développement en éliminant les espèces bactériennes concurrentes (123). En plus de son activité antibactérienne, le T6SS participerait au transfert horizontal de gènes (124).

Le T6SS de *A. baumannii* peut être régulé négativement par des plasmides, par exemple pAB3, pAB04-1 ou encore pAB5 (125,126). Ils hébergent des gènes codant des répresseurs de l'expression de T6SS mais également des gènes de résistances aux antibiotiques. Il est à noter que le plasmide pAB3 ne porte qu'une seule cassette conférant la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole (125), alors que pAB04-1 et pAB5 contiennent respectivement 12 et 15 cassettes de résistance aux antibiotiques (126).

## VI. Objectifs

---

Une collection de 98 souches de *A. baumannii* d'origine variée a été « screenée » par l'équipe du Pr Marie-Cécile PLOY (INSERM UMR1092) quant à la présence de T6SS ainsi que du plasmide de répression pAB3. T6SS a alors été retrouvé chez au moins 90% des souches de la collection et 25% hébergeaient aussi pAB3.

Mon étude avait pour but de travailler sur cette collection afin de comprendre l'implication clinique de T6SS chez *A. baumannii*. Cette étude sera la première du genre puisqu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude des transcrits de gènes de T6SS chez *A. baumannii* et qu'aucune des études décrites dans la littérature ne présentait une telle diversité quant à l'origine des souches.

Pour ce faire, nous devons :

- mettre au point la qPCR pour la quantification des transcrits ;
- quantifier les transcrits des gènes *tssM*, *1301* et *hcp* par rapport à un gène de ménage.

## VII. Matériel et méthode

### VII.1. Les souches de *Acinetobacter baumannii*

L'étude a été réalisée sur 11 souches (annexe 1) de *A. baumannii* issues de la collection de 98 souches, cinq étaient cataloguées T6SS+ et six T6SS- (hébergeant le plasmide pAB3). Les différents résultats ont été comparés à nos deux souches témoins T6SS+ (T+) (ATCC 17978) et T6SS- (T-) (ATCC 17978 hébergeant pAB3).

### VII.2. In-Fusion

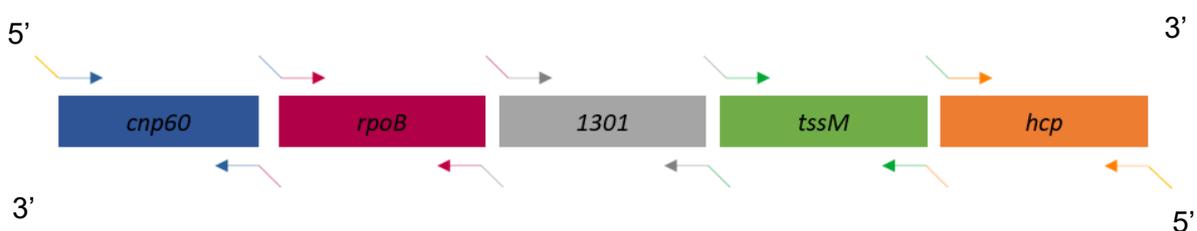
Les amorces utilisées au cours des différentes PCR sont présentées dans le tableau en annexe 2. Tous les acides nucléiques extraits au cours de l'étude ont été dosés en utilisant le kit Qubit™ dsDNA Broad range assay de chez ThermoFischer scientifique.

#### VII.2.1. Principe de la méthode In-Fusion

Le principe de la méthode de clonage In-Fusion repose sur l'utilisation de l'enzyme In-Fusion qui est capable de fusionner des fragments d'ADN (insert généré par PCR et vecteur linéarisé) de manière précise en reconnaissant des chevauchements de 15 paires de base (pb) à leurs extrémités.

#### VII.2.2. Préparation des gènes pour la méthode In-Fusion

L'ADN de notre T+ de *A. baumannii* a été dosé et dilué afin d'obtenir une concentration de 100 ng/μL. Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 μL contenant 12,5 μL PrimeSTAR Max Premix®, 0,5 μL de chaque amorce à 0,2 μM, 0,5 μL d'ADN et 11 μL d'eau pour préparation injectable (PPI). Le protocole était le suivant : 1 min à 98°C, puis 35 cycles comportant 10 s de dénaturation à 98°C, 15 s d'hybridation à 45°C et 5 s d'élongation à 72°C, suivi d'un cycle d'élongation de 1 min à 72°C. Les amorces ont été conçues pour posséder en leurs parties 5' une séquence correspondant au gène à lier (figure 9).



**Figure 9 :** Représentation des différents gènes et amorces pour la méthode de clonage In-Fusion.

### VII.3. Ligature des gènes

Les gènes d'intérêt ont été liés dans un ordre précis : *hcp*, *tssM*, *1301*, *rpoB*, *cnp60*. Des PCR de ligature ont été réalisées pour lier deux fragments deux à deux, dans un volume final de 25 µL dont : 12,5 µL PrimeSTAR Max Premix<sup>®</sup>, 0,5 µL de chaque amorce à 0,2 µM, 0,5 µL de chaque gène purifié et 10,5 µL d'eau PPI. Le protocole était le suivant : 1 min à 98°C, puis 35 cycles comportant 10 s de dénaturation à 98°C, 15 s d'hybridation à 45°C et 5 s d'élongation à 72°C, suivi d'un cycle d'élongation de 1 min à 72°C.

### VII.4. Purification

#### VII.4.1. Electrophorèse

Une analyse des produits de PCR a été effectuée grâce à une migration par électrophorèse sur gel d'agarose. Ainsi 5 µL de produit de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 0,8% ou à 2%, suivant la taille du fragment attendu, contenant l'agent intercalant Midori-Green<sup>®</sup> visible sous UV. Après migration sous champ constant, les bandes d'ADN amplifiées ont été visualisées sur le gel éclairé aux UV.

#### VII.4.2. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit Wizard<sup>®</sup> SV GEL and PCR Clean-Up de chez Promega selon les recommandations du fabricant. La purification a été réalisée soit directement à partir du produit de réaction lorsque le fragment amplifié était unique et de la taille attendue, soit après une étape d'électrophorèse et un découpage de la bande d'intérêt en cas de présence de plusieurs bandes.

### VII.5. Création du plasmide pSU38ΔtotΔ*lacZ*\_hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60

Le fragment contenant les cinq gènes d'intérêt a été inséré au sein du plasmide pSU38 Δtot\_ *lacZ* grâce au kit In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning de chez Takara Bio. Le plasmide possède une origine de répllication p15A ori, un gène de résistance à la kanamycine et le gène *lacZ*.

#### VII.5.1. *Escherichia coli* DH5α/pSU38Δtot\_ *lacZ*

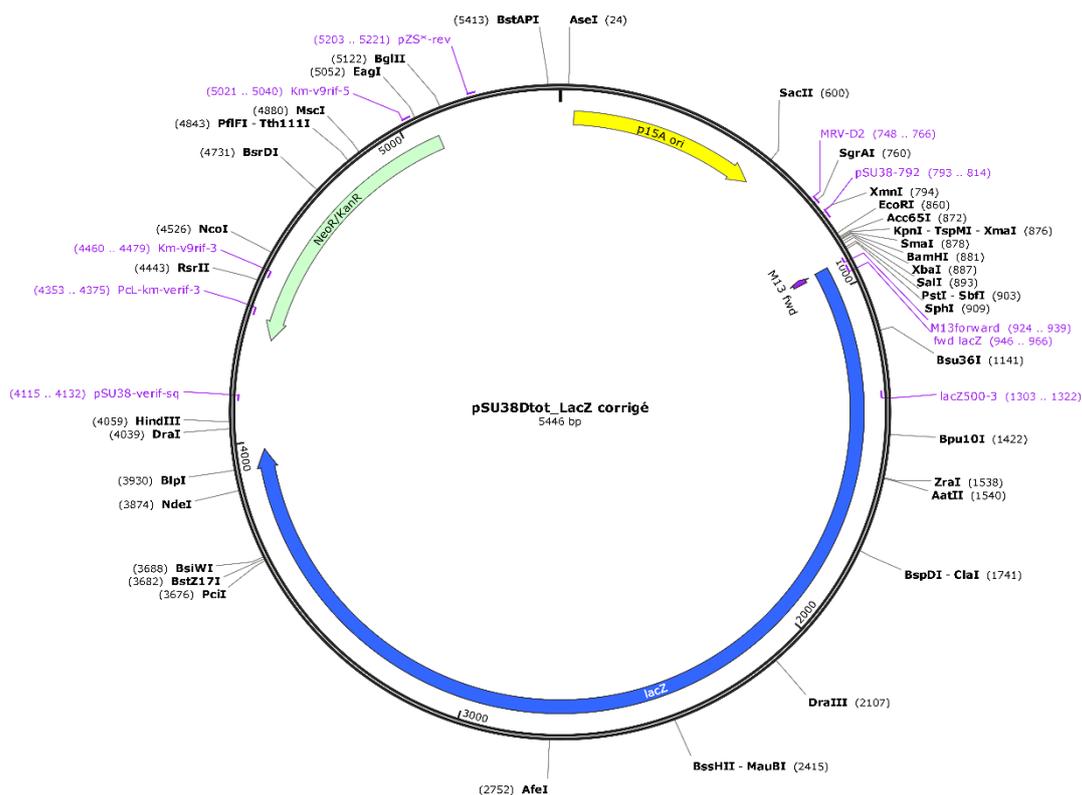
La souche *E. coli* DH5α/pSU38Δtot\_ *lacZ* (127), contenant le plasmide pSU38Δtot\_ *lacZ* et conservée en cryobille à -80°C, a été repiquée sur une gélose LB (Lysogène Broth) contenant de la kanamycine à 25 µg/mL et incubée pendant 24h à 37°C.

## VII.5.2. Extraction du plasmide

Une colonie de *E. coli* DH5 $\alpha$ /pSU38 $\Delta$ tot\_ *lacZ* a été ensemencée dans 20 mL de bouillon LB additionné de 20  $\mu$ L de Kanamycine à 25  $\mu$ g/mL. La suspension a été incubée sous agitation à 200 rpm à 37°C pendant une nuit. L'extraction plasmidique a été réalisée à partir des 20 mL à l'aide du kit Nucleospin® Plasmid de chez Machery Nagel selon les recommandations du fabricant.

## VII.5.3. Digestion du plasmide

Le plasmide pSU38 $\Delta$ tot\_ *lacZ* alors obtenu a été digéré par les enzymes *Eco*RI et *Hind*III (figure 10), afin de libérer du plasmide le fragment contenant *lacZ*, en respectant les quantités suivantes : 5  $\mu$ L de tampon Cut-Smart®, 1  $\mu$ L de chaque enzyme, 6  $\mu$ L de plasmide et 37  $\mu$ L d'eau PPI. Après une digestion pendant 1h à 37°C, le produit de digestion a été déposé sur gel d'agarose à 0,8% et après migration, la bande d'intérêt a été découpée et purifiée selon le procédé décrit précédemment.



**Figure 10 :** Représentation du plasmide pSU38 $\Delta$ tot\_ *lacZ* avant digestion.

#### VII.5.4. Ligature vecteur-insert grâce au kit In-Fusion® HD Cloning

Le fragment obtenu par PCR de ligature a été mis en contact avec la bande plasmidique purifiée selon un ratio insert/vecteur de 2:1 comme recommandé sur le site In-Fusion molar Ratio calculator. Pour un résultat optimal, les volumes indiqués dans le tableau 2 ont été utilisés et la solution a été incubée pendant 15 min à 50°C. La réaction est ensuite conservée dans la glace avant de procéder à la transformation.

