



Modes et mécanismes de survie environnementale des bactéries *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*

Camille Brunet

► To cite this version:

Camille Brunet. Modes et mécanismes de survie environnementale des bactéries *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. ⟨NNT : 2022GRALS010⟩. ⟨tel-03774930⟩

HAL Id: tel-03774930

<https://theses.hal.science/tel-03774930v1>

Submitted on 12 Sep 2022

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

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



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Camille BRUNET

Thèse dirigée par **Max MAURIN**, Université Grenoble Alpes
et co-encadrée par **Yvan CASPAR**, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Translational Innovation in Medicine and Complexity**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

**Modes et mécanismes de survie
environnementale de la bactérie
Francisella tularensis ssp. *holarctica***

**Modes and mechanisms of environmental
survival of the bacterium *Francisella tularensis*
ssp. *holarctica***

Thèse soutenue publiquement le **31 mars 2022**, devant le jury
composé de :

Monsieur Patrice MORAND

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Doyen de la faculté de médecine, Université Grenoble Alpes, Président du jury

Madame Sophie JARRAUD

PROFESSEURE DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université de Lyon, Rapporteuse

Madame Nadia HADDAD

PROFESSEURE, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Rapporteuse

Monsieur Thomas HENRY

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM, Université de Lyon, Examineur

Madame Emmanuelle GUILLOT-COMBE

DOCTEURE EN SCIENCE, DGA, Membre invitée

Monsieur Max MAURIN

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Yvan CASPAR

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Co-encadrant



A mes enfants
Lucas et Nathan

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les membres du jury qui acceptent d'évaluer ce travail. Professeur Patrice Morand, merci de votre accueil au CHU Grenoble Alpes et d'avoir accepté de présider ce jury. Professeure Nadia Haddad et Professeure Sophie Jarraud, merci de l'intérêt que vous accordez à ces travaux et d'avoir accepté d'en être rapporteuses. Docteur Thomas Henry merci pour nos échanges autour du projet Tulamibe et d'avoir accepté d'être examinateur de ces travaux. Docteure Emmanuelle Guillot-Combe, merci pour nos échanges durant la thèse et d'avoir accepté de participer au jury. Je remercie également mon directeur de thèse, Professeur Max Maurin, merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce doctorat. Enfin, je remercie mon co-encadrant qui a supervisé ce travail avec extrême bienveillance, le Docteur Yvan Caspar. Merci pour toute ton aide sur l'écriture et sur la thèse en général. Merci pour tes relectures de manuscrits d'articles et de thèse, avec des délais parfois très courts, merci de m'avoir apporté tes conseils jusqu'au bout de cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier la Direction Générale de l'Armement qui a financé ce doctorat, ainsi que le projet Tulamibe par l'ANR-ASTRID dans lequel se sont inscrits ces travaux de recherche. Je remercie également l'Université Grenoble Alpes qui a financé une prolongation de thèse.

Ce doctorat a été réalisé au sein du laboratoire TIMC, dont je tiens à remercier le directeur le Professeur Alexandre Moreau-Gaudry et de l'équipe Tree que je salue. Je remercie également le Professeur Bertrand Toussaint, particulièrement pour son implication lors du financement de la prolongation de thèse. L'ensemble des travaux du doctorat s'est déroulé au sein du laboratoire de bactériologie du CHU Grenoble Alpes, je tiens à en remercier tous les membres pour leur accueil. Merci aux techniciens pour votre disponibilité, merci de m'avoir toujours aidé dans la bonne humeur, les nombreuses fois où je suis venue vous embêter pour des manip incongrues de recherche. Merci à Laurent pour les nombreuses commandes réceptionnées. Merci Gladys, Danièle et Aurélie pour votre accueil dans votre bureau, pour votre soutien et nos échanges. Merci Isabelle et Christine pour les connaissances que vous m'avez partagées. Merci Sandrine pour ton aide et tes conseils réguliers pendant cette thèse. Merci aux « jeunes du DAI » Thomas, Julien, Yvan, Léa, Claire, Vincent, Benjamin, Iyad et Céline pour nos belles soirées, mais aussi pour nos échanges et l'intégration que vous m'avez offerte au sein du laboratoire.