**Tableau 2 :** Volume de chaque réactif pour réaliser le clonage avec le kit In-Fusion

	<b>Clone</b>	<b>Contrôle positif</b>
<b>Premix In-Fusion® HD 5X</b>	2 µL	2 µL
<b>Vecteur digéré</b>	2 µL	1 µL du vecteur contrôle pUC19
<b>Fragment purifié</b>	1 µL	2 µL de l'insert contrôle
<b>Eau PPI</b>	Ajustement à 10 µL	Ajustement à 10 µL

#### VII.5.5. Transformation par choc thermique

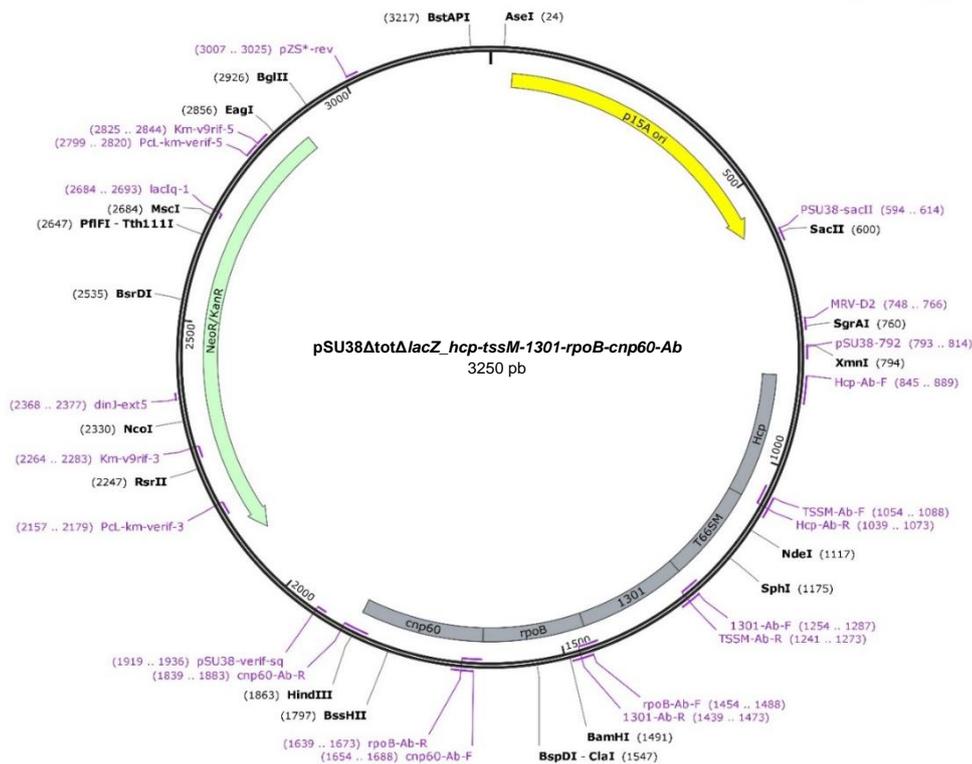
La transformation consiste à intégrer le plasmide recombinant dans des cellules compétentes. Ainsi, une suspension de souche de *E. coli* Stellar competent cells a été transformée à l'aide de la solution contenant le plasmide recombinant par choc thermique en suivant les recommandations du kit In-Fusion® HD Cloning de chez Takara Bio.

#### VII.5.6. Sélection des transformants

Les souches de *E. coli* Stellar competent cells transformées ont été sélectionnées sur gélose LB contenant de la kanamycine à 25 µg/mL.

#### VII.5.7. Extraction du plasmide

Le plasmide pSU38ΔtotΔlacZ\_hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60 a été extrait grâce au kit NucleoSpin® Plasmide de chez Machery Nagel (figure 11).



**Figure 11 :** Représentation du plasmide pSU38ΔtotΔlacZ\_hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60

## VII.6. Séquençage

### VII.6.1. PCR de séquence

Les PCR de séquence ont été réalisées dans un volume final de 20 µL contenant : 0,32 µL d'un primer à 1 µM (annexe 1), 2 µL de tampon BigDye®, 4 µL de BigDye®, 4µL d'ADN plasmidique purifié et 10,68 µL d'eau PPI. Le protocole était le suivant : 96°C pendant 1 min suivi de 25 cycles comprenant 10 s de dénaturation à 96°C, 5 s d'hybridation à 50°C et 4 min d'élongation à 60°C.

### VII.6.2. Purification des produits de PCR de séquence

Les produits de réactions de séquence ont été purifiés en microplaques filtrantes Millipore à l'aide de résine Sephadex® G50 Superfine.

### VII.6.3. Séquençage

Le séquençage se fait à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire 3130XL® de chez Thermo Fischer. Le logiciel Geneious® et la base de données BLAST ont été utilisés pour étudier les séquences obtenues.

## VII.7. Test des amorces pour la qPCR

L'efficacité des amorces utilisées pour la qPCR (annexe 2) a été testée sur le plasmide afin de s'assurer qu'elles amplifiaient bien les gènes. Les PCR ont été réalisées selon les conditions décrites au VII.2.2.

## VII.8. Quantifications des transcrits

### VII.8.1. Mise au point de la qPCR

Une gamme étalon allant de  $10^2$  à  $10^8$  copies/ $\mu$ L a été préparée avec le plasmide recombinant. Pour cela, la quantité plasmide en ng/ $\mu$ L a été convertie en nombre de copie/ $\mu$ L à l'aide du site « DNA Copy Number and Dilution Calculator » de Thermo Fischer.

Afin de déterminer les conditions optimales pour l'ensemble des gènes, différentes concentrations pour chaque couple d'amorces ont été testées sur la gamme avec une température d'hybridation de 60°C. Les efficacités et le coefficient de régression (ou  $R^2$ ) ont été déterminés

### VII.8.2. Extractions des ARN des souches

Un bouillon de 5 mL a été ensemencé à partir d'une colonie de chacune des souches *A. baumannii* et a été incubé à 37°C sous une agitation de 200 rpm pendant une nuit. Le lendemain, une dilution au 1/100<sup>ème</sup> a été réalisée dans 10 mL de bouillon et a été mis à incuber à 37°C sous une agitation de 200 rpm.

Lorsqu'une densité optique (DO) de 0,6 à 600 nm a été atteinte, un culot bactérien a été obtenu par centrifugation à 5000G pendant 10 min à 4°C à partir de 1,5 mL de bouillon. Le surnageant a été retiré et les culots ont été placés à -80°C. Les DO ont été mesurées sur l'appareil EVOLUTION 260 Bio UV-Visible spectrophotometer® de chez Thermo Scientific.

Les ARN ont été extraits à partir des différents culots à l'aide du kit NucleoSpin ARN® de chez Machery Nagel selon les recommandations du fabricant puis dosés à l'aide du Nanodrop®.

### VII.8.3. Synthèse des ADNc

Après dosage des ARN extraits, les ADNc ont été synthétisés grâce au kit PrimeScript RT reagent, perfect real time® de chez Takara, en suivant les volumes du tableau 3.

**Tableau 3 :** Volume de chaque réactif pour réaliser la synthèse des ADNc

Tube positif		
Réactifs	Volume	Concentration finale
PrimeScript Buffer 5X	2 µL	1X
PrimeScript RT enzyme Mix 1	0,5 µL	
Oligo dT Primer (50 µM)	0,5 µL	25 pmol
Random 6 mers (100 µM)	2 µL	200 pmol
ARN		
Eau	<b>Qsp 10 µL</b>	

Tube négatif		
Réactifs	Volume	Concentration finale
PrimeScript Buffer 5X	2 µL	1X
PrimeScript RT enzyme Mix 1	0,5 µL	
Oligo dT Primer (50 µM)	0,5 µL	25 pmol
Random 6 mers (100 µM)	2 µL	200 pmol
Eau	<b>Qsp 10 µL</b>	

La réaction a été réalisée selon le protocole suivant : 15 min à 37°C puis 5 s à 85°C. Les ADNc ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> et placés à -20°C.

### VII.8.4. qPCR

Les réactions de qPCR ont été réalisées avec les volumes présents dans le tableau 4 sur CFX96® de chez BioRad à l'aide du programme suivant : 3 min à 95°C, suivi de 40 cycles comprenant 15 s de dénaturation à 95°C puis 1 min d'hybridation à 60°C.

**Tableau 4 :** Tableau récapitulatif des volumes pour la qPCR des gènes *cnp60*, *1301*, *tssM*, *Hcp*

	<b><i>cnp60</i></b>	<b><i>1301</i></b>	<b><i>tssM</i></b>	<b><i>hcp</i></b>
Amorce – R	0,6 µL (soit 300 nM)	1 µL (soit 500 nM)	0,8 µL (soit 400 nM)	1 µL (soit 500 nM)
Amorce – F	0,6 µL (soit 300 nM)	1 µL (soit 500 nM)	0,8 µL (soit 400 nM)	1 µL (soit 500 nM)
SYBR Green	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
ADN	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Eau	Qsp 20 µL	Qsp 20 µL	Qsp 20 µL	Qsp 20 µL

### VII.8.5. Analyse statistique et représentation graphique des résultats

Les statistiques ont été réalisées grâce à un test de Mann-Whitney et les graphiques représentant les résultats ont été réalisés sur le logiciel GraphPad® Prism 8. Sur ces graphiques, les différences significatives seront indiquées comme suit : ns (non significatif) : p-value > 0,05 ; \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,001.

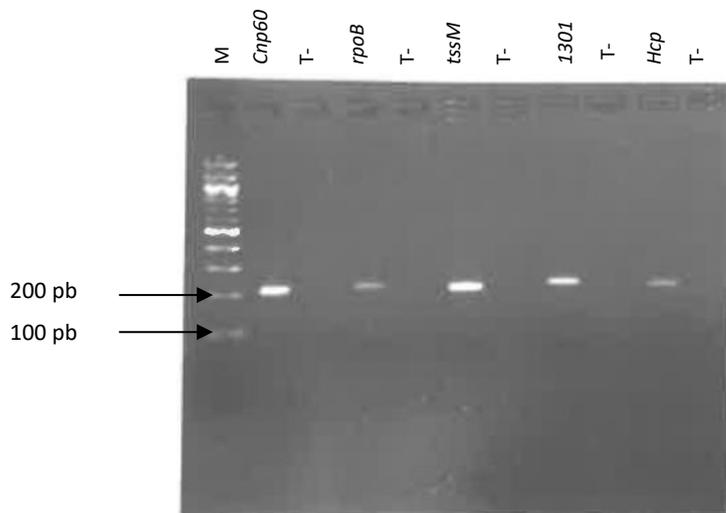
## VIII. Résultats

Afin d'étudier les transcrits des gènes d'intérêt, à savoir *hcp*, *tssM* et *1301*, un plasmide recombinant a été créé. Ce plasmide a été utilisé pour faire une gamme étalon et déterminer les conditions optimales pour la réalisation des qPCR pour les différents gènes.

### VIII.1. Mise au point de la qPCR pour l'étude des transcrits

#### VIII.1.1. Création du plasmide pSU38 $\Delta$ tot $\Delta$ lactZ\_*hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60*

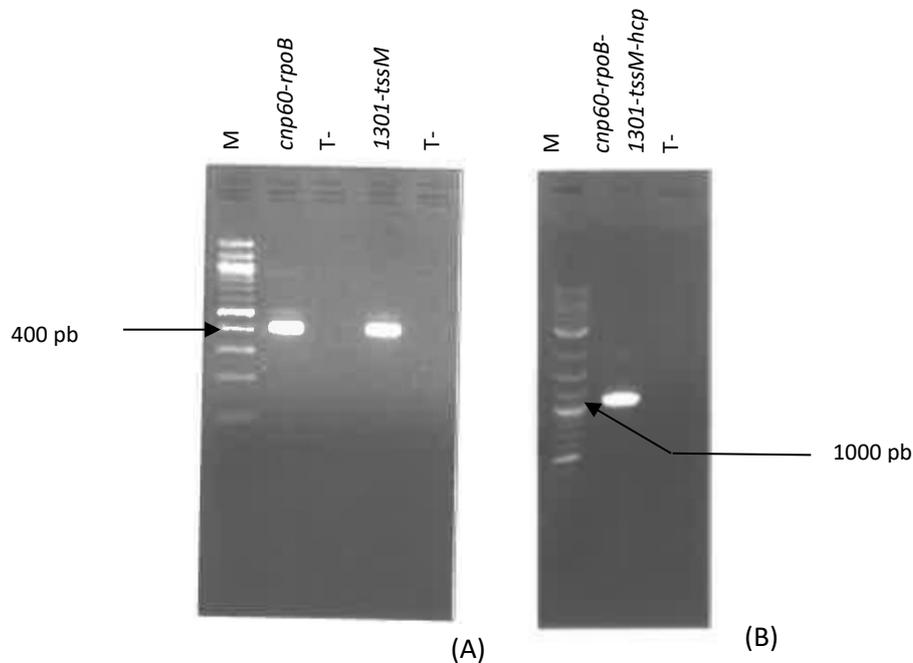
Dans un premier temps, les fragments internes aux 5 gènes d'intérêt ont été amplifiés à partir de l'ADN de la souche témoin T+ en utilisant les oligonucléotides présentés dans le tableau en annexe 1. L'étude électrophorétique des PCR est présentée figure 12. Pour chaque PCR, un fragment unique de taille attendu a été obtenu et purifié.



**Figure 12 :** Migration sur gel d'agarose 2% des PCR réalisées sur les gènes d'intérêt.  
M : marqueur de taille (100pb – New England BioLab) ; T- : témoin négatif

Dans un second temps, les fragments de *cnp60* et de *rpoB* ont été liés à l'aide des oligonucléotides *cnp60-Ab-R* et *rpoB-Ab-F* ainsi que les fragments de *1301* et de *tssM* à l'aide des oligonucléotides *1301-Ab-R* et *tssM-Ab-F*. L'étude électrophorétique des PCR est présentée figure 13-A. Une bande unique de taille attendue (environ 400 pb) a été obtenue et purifiée.

Le fragment *1301-TssM* a alors été lié à celui de *hcp* à l'aide des oligonucléotides *1301-Ab-R* et *hcp-Ab-F*. Une bande d'environ 600 pb a été observée (résultat non montré). Enfin, les fragments *cnp60-rpoB* et *1301-TssM-hcp* ont été liés à l'aide des oligonucléotides *cnp60-Ab-R* et *hcp-Ab-F*. Un fragment d'environ 1000 pb a été obtenu, comme attendu (figure 13-B), puis purifié et dosé à une concentration de 106 ng/ $\mu$ L.



**Figure 13 :** Migration sur gel d'agarose 2% des fragments *cnp60-rpoB* et *1301-tssM* (A) et migration sur gel d'agarose 0,8% du fragment *cnp60-rpoB-1301-tssM-hcp* (B).

M : marqueur de taille (A : 100 pb - New England BioLab ; B : 1 kb plus - New England BioLab) ;  
T- : témoin négatif

Le plasmide pSU38 $\Delta$ tot\_ *lacZ* a été extrait à partir d'une colonie de *E. coli* DH5 $\alpha$ /pSU38 $\Delta$ tot\_ *lacZ* mise en suspension dans 20 mL de bouillon LB contenant de la kanamycine à 25  $\mu$ g/mL. Le plasmide a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Après migration électrophorétique de la digestion, afin de séparer les deux fragments alors obtenus, la bande d'intérêt d'environ 2200 pb a été découpée sur gel puis purifiée et dosée à une concentration de 52,7 ng/ $\mu$ L (résultat non montré).

Un plasmide recombinant a été construit par insertion du fragment *hcp-tssM-1301-rpoB-cnp60* dans le plasmide pSU38 $\Delta$ tot $\Delta$  *lacZ* grâce au kit In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning. Une suspension de souche de *E. coli* Stellar competent cells a été ensuite transformée à l'aide de la solution contenant le plasmide recombinant par choc thermique puis étalée sur gélose LB contenant de la kanamycine à 25  $\mu$ g/mL. À partir d'une colonie obtenue sur le milieu sélectif, le plasmide recombinant a été extrait puis dosé à une concentration de 23,6 ng/ $\mu$ L. La bonne construction du plasmide a été vérifiée par deux PCR de jonction en utilisant les oligonucléotides pSU38-verif-sq et *cnp60-Ab-F* ainsi que MRV-D2 et *Hcp-Ab-F*, et une PCR ciblant l'insert en utilisant les oligonucléotides pSU38-verif-sq et MRV-D2. Des fragments uniques et de taille attendue ont été obtenus pour chacune des PCR (résultat non montré). L'insert a été entièrement séquencé certifiant ainsi la bonne construction de notre plasmide recombinant.

### VIII.1.2. Détermination des conditions pour la qPCR

La quantité de plasmide obtenue correspondait à  $6,73 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  selon le site « DNA Copy Number and Dilution Calculator » de Thermo Fischer. Une gamme étalon allant de  $10^2$  à  $10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  a été préparée à partir de laquelle différentes concentrations finales pour chaque couple d'amorces ont été testées, à savoir 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM et 500 nM à une température d'hybridation de  $60^\circ\text{C}$ . Les efficacités et les  $R^2$  ont été déterminés (tableau 5). Une efficacité comprise entre 90% et 110% était considérée comme acceptable et le  $R^2$  devait être le plus proche de 1.

**Tableau 5 :** Résumé des efficacités et des  $R^2$  obtenus pour les différentes concentrations finales en amorces pour chacun des gènes ciblés.

<i>tssM</i>		
Concentration	Efficacité	$R^2$
100 nM	90,8%	1
200 nM	93,6%	1
300 nM	93,6%	1
<b>400 nM</b>	<b>95,3%</b>	<b>0,999</b>
500 nM	92,7%	1

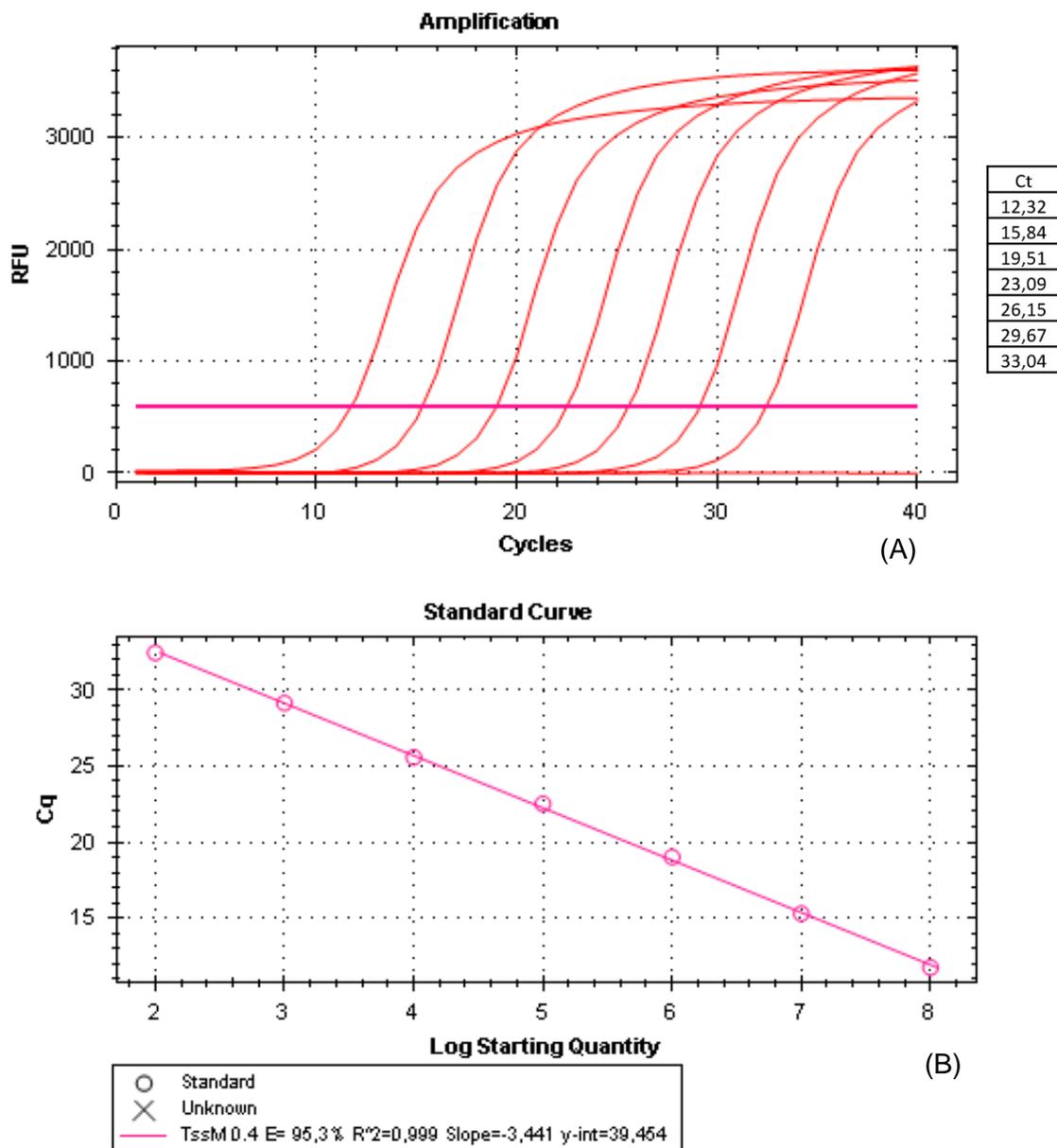
<i>1301</i>		
Concentration	Efficacité	$R^2$
100 nM	85,3%	0,999
200 nM	92,2%	1
300 nM	91,6%	1
400 nM	94,4%	1
<b>500 nM</b>	<b>98,4%</b>	<b>1</b>

<i>hcp</i>		
Concentration	Efficacité	$R^2$
100 nM	100,1%	0,968
200 nM	91,0%	0,998
300 nM	97,4%	0,999
400 nM	97,0%	0,999
<b>500 nM</b>	<b>98,4%</b>	<b>0,999</b>

<i>cnp60</i>		
Concentration	Efficacité	$R^2$
100 nM	89,2%	0,999
200 nM	94,3%	1
<b>300 nM</b>	<b>98,9%</b>	<b>0,999</b>
400 nM	98,1%	0,996
500 nM	95,4%	1

<i>rpoB</i>		
Concentration	Efficacité	$R^2$
100 nM	98,0%	0,998
200 nM	103,2%	0,998
300 nM	104,7%	0,998
400 nM	104,7%	0,998
500 nM	106,5%	0,998

Les efficacités les plus hautes ont été obtenues à une concentration de 300 nM pour *cnp60*, de 400 nM pour *tssM* et de 500 nM pour *1301* (tableau 5). L'aspect des gammes était satisfaisant pour l'ensemble de ces concentrations, les Ct variant entre 3,33 et 4 entre chaque point de gamme (figure 14 et annexe 3). Pour *hcp*, l'efficacité la plus haute était de 100,1%. Cependant, le  $R^2$  était inférieur à 0,99 et les Ct entre les différents points de gamme n'étaient pas satisfaisants. La deuxième efficacité la plus élevée a été obtenue pour une concentration de 500 nM associée à un  $R^2$  supérieur à 0,99 (tableau 5). Les Ct entre les points de gammes étant satisfaisants (annexe 3), cette concentration a donc été choisie pour *hcp*. Enfin pour *rpoB*, bien que les efficacités étaient comprises entre 90% et 110% (tableau 5), les gammes obtenues n'étaient pas satisfaisantes. Devant ces résultats, *cnp60* a été choisi comme gène de ménage pour la normalisation des transcrits des gènes de *hcp*, de *1301* et de *tssM*.

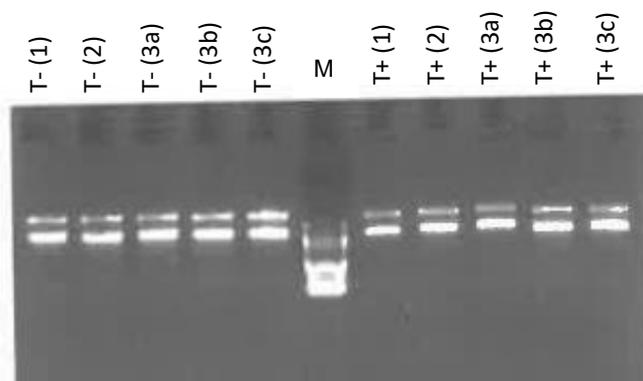


**Figure 14 :** Aspect de la gamme (A) et détermination de l'efficacité de la gamme étalon et du  $R^2$  de la droite de régression (B) pour le gène *tssM*

### VIII.1.3. Détermination du milieu de culture et test des conditions de la qPCR sur les souches T+ et T-

#### VIII.1.3.1. Extraction des ARN pour les souches T+ et T-

Afin de déterminer le milieu sur lequel l'étude allait être réalisée, deux types de bouillon ont été utilisés, LB et BHI (Brain Heart Infusion) (annexe 4). Après incubation pendant une nuit sous une agitation de 200 rpm, une dilution au dixième a été réalisée dans un nouveau bouillon. Les DO ont été mesurées régulièrement jusqu'à obtenir une DO de 0,6 à 600 nm. Un culot a été réalisé et les ARN ont été extraits. Une migration sur gel a été effectuée afin de s'assurer de leurs bonnes extractions. Pour chaque souche, les analyses ont été réalisées en triplicats biologiques (mesure sur trois bouillons différents à partir de trois colonies différentes) et techniques (trois mesures sur le même bouillon).

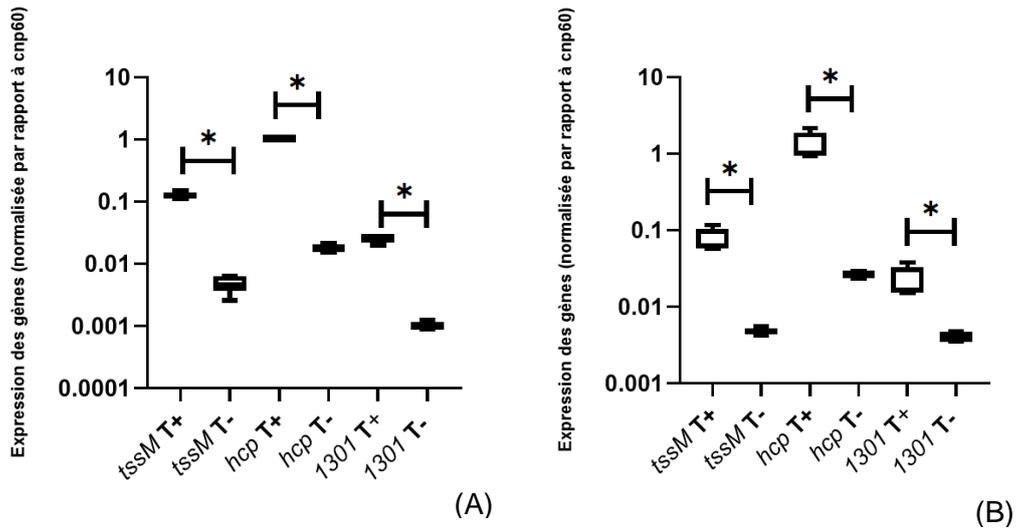


**Figure 15 :** Migration des ARN pour les souches T+ et T- en milieu LB.  
Un marqueur de taille a été utilisé (M) comme témoin de migration

Quel que soit le milieu utilisé, deux bandes ont bien été observées après migration, confirmant la bonne extraction des ARN (figure 15). Les ARN ont été retrotranscrits en ADNc et la quantification des transcrits des différents gènes a été réalisée en utilisant les conditions déterminées lors de la mise au point.

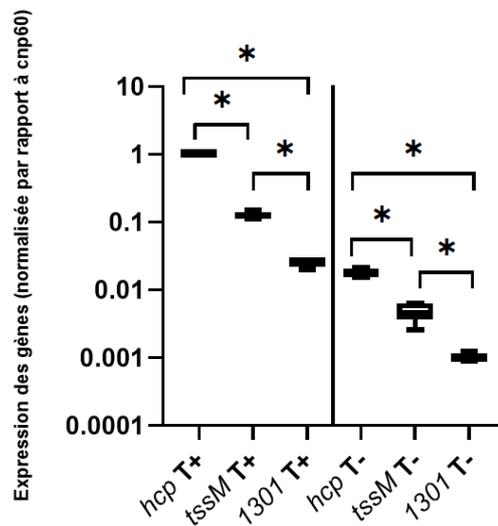
#### VIII.1.3.2. Quantification des transcrits pour les souches T+ et T-

Que ce soit en milieu LB ou BHI, les résultats ont montré que les souches T+ et T- produisaient bien les transcrits pour chacun des gènes étudiés et qu'ils étaient significativement plus élevés pour la souche T+ que pour la souche T-, ce qui correspond aux résultats attendus (figure 16). Il est à noter que bien qu'il y ait eût répression pour la souche T-, celle-ci n'était pas totale.



**Figure 16 :** Expression des gènes des souches T+ et T- en milieu LB (A) et BHI (B)  
 Test de Mann-Whitney : \* : p-value < 0,05

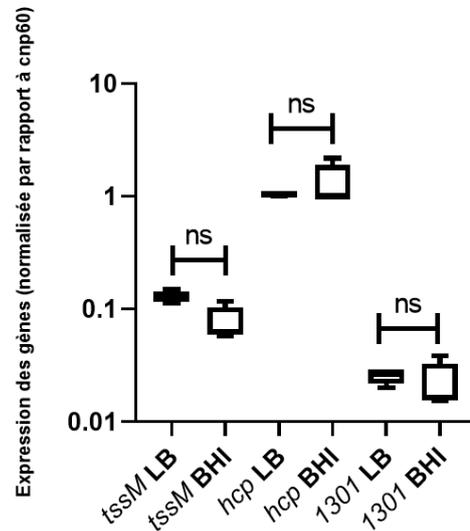
De plus, quels que soient la souche et le milieu, les transcrits de *hcp* étaient plus importants que ceux de *tssM* qui étaient plus importants que ceux de *1301* (figure 17).



**Figure 17 :** Différence d'expression des transcrits pour les trois gènes pour les souches T+ et T-  
 Test de Mann-Whitney : \* : p-value < 0,05

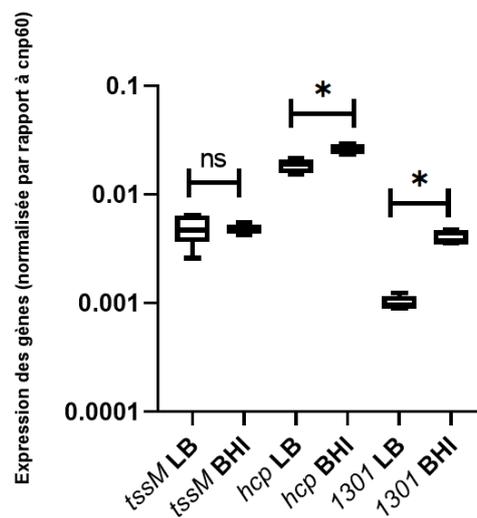
#### VIII.1.4. Comparaison de la quantification des transcrits entre les milieux LB et BHI

Pour la souche T+, aucune différence significative n'a été observée pour la quantification des transcrits des trois gènes entre les deux milieux (figure 18).



**Figure 18 :** Comparaison de l'expression des transcrits pour la souche T+ en milieu LB et BHI  
Test de Mann-Whitney : ns (non significatif) : p-value > 0,05

Pour la souche T-, bien que la quantification des transcrits était plus faible que celle de la souche T+, une différence significative était observée pour *hcp* et pour *1301* en milieu BHI mais pas pour *tssM* (figure 19).



**Figure 19 :** Comparaison de l'expression des transcrits pour la souche T- en milieu LB et BHI  
Test de Mann-Whitney : ns (non significatif) : p-value > 0,05 ; \* : p-value < 0,05

Devant l'absence de différence significative de l'expression des transcrits entre le milieu LB et le milieu BHI pour la souche T+, et devant une répression plus importante en milieu LB des transcrits de *hcp* et de *1301* de la souche T-, il a été décidé de poursuivre l'étude en milieu LB.

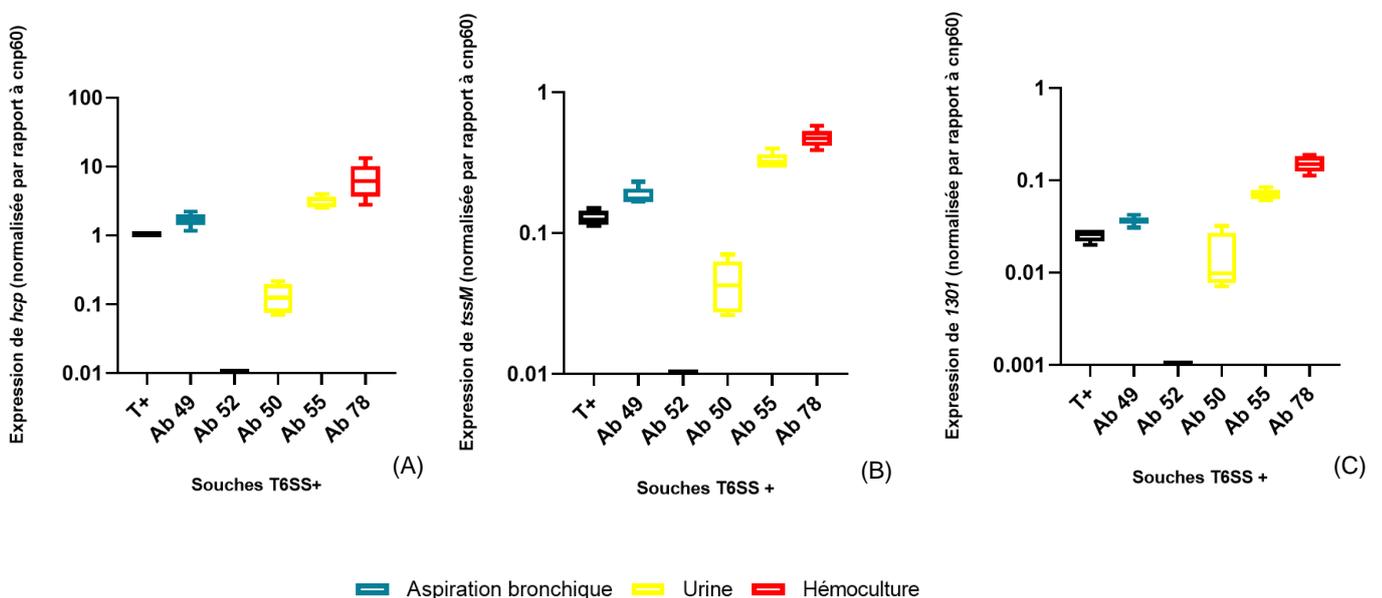
## VIII.2. Etude des transcrits

### VIII.2.1. Extractions des ARN

Les extractions des ARN pour les souches de l'étude ont été réalisées selon les mêmes conditions que pour les souches T+ et T-.

### VIII.2.2. Souches T6SS+

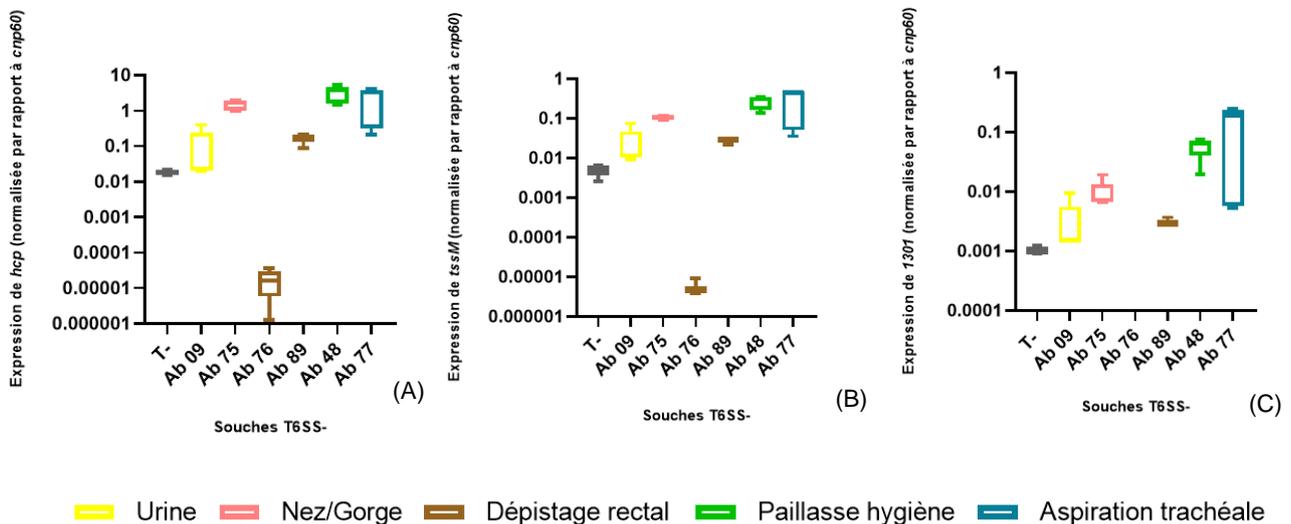
L'ensemble des résultats de la quantification des transcrits des souches T6SS+ est présenté sur la figure 20 et les résultats des tests statistiques sont en annexe 5. L'expression de T6SS était retrouvée pour l'ensemble des souches T6SS+, exceptée la souche Ab 52. Pour les souches exprimant T6SS, les transcrits de *hcp* étaient plus importants que ceux de *tssM* qui étaient plus importants que ceux de *1301*, comme cela a été retrouvé pour la souche T+. Pour ces trois gènes d'intérêt, la quantification des transcrits des souches Ab 49, Ab 55 et Ab 78 était significativement supérieure au T+, à l'inverse de la souche Ab 50 avec une différence non significative pour *1301*.



**Figure 20 :** Résultat de la quantification des transcrits de *hcp* (A), de *tssM* (B) et de *1301* (C) pour les souches T6SS+

### VIII.2.3. Souches T6SS-

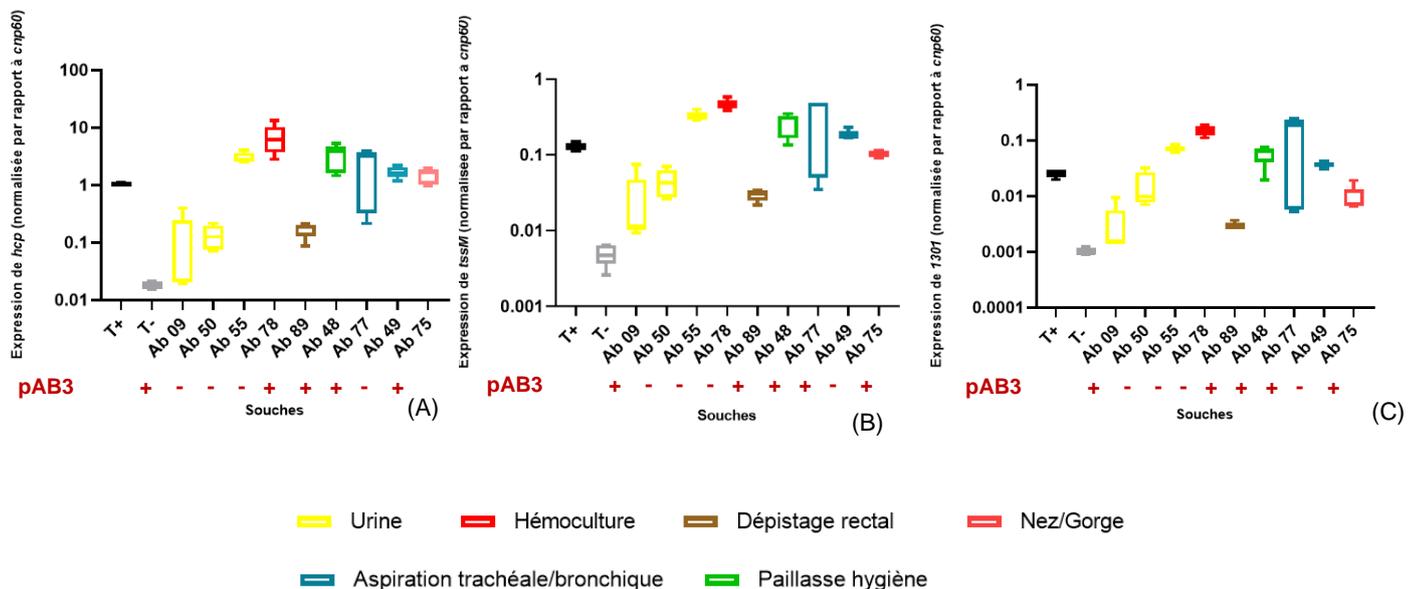
L'ensemble des résultats de la quantification des transcrits des souches T6SS- est présenté sur la figure 21 et les résultats des tests statistiques sont en annexe 5. Pour les souches Ab 9, Ab 89, Ab 75, Ab 48 et Ab 77 la quantification des transcrits est significativement supérieure à celle de la souche T- pour les trois gènes d'intérêt. Seule la souche Ab 76 sous exprime *tssM* et *hcp*, et n'exprime pas *1301*. Là encore, les transcrits de *hcp* étaient plus importants que ceux de *tssM* qui étaient plus importants que ceux de *1301*. Pour les souches Ab 75, Ab 48 et Ab 77, la présence de pAB3 ne semble pas diminuer l'activité de T6SS puisque la quantification des différents transcrits était du même ordre que celle de la souche T+. En revanche, pour les souches Ab 9 et Ab 89, la quantification des transcrits était significativement inférieure aux souches Ab 75, Ab 48 et Ab 77 et semblait équivalente à celle de la souche T-.



**Figure 21 :** Résultat de la quantification des transcrits de *hcp* (A), de *tssM* (B) et de *1301* (C) pour les souches T6SS-

## VIII.2.4. Comparaison entre les souches T6SS+ et T6SS-

L'ensemble des résultats de la quantification des transcrits des souches est présenté sur la figure 22 et les résultats statistiques sont en annexe 5. Les souches Ab 52 et Ab 76 n'expriment pas ou très peu T6SS, leurs transcrits ne sont pas représentés dans cette figure. Les souches Ab 9 (T6SS-), Ab 89 (T6SS-) et Ab 50 (T6SS+), ne présentent pas de différence significative concernant l'expression des transcrits *tssM* et *hcp*. Cependant, l'expression de *1301* est significativement supérieure pour la souche Ab 50. De la même manière, les souches Ab 48 (T6SS-), Ab 77 (T6SS-) et Ab 49 (T6SS+), ne présentent pas de différence significative pour l'expression des trois gènes d'intérêt. Pour les souches Ab 55 et Ab 78, toutes deux T6SS+, la quantification des transcrits pour l'ensemble des gènes est significativement supérieure aux autres souches. Pour finir, la souche Ab 75 (T6SS-) présente une différence d'expression significative avec l'ensemble des souches pour *tssM* et *1301*. Cependant, cette souche ne présente pas de différence significative d'expression pour *hcp* avec la souche Ab 49 (T6SS+).



**Figure 22 :** Comparaison de la quantification des transcrits de *tssM* (A), de *hcp* (B) et de *1301* (C) pour les souches T6SS+ et T6SS-

## IX. Discussion

---

T6SS est un facteur de virulence largement répandu parmi les bacilles à Gram négatif. Les études portant sur T6SS chez *A. baumannii* ont été réalisées sur des souches cliniques anciennes qui semblent peu refléter l'activité de T6SS des souches actuelles. À notre connaissance, aucune étude n'avait jusqu'à présent exploré l'expression des gènes le composant en présence ou en l'absence du plasmide pAB3. Nous avons travaillé sur 10 souches d'origine clinique et une souche environnementale afin de comparer l'expression des transcrits. Pour cela nous avons décidé de cibler trois gènes de sous-complexes différents de T6SS : la queue contractile avec *hcp*, le complexe membranaire avec *tssM* (101), et enfin *1301* qui semble remplacer le gène *tssJ* absent de *A. baumannii* (étude en cours de publication, E. Durand *et al.*).

Après avoir réalisé la mise au point de la méthode, nous avons travaillé en deux temps. Premièrement, l'évaluation de la méthode a été effectuée à l'aide de deux souches témoins, une souche exprimant T6SS (T+) et une souche ne l'exprimant pas liée à la présence du plasmide pAB3 (T-). Parallèlement, ces deux témoins ont été utilisés pour comparer deux milieux différents, LB et BHI, le milieu BHI étant plus riche et moins utilisé dans les expérimentations décrites dans la littérature. Secondairement, la quantification des transcrits a été étudiée chez 11 souches.

Concernant les résultats des témoins, ils ont montré que le gène *hcp* s'exprimait plus fortement que les gènes *tssM* et *1301*, quel que soit la souche. De plus, les expressions des gènes de notre souche T+ étaient, de façon significative, plus importantes que celles de notre souche T-, confirmant la présence d'un répresseur chez la souche T-. Ainsi, ces résultats valident la mise au point de la méthode de quantification des transcrits. Concernant la comparaison des milieux, aucune différence significative n'était retrouvée pour chacun des gènes de la souche T+, alors qu'il existait une différence significative pour les gènes *hcp* et *1301* de la souche T-, les gènes étant moins exprimés en milieu LB. Il semble difficile d'interpréter cette variation d'expression des gènes *hcp* et *1301* entre les deux milieux pour la souche T-.

Pour l'ensemble de nos souches, nous avons pu constater une expression plus élevée de *hcp* par rapport à *tssM* et *1301*, ce qui est concordant avec le fait que la protéine Hcp doit être produite en quantité importante afin de former le corps de la queue contractile et qu'elle est excrétée en dehors de la bactérie, donc non recyclée (101). Pour les gènes *tssM* et *1301* codant des protéines du complexe membranaire, il n'est pas étonnant qu'ils soient moins exprimés puisqu'ils forment une structure stable non excrétée, donc recyclable (101). Nous constatons tout de même une différence d'expression entre *tssM* et *1301*, ce dernier semblant légèrement sous-exprimé. Cependant, bien que nous suspicions que la protéine AsaB, codée par le gène *1301*, remplace la lipoprotéine TssJ, nous n'avons actuellement aucune preuve quant au rôle exact de cette protéine. Il semble donc difficile d'interpréter la variation d'expression entre *1301* et *tssM*.

En revanche, nos résultats ont montré des variations, significatives ou non (annexe 5), d'expression des transcrits entre nos différentes souches au sein des groupes T6SS+ et T6SS-. De façon générale, l'expression des gènes des souches n'hébergeant pas pAB3 était plus élevée que celle des souches l'hébergeant, avec quelques particularités.

Pour le groupe des souches T6SS+, les résultats semblaient relativement homogènes, à l'exception des souches Ab 50 et Ab 52. Pour Ab 52, bien que la souche soit porteuse de T6SS d'après les résultats des PCR spécifiques réalisées au cours d'une étude précédente, l'expression des trois gènes était absente. Un problème d'extraction des ARN a été exclu puisque l'expression de *cnp60* semblait normale. En revanche, la présence d'un autre répresseur, plasmidique ou non, pourrait expliquer ces résultats. Concernant la souche Ab 50, le niveau d'expression apparaissait équivalent au niveau d'expression des souches T6SS- telles que Ab 09 et Ab 89, comme si cette souche hébergeait elle aussi un répresseur qui ne serait pas hébergé par pAB3. Il est à noter que la différence d'expression entre les souches Ab 52 et Ab 50 pourrait s'expliquer par la présence d'un répresseur différent. La souche Ab 55 exprimait T6SS de façon plus importante que les souches Ab 09 et Ab 50 également isolées d'un prélèvement d'urine mais hébergeant certainement toutes les deux un répresseur. Bien que nous n'ayons pas d'information sur l'origine de l'urine, nous pouvons quand même envisager qu'il s'agissait d'un prélèvement polymicrobien, de type urine sur sonde par exemple, pouvant expliquer l'expression élevée de T6SS chez cette souche. Enfin, pour la souche Ab 78, issue d'une hémoculture, de manière surprenante l'expression des transcrits pour les trois gènes était significativement supérieure aux autres souches T6SS+. Malgré l'absence d'information sur le contexte du patient, nous pouvons là aussi envisager une situation qui pourrait être une translocation sanguine à partir d'un site polymicrobien tel que l'appareil respiratoire ou le tube digestif. En effet, *A. baumannii* entre alors en compétition avec les autres bactéries présentes au niveau du site et exprimerait ainsi davantage T6SS afin de pouvoir s'y implanter.

Pour le groupe des souches T6SS-, si on se réfère à la souche T-, l'expression des gènes était significativement plus élevée, excepté pour la souche Ab 76 pour laquelle, quel que soit le gène, l'expression de T6SS est significativement plus faible que le témoin. En revanche, pour les souches Ab 48, Ab 75 et Ab 77, les niveaux d'expression de chacun des gènes étaient au niveau de la souche T+, signifiant probablement l'absence de répresseur. Hors, pour ces quatre souches, les PCR de screening avait bien détecté la présence de pAB3 par l'obtention d'un fragment d'amplification de taille attendu mais avec une température d'hybridation des oligonucléotides pour la réaction de PCR inférieure à celle normalement utilisée. Afin d'être sûr qu'il s'agit bien de pAB3, il paraît nécessaire de séquencer le fragment obtenu dans les trois cas. Si la présence de ce plasmide était alors confirmée, il sera nécessaire de séquencer entièrement le plasmide de ces quatre souches afin d'en connaître les compositions exactes. Quant aux souches Ab 09 et Ab 89, bien que les niveaux d'expression des transcrits des trois gènes étaient supérieurs à la souche T-, ceux-ci étaient bien plus faibles que ceux de la souche T+, illustrant ainsi leur probable répression.

Enfin, dans la littérature il est décrit que pour les souches de *A. baumannii*, les plasmides responsables de la répression de T6SS et différents de pAB3 sont des plasmides de multirésistance (126). Hors, la souche Ab 52 est rendue comme résistante à tous les antibiotiques et n'exprime pas T6SS. Ces résultats pourraient suggérer la présence d'un autre plasmide tel que pAB04-1 ou pAB5 qui sont décrits comme hébergeant respectivement 12 et 15 cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques (125,126).

## Conclusion et perspectives

---

Les résultats présentés dans cette étude nous ont permis de valider notre méthode de quantification des gènes *hcp*, *tssM* et *1301* de T6SS chez *A. baumannii*. Ces premiers résultats seront complétés par l'étude de plus d'une centaine de souches d'origine variée (humaine, animale et environnementale). Néanmoins, ces premiers résultats nous ont permis de montrer qu'il y avait bien une différence de quantification des transcrits entre les souches, notamment entre celles qui hébergeaient un répresseur et celles qui n'en hébergeaient pas. Les souches pour lesquelles les résultats étaient ou seront discordants par rapport à ceux attendus seront investiguées soit par du séquençage de fragment amplifié, soit par du « Whole Genome Sequencing ». Cette étude des transcrits sera complétée par une étude sur l'expression et la sécrétion de la protéine Hcp par dot blot et western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux. La comparaison des résultats obtenus au cours de ces deux études nous permettra d'étudier une éventuelle régulation post-transcriptionnelle de T6SS chez *A. baumannii*.

Enfin l'obtention de données cliniques et biologiques en comparaison aux résultats de l'étude pour un certain nombre de souches devrait nous permettre de faire un état des lieux de l'expression de T6SS sur des souches plus récentes et de mieux comprendre son implication dans la virulence de *A. baumannii*.

## Références bibliographiques

---

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-82.
2. Brisou J, Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur.* 1954;86(6):722-8.
3. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*)1. *J Bacteriol.* 1968;95(5):1520-41.
4. ROSSAU R, VAN LANDSCHOOT A, GILLIS M, DE LEY JY 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Evol Microbiol.* 41(2):310-9.
5. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwofii*. *Group Of.* 1986;13.
6. Houang ETS, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, et al. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):228-34.
7. Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou ML, et al. Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(7):2359-67.
8. Huys G, Bartie K, Cnockaert M, Hoang Oanh DT, Phuong NT, Somsiri T, et al. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res Microbiol.* 2007;158(3):228-35.
9. Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J Appl Microbiol.* 1999;87(5):659-67.
10. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect.* 1999;42(3):201-4.
11. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou ML. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis.* 2013;17(10):e802-5.
12. Francey T, Gaschen F, Nicolet J, Burnens AP. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an Intensive Care Unit. *J Vet Intern Med.* 2000;14(2):177-83.
13. Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Bertschy I, Rossano A, Koch C, et al. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2248-54.

14. Dijkshoorn L, Aken E van, Shunburne L, Reijden TJK van der, Bernards AT, Nemec A, et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(4):329-32.
15. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* Species on Skin of Healthy Humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18(3):179-83.
16. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2819-25.
17. Chu YW, Leung CM, Houang ETS, Ng KC, Leung CB, Leung HY, et al. Skin carriage of *Acinetobacter*s in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2962-7.
18. Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(4):275-9.
19. Cefai C, Richards J, Gould FK, McPeake P. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J Hosp Infect.* 1990;15(2):177-82.
20. Beck-Sagué CM, Jarvis WR, Brook JH, Culver DH, Potts A, Gay E, et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am J Epidemiol.* 1990;132(4):723-33.
21. Cunha BA, Klimek JJ, Gracewski J, McLaughlin JC, Quintiliani R. A common source outbreak of *Acinetobacter* pulmonary infections traced to Wright respirometers. *Postgrad Med J.* 1980;56(653):169-72.
22. Sherertz RJ, Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis.* 1985;151(2):252-8.
23. Weernink A, Severin WP, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect.* 1995;29(3):189-99.
24. Allen KD, Green HT. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect.* 1987;9(2):110-9.
25. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):687-93.
26. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):409-47.
27. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics.* 2020;9(3):119.
28. Iii JPL, Zhanel GG, Clark NM. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: treatment options. *Semin Respir Crit Care Med.* 2017;38(3):311-25.

29. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* 2005;31(5):649-55.
30. Sharma R, Goda R, Borkar SA, Katiyar V, Agarwal S, Kumar A, et al. Outcome following postneurosurgical *Acinetobacter* meningitis: an institutional experience of 72 cases. *Neurosurg Focus.* 2019;47(2):E8.
31. Mellouli A, Maamar B, Bouzakoura F, Messadi AA, Thabet L. Colonisation et infection à *Acinetobacter baumannii* dans une unité de réanimation des brûlés en Tunisie. *Ann Burns Fire Disasters.* 2021;34(3):218-25.
32. Matthews L, Goodrich JS, Weber DJ, Bergman NH, Miller MB. The brief case: a fatal case of necrotizing fasciitis due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2019;57(7):e01751-18.
33. Oliveira PR, Carvalho VC, Saconi ES, Leonhardt MC, Kojima KE, Santos JS, et al. Tigecycline versus Colistin in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* complex osteomyelitis. *J Bone Jt Infect.* 2020;5(2):60-6.
34. Lahmidi I, Charmake D, Elouafi N, Bazid Z. *Acinetobacter Baumannii* Native Valve Infective Endocarditis: A Case Report. *Cureus.* 2020;12(11):e11527.
35. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.* 2014;71(3):292-301.
36. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(12):857-68.
37. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest.* 2006;129(1):102-9.
38. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Extremity Infections in Soldiers. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1218-24.
39. Oncul O, Keskin O, Acar H.V, Kucukardali Y, Evrenkaya R, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect.* 2002;51(1):47-51
40. Garzoni C, Emonet S, Legout L, Benedict R, Hoffmeyer P, Bernard L, et al. Atypical infections in tsunami survivors. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1591-3.
41. Decré D. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques: un modèle d'adaptation. *Rev Francoph Lab.* 2012;2012(441):43-52.
42. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539.
43. L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques [Internet]. 2017 [cité 15 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

44. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, Nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):428-32.
45. Karah N, Jolley KA, Hall RM, Uhlin BE. Database for the ampC alleles in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0176695.
46. Jia H, Chen Y, Wang J, Ruan Z. Genomic characterisation of a clinical *Acinetobacter baumannii* ST1928 isolate carrying a new ampC allelic variant blaADC-196 gene from China. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:43-5.
47. Evans BA, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):241-63.
48. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974-6.
49. Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E, Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid*. 1983;10(2):138-47.
50. Devaud M, Kayser FH, Bächli B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22(2):323-9.
51. Paul G, Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E, Névot P, Philippon A. Novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1989;50(1-2):45-50.
52. Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, et al. Identification of the Novel Narrow-Spectrum  $\beta$ -Lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2179-84.
53. Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(12):2757-9.
54. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(2):123-30.
55. Figueiredo S, Poirel L, Croize J, Recule C, Nordmann P. In Vivo Selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAba1-mediated overexpression of the natural blaOXA-66 oxacillinase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2657-9.
56. Huang Z mi, Mao P hua, Chen Y, Wu L, Wu J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2004;25(5):425-7.
57. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2  $\beta$ -Lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):3978-84.

58. Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2265-9.
59. Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1708-13.
60. Davoodi S, Boroumand MA, Sepehriseresht S, Pourgholi L. Detection of VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in two hospitals in Tehran. *Iran J Biotechnol.* 2015;13(1):63-7.
61. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1260-2.
62. Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules.* 2020;10(5):720.
63. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -Lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1556-61.
64. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):202-8.
65. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5035-8.
66. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D  $\beta$ -Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2121-6.
67. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1354-7.
68. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the blaKPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2016;16:737.
69. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3579-81.
70. Cayô R, Rodríguez MC, Espinal P, Fernández-Cuenca F, Ocampo-Sosa AA, Pascual Á, et al. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5907-13.
71. Xu C, Bilya SR, Xu W. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes New Infect.* 2019;30:100549.

72. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*. 1998;47(5):455-62.
73. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(11):1349-53.
74. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, et al. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infect Drug Resist*. 2020;13:423-34.
75. Hamouda A, Amyes SGB. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(3):695-6.
76. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):557-62.
77. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4362-4.
78. Beheshti M, Ardebili A, Beheshti F, Lari AR, Siyadatpanah A, Pournajaf A, et al. Tetracycline resistance mediated by tet efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2020;62:e88.
79. Trebosc V, Gartenmann S, Tötzl M, Lucchini V, Schellhorn B, Pieren M, et al. Dissecting Colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *mBio*. 2019;10(4):e01083-19.
80. Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci*. 2020;27:26.
81. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;301(2):224-31.
82. Sánchez-Encinales V, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Garnacho-Montero J, et al. Overproduction of Outer membrane protein A by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *J Infect Dis*. 2017;215(6):966-74.
83. Labrador-Herrera G, Pérez-Pulido AJ, Álvarez-Marín R, Casimiro-Soriguer CS, Cebrero-Cangueiro T, Morán-Barrio J, et al. Virulence role of the outer membrane protein CarO in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 2020;11(1):1727-37.
84. Sato Y, Unno Y, Kawakami S, Ubagai T, Ono Y 2017. Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *J Med Microbiol*. 2017;66(2):203-12.

85. Rumbo C, Tomás M, Fernández Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014;82(11):4666-80.
86. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun*. 2010;78(9):3993-4000.
87. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, et al. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun*. 2010;78(5):2017-23.
88. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Baquir B, Tomaras A, et al. Inhibition of LpxC Protects Mice from Resistant *Acinetobacter baumannii* by Modulating Inflammation and Enhancing Phagocytosis. *mBio*. 2 oct 2012;3(5):e00312-12.
89. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010;78(5):1952-62.
90. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV, et al. Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167068
91. Waack U, Warnock M, Yee A, Huttinger Z, Smith S, Kumar A, et al. CpaA is a glycan-specific adamalysin-like protease secreted by *Acinetobacter baumannii* that inactivates coagulation factor XII. *mBio*. 2018;9(6):e01606-18.
92. Skerniškytė J, Karazijaitė E, Lučiūnaitė A, Sužiedėlienė E. OmpA protein-deficient *Acinetobacter baumannii* Outer membrane vesicles trigger reduced inflammatory response. *Pathogens*. 2021;10(4):407.
93. Tiku V, Kofoed EM, Yan D, Kang J, Xu M, Reichelt M, et al. Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2021;11:618.
94. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Parilova O, Teneberg S, et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(21):5558-63.
95. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated Protein. *J Bacteriol*. 2008;190(3):1036-44.
96. Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N-acyl homoserine lactones. *ACS Chem Biol*. 2012;7(10):1719-28.
97. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD Locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of Poly- $\beta$ -1-6-N-Acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol*. 2009;191(19):5953-63.
98. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*. 2011;157(Pt 9):2534-44.

99. Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg AY. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019;10:1601.
100. Basler M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2015;370(1679):20150021.
101. Cherrak Y, Flaugnatti N, Durand E, Journet L, Cascales E. Structure and Activity of the Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4).
102. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type 6 secretion system. *Cell Host Microbe.* 2014;15(1):9-21.
103. Coulthurst S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology.* 2019;165(5):503-15.
104. Lien YW, Lai EM. Type VI secretion effectors: methodologies and biology. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:254.
105. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(2):137-48.
106. Alteri CJ, Mobley HLT. The Versatile Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2):10.1128.
107. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15508-13.
108. Brooks TM, Unterweger D, Bachmann V, Kostiuk B, Pukatzki S. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *J Biol Chem.* 2013;288(11):7618-25.
109. Toesca IJ, French CT, Miller JF. The Type VI secretion system spike protein VgrG5 mediates membrane fusion during intercellular spread by *Pseudomallei* Group Burkholderia Species. *Infect Immun.* 2014;82(4):1436-44.
110. Ma J, Pan Z, Huang J, Sun M, Lu C, Yao H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence.* 2017;8(7):1189-202.
111. Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the Type VI secretion system spike. *Nature.* 2013;500(7462):350-3.
112. Wang T, Si M, Song Y, Zhu W, Gao F, Wang Y, et al. Type VI secretion system transports Zn<sup>2+</sup> to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):e1005020.
113. Brackmann M, Wang J, Basler M. Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction. *EMBO Rep.* 2018;19(2):225-33.
114. Vettiger A, Winter J, Lin L, Basler M. The type VI secretion system sheath assembles at the end distal from the membrane anchor. *Nat Commun.* 2017;8:16088.
115. Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e59388.

116. Kim J, Lee JY, Lee H, Choi JY, Kim DH, Wi YM, et al. Microbiological features and clinical impact of the type VI secretion system (T6SS) in *Acinetobacter baumannii* isolates causing bacteremia. *Virulence*. 2017;8(7):1378-89.
117. Meumann EM, Anstey NM, Currie BJ, Piera KA, Kenyon JJ, Hall RM, et al. Genomic epidemiology of severe community-onset *Acinetobacter baumannii* infection. *Microb Genomics*. 2019;5(3):e000258.
118. Repizo GD, Espariz M, Seravalle JL, Salcedo SP. Bioinformatic Analysis of the Type VI Secretion System and Its Potential Toxins in the *Acinetobacter* Genus. *Front Microbiol*. 2019;10:2519.
119. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio*. 2014;5(1):e00963-13.
120. Li L, Wang YN, Jia HB, Wang P, Dong JF, Deng J, et al. The type VI secretion system protein AsaA in *Acinetobacter baumannii* is a periplasmic protein physically interacting with TssM and required for T6SS assembly. *Sci Rep*. 2019;9:9438.
121. Weber BS, Hennon SW, Wright MS, Scott NE, de Berardinis V, Foster LJ, et al. Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. *mBio*. 2016;7(5):e01253-16.
122. Fitzsimons TC, Lewis JM, Wright A, Kleifeld O, Schittenhelm RB, Powell D, et al. Identification of novel *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system antibacterial effector and immunity pairs. *Infect Immun*. 2018;86(8):e00297-18.
123. Elhosseiny NM, Attia AS. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7:33.
124. Ringel PD, Hu D, Basler M. The role of type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer. *Cell Rep*. 2017;21(13):3927-40.
125. Weber BS, Ly PM, Irwin JN, Pukatzki S, Feldman MF. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(30):9442-7.
126. Benomar S, Di Venanzio G, Feldman MF. Plasmid-encoded H-NS controls extracellular matrix composition in a modern *Acinetobacter baumannii* urinary isolate. *J Bacteriol*. 2021;203(21):e00277-21.
127. Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy MC. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet*. 2010;6(1):e1000793.

## Annexes

---

Annexe 1. Résultats du screening de gènes de T6SS des souches de <i>A. baumannii</i> associés à leurs antibiogrammes.....	73
Annexe 2. Liste des amorces utilisées au cours de l'étude .....	74
Annexe 3. Résultats des gammes étalons pour les gènes <i>cnp60</i> (A), <i>hcp</i> (B) et <i>1301</i> (C). .....	75
Annexe 4. Composition des milieux LB et BHI .....	78
Annexe 5. Résultats des tests statistiques pour les gènes <i>tssM</i> (A), <i>hcp</i> (B) et <i>1301</i> (C)..	79

**Annexe 1. Résultats du screening de gènes de T6SS des souches de *A. baumannii* associés à leurs antibiogrammes.**

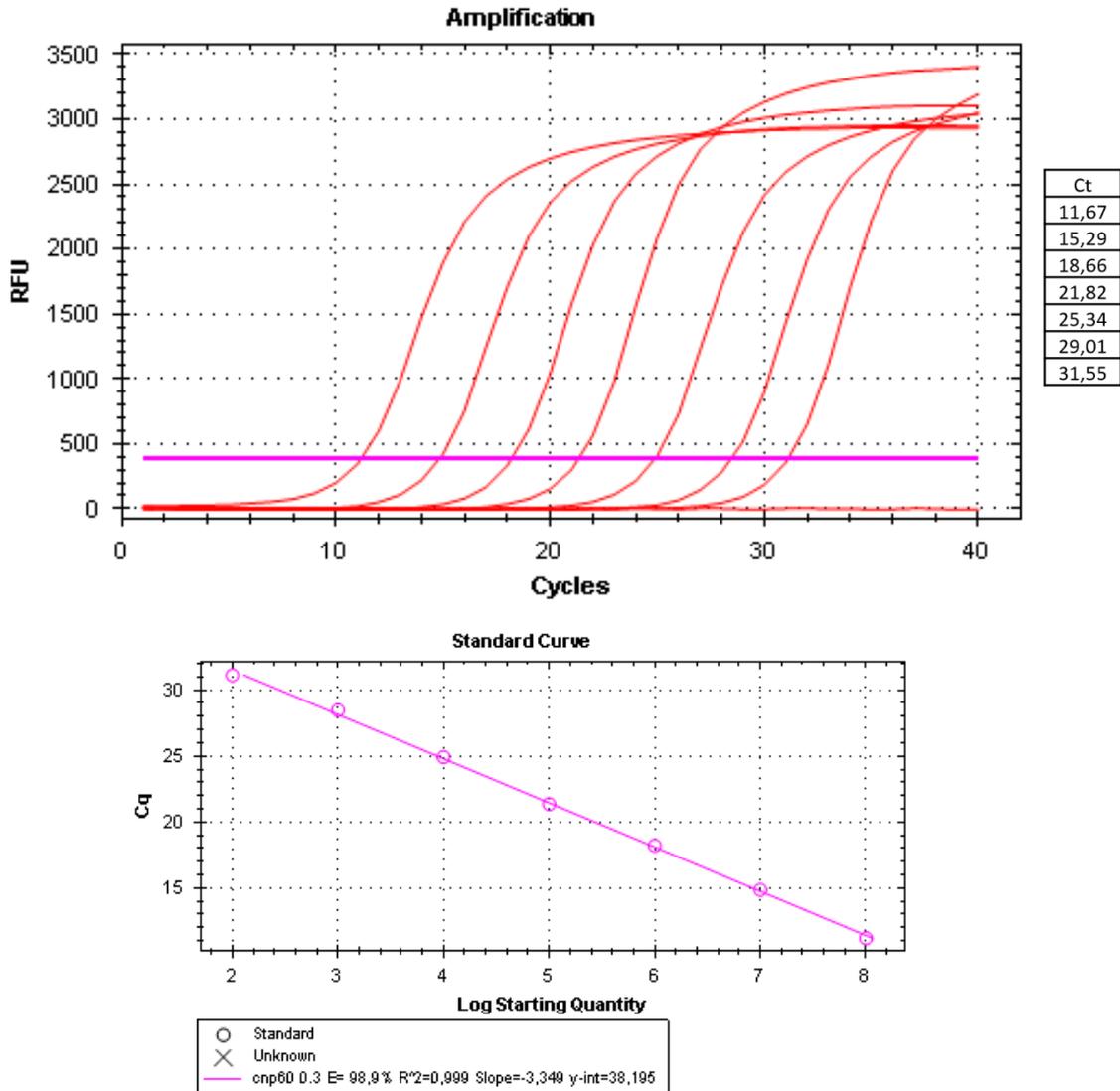
N°	Echantillon	<i>tssM</i>	<i>1301</i>	<i>hcp</i>	<i>pAB3</i>	<i>OmpA</i>	TIC	TCC	PIP	PTZ	CAZ	FEP	IMI	MEM	CIP	LVX	GM	TOB	SXT
9	Urine	+	+	+	+	+	R	R	R	S	S	I	S		R		R	S	S
75	Nez/Gorge	+	+	+	+ H=40°C	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
76	Dépistage rectal	+	+	+	+ H=40°C	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
77	Aspiration trachéale	+	+	+	+ H=40°C	+	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R
48	Laboratoire hygiène : paillasse	+	+	+	+ H=40°C	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
89	Dépistage rectal	+	+	+	+	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
49	Aspiration bronchique	+	+	+	-	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
50	Urine	+	+	-	-	+	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
52	Aspiration trachéale	+	+	+	-	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
55	Urine	+	+	+	-	+	R	I	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
78	Hémoculture	+	+	+	-	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

## Annexe 2. Liste des amorces utilisées au cours de l'étude

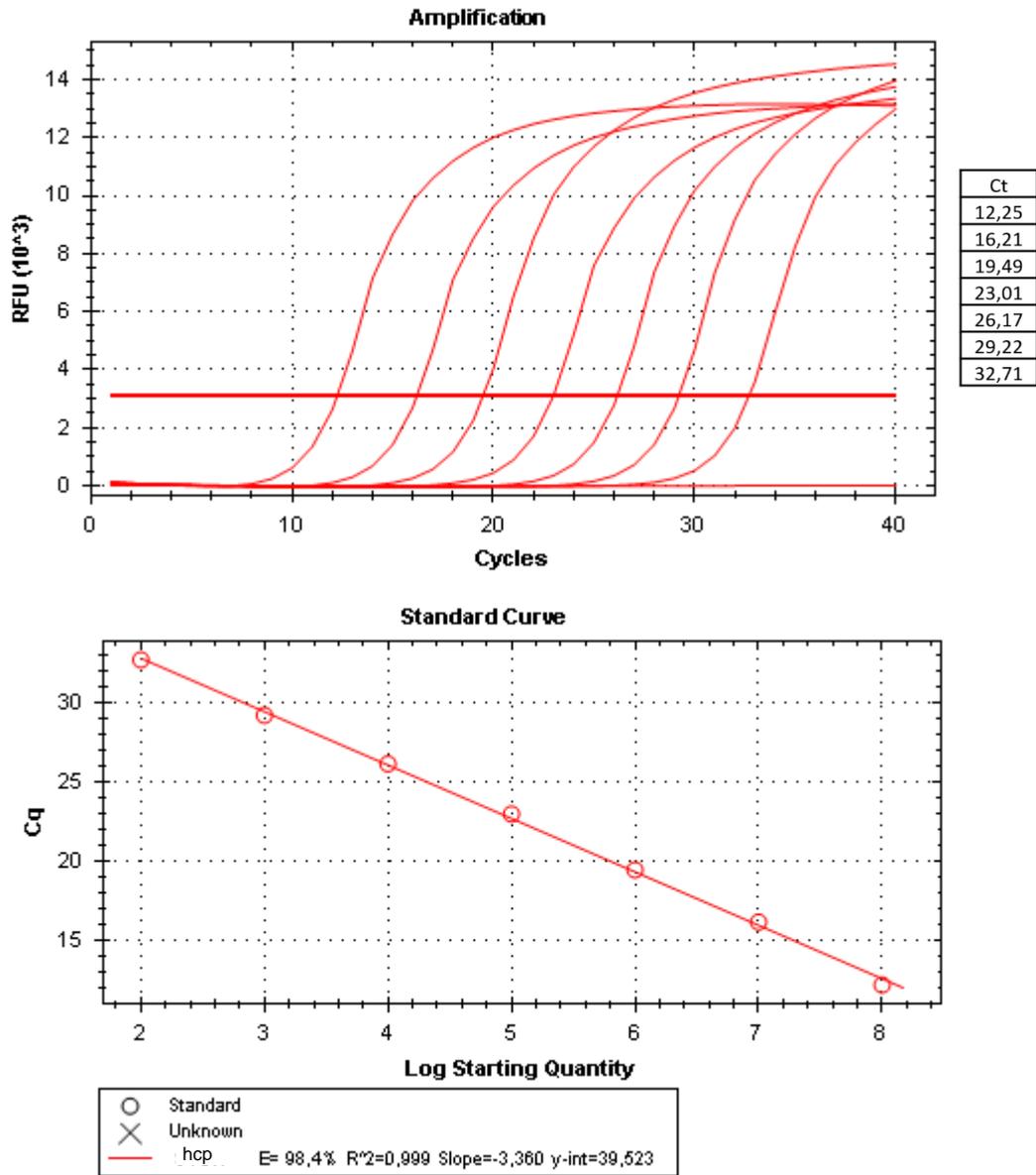
Amorces pour :	Nom	Séquence	Gène cible	Taille
<b>In-Fusion</b>	cnp60-Ab-F	AAGTTATTCTATGTCAGCTAAAGACGT AAAATTTG	Cnp60	201 pb
	cnp60-Ab-R	AAAGCACCGCCGGACAAGCTTCAAAC TTGTCTTTTAATGAAATTT		
	rpoB-Ab-F	ACAAAGAAAATGGCATACTCATATAC CGAAAAGAA	rpoB	201 pb
	rpoB-Ab-R	TAGCTGACATAGAATAACTTTTCGATAG GAAAAACT		
	1301-Ab-F	AGCTGCAACTATGATTAATAAAAAATATT ACTCTCA	1301	200 pb
	1301-Ab-R	GAGTATGCCATTTTCTTTGTAGCTTTT ATAAACCC		
	TssM-Ab-F	AAAGACTTAGATGTCTTCCTATACTTC AATTCCTC	TssM	200 pb
	TssM-Ab-R	TTTTAATCATAGTTGCAGCTCTTCTTT ATCTTT		
	Hcp-Ab-F	TCCGCTAGTGATATCGAATTATGAAA GATATACGTTGAGTTTC	Hcp	202 pb
	Hcp-Ab-R	AGGAAGACATCTAAGTCTTTTACGAA AACCATGTC		
<b>qPCR</b>	cnp60-Abt-F	GTGATTCAGCTCGCTCAAAA	Cnp60	150 pb
	cnp60-Abt-R	CTTTTGCAACAGTTACACCGTCT		
	rpoB-Abt-F	TTGGTAAATTGCCCAAGTAA	rpoB	150 pb
	rpoB-Abt-R	TTTCGATAGGAAAACTGAACGA		
	1301-Abt-F	CCAAGGTGACAAGATCACCAA	1301	150 pb
	1301-Abt-R	TTACTCTCATTCATCGCTATTTTTACA		
	TssM-Abt-F	TGCATATGCTTTAGGGCTCA	TssM	150 pb
	TssM-Abt-R	AGTTGCAGCTCTTCTTTATCTTTATTT		
	Hcp-Abt-F	TCAACACGTTTCAGCAGTGTG	Hcp	153 pb
	Hcp-Abt-R	CGTTGAGTTTCGCGGTAAT		
<b>Séquençage</b>	pSU38-verif-sq	GCCCACCCCTGTCCCTC	Insert	Environ 1100 pb
	MRV-D2	TTCTGCTGACGCACCGGTG	Insert	

Annexe 3. Résultats des gammes étalons pour les gènes *cnp60* (A), *hcp* (B) et *1301* (C).

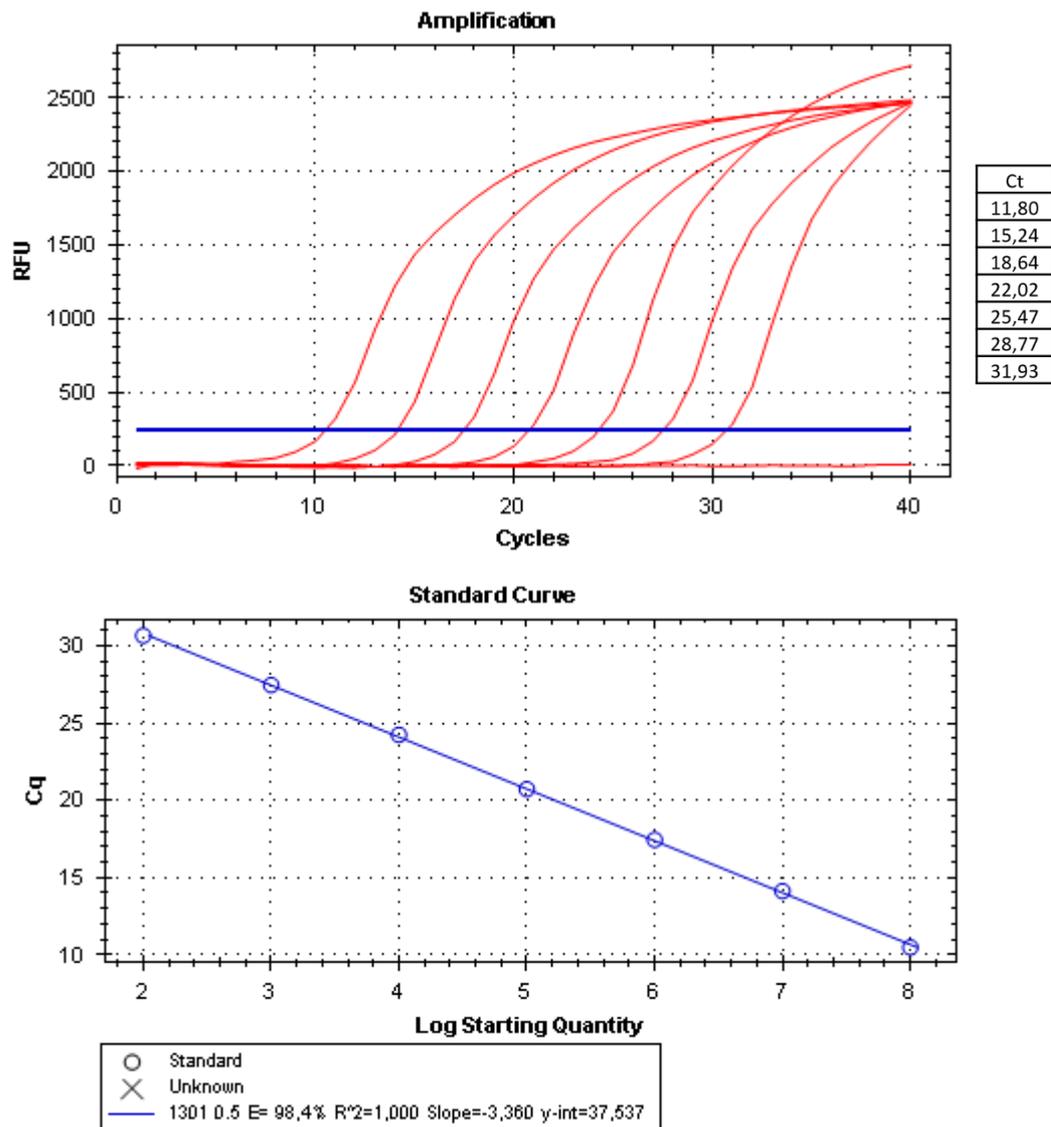
**A:**



**B :**



C:



#### **Annexe 4. Composition des milieux LB et BHI**

##### Lysogeny Broth (LB) Recipe (ThermoFischer website)

- 5g NaCl
- 10g Tryptone
- 5g Yeast Extract Powder
- TRIS (<0,1%)
- Qsp 1L H2O

##### Brain Heart Infusion (BHI) Recipe (ThermoFischer website)

- 14.5 g Casein Peptone
- 2.5 g Disodium Phosphate
- 7.0 g Meat Peptone
- 2.0 g Dextrose
- 6.0 g Brain Heart Infusion Solids
- 6 % Sheep Blood (optional)
- 5.0 g Sodium Chloride
- 15.0 g Agar
- Qsp 1L H2O

## Annexe 5. Résultats des tests statistiques pour les gènes *fssM* (A), *hcp* (B) et *1301* (C).

Avec ns (non significatif) : p-value > 0,05 ; \* : p-value < 0.05 ; \*\* : p-value <0.001

### A :

	T+	T-	Ab 09	Ab 75	Ab 77	Ab 48	Ab 89	Ab 49	Ab 50	Ab 55	Ab 78
Ab 09	*	**									
Ab 75	*	**	**								
Ab 77	ns	**	*	ns							
Ab 48	*	**	**	**	ns						
Ab 89	*	**	ns	**	ns	**					
Ab 49	*	**	**	**	ns	ns	**				
Ab 50	*	**	ns	**	ns	**	ns	**			
Ab 55	*	**	**	**	ns	ns	**	**	**		
Ab 78	*	**	**	**	ns	**	**	**	**	*	

### B :

	T+	T-	Ab 09	Ab 75	Ab 77	Ab 48	Ab 89	Ab 49	Ab 50	Ab 55	Ab 78
Ab 09	*	ns									
Ab 75	ns	**	**								
Ab 77	ns	**	*	ns							
Ab 48	*	**	**	ns	ns						
Ab 89	*	**	ns	**	*	**					
Ab 49	*	**	**	ns	ns	ns	**				
Ab 50	*	**	ns	**	*	**	ns	**			
Ab 55	*	**	**	**	ns	ns	**	**	**		
Ab 78	*	**	**	**	ns	ns	**	**	**	*	

### C :

	T+	T-	Ab 09	Ab 75	Ab 77	Ab 48	Ab 89	Ab 49	Ab 50	Ab 55	Ab 78
Ab 09	*	**									
Ab 75	*	*	ns								
Ab 77	ns	*	*	ns							
Ab 48	ns	*	**	**	ns						
Ab 89	*	**	ns	**	**	**					
Ab 49	*	*	**	**	ns	ns	**				
Ab 50	*	*	*	ns	ns	*	**	*			
Ab 55	*	*	**	**	ns	ns	**	**	**		
Ab 78	ns	*	**	**	ns	**	**	**	**	**	

## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- 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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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.

## Étude clinique et moléculaire du système de sécrétion de type VI, un facteur de virulence chez *Acinetobacter baumannii*

---

Devant les impasses thérapeutiques rencontrées dernièrement, notamment avec *Acinetobacter baumannii*, de nouveaux mécanismes de lutte antibactérienne voient le jour, tel que le blocage de facteurs de virulence. Le système de sécrétion de type VI (T6SS), une nanomachine de virulence utilisée pour la compétition bactérienne et l'infection des cellules eucaryotes, est une cible prometteuse. L'objectif de ce travail est de quantifier des transcrits de gènes codant pour la structure de T6SS chez des souches d'une collection de *A. baumannii* d'origine variée afin de comprendre son implication clinique chez *A. baumannii*. La quantification des transcrits par qPCR a été mise au point à l'aide d'un plasmide recombinant contenant des fragments des gènes d'intérêt. La méthode a été testée sur un témoin T6SS+ et un témoin T6SS- hébergeant le plasmide de répression pAB3. La quantification des transcrits a ensuite été réalisée sur 10 souches cliniques et une souche environnementale. Les résultats présentés dans cette étude nous ont permis de valider la méthode de quantification des transcrits des gènes de T6SS. Nous avons également mis en évidence une expression différente des gènes selon l'origine des souches mais aussi selon la présence ou non d'un répresseur, ainsi que la possible présence de répresseurs différents de pAB3 ayant un niveau variable de répression.

---

**Mots-clés :** *Acinetobacter baumannii*, antibiorésistance, facteur de virulence, système de sécrétion de type VI, transcrits.

## Clinical and molecular study of the type VI secretion system, a virulence factor in *Acinetobacter baumannii*

---

In the context of therapeutic difficulties encountered recently, in particular with *Acinetobacter baumannii*, new mechanisms of antibacterial control are emerging, such as the blocking of virulence factors. The type VI secretion system (T6SS), a virulence nanomachine used for bacterial competition and infection of eukaryotic cells, is a promising target. The aim of this study was to quantify transcripts of genes encoding the structure of T6SS in strains from a collection of *A. baumannii* of diverse origin in order to understand its clinical implication in *A. baumannii*. Quantification of transcripts by qPCR was developed using a recombinant plasmid containing fragments of genes of interest. The method was tested on a T6SS+ control and a T6SS- control harboring a pAB3 repression plasmid. The quantification of transcripts was then performed on 10 clinical strains and one environmental strain. The first results showed a difference in transcript quantification between the strains, especially between those hosting a repressor and those not hosting one. The results presented in this study allowed us to validate the method of quantification of T6SS gene transcripts. We also highlighted a different expression of the genes according to the origin of the strains but also in function of the presence or not of a repressor, and the possible presence of repressors different of pAB3 having a variable level of repression.

---

**Keywords :** *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, virulence factors, type VI secretion system, transcripts.