J'adresse aussi des remerciements sincères aux personnes qui ont véritablement participé à ces travaux de thèse, et que j'ai eu un réel bonheur à rencontrer au cours de ce doctorat. Léa, merci pour ton aide sur les manip, merci pour nos discussions et tes bonnes idées, merci pour ta bonne humeur au quotidien et bien-sûr pour ta relecture de manuscrit. Yvan (encore !), merci pour ton aide générale sur ce travail et d'avoir pris en main l'encadrement de la thèse, malgré tes milles autres projets. Julien, Thomas, merci d'avoir été là durant ce doctorat, merci pour notre quotidien au sein du labo, merci pour les pauses café (pas si nombreuses). Ju', merci pour l'ensemble des manip que tu as finies ou commencées ou les deux... Merci pour ton aide sur les protocoles, merci de me rappeler que quand je dis « t'inquiète le protocole il va marcher comme ça » non, le protocole ne marchera pas. Merci de me rappeler que si, il faut faire ce contrôle, sinon je vais râler et devoir recommencer après. Merci aussi pour tes relectures de manuscrits et toutes les cartes reconnaissances éternelles que je te dois. Tom, merci pour ton accueil au sein du labo, merci pour tout « l'à côté » thèse que tu gères, merci pour ta formation sur les automates, le labo, le CHU, les contacts... Et cela, seulement si on parle de la thèse. Je crois que je ne remercie plus des collègues, mais des amis. Et rien que pour cela, merci !

Ce doctorat est aussi l'occasion de remercier l'ensemble de ma famille. Je remercie Rabiou, je pense pouvoir affirmer que tu as rejoint la famille et j'en suis très heureuse. Merci à ma petite sœur, pour son soutien et sa présence. Je te remercie d'être là dans les bons et les mauvais moments même si je n'ai pas toujours été tendre avec toi, c'est ici l'occasion de m'en excuser et de te remercier de toujours être pas trop loin de nous. Bien sûr, je remercie mes parents pour tout ce qu'ils ont fait et continuent à faire pour moi. Merci pour votre présence et votre soutien avec les enfants, et particulièrement en dernière minute, comme au moment où j'écris ces mots. Merci également pour la force et la sensibilité que vous m'avez transmises au fils des années, vous avez forgé l'adulte que je suis devenu et je vous en remercie. Je finirais en remerciant Ludo, mon conjoint et père de nos enfants, merci de ton soutien indéfectible, merci de toujours m'encourager depuis le début. Il est absolument certain que ce travail n'aurait pas vu le jour sans toi. En le finalisant, j'ai une pensée émue pour nos premières années étudiantes et ces nombreux moments où j'étais persuadé de ne pas y arriver. Tu as toujours été présent pour me motiver et me donner confiance, je t'en remercie encore. Merci d'avoir toujours compris ce que représentait la thèse et les sacrifices qui en ont découlé. Merci d'avoir passé des heures à m'écouter répéter mes présentations, relire mes manuscrits ou simplement déblatérer sur ma thèse. Simplement, merci d'être là et de partager ma vie. Enfin, je remercie mes enfants, Lucas et Nathan. Merci d'avoir fait de moi votre maman, merci pour votre joie de vivre au

quotidien, merci de me faire grandir chaque jour un peu plus. C'est un vrai bonheur de vous voir grandir et de vous accompagner chaque jour, vous faites de moi une maman comblée et je vous en remercie. Dire que vous aviez neuf mois quand cette thèse a commencé, j'ai maintenant de beaux garçons de quatre ans, dont je suis si fière. Je vous aime. Puissiez-vous, un jour, lire ce travail et être fière de votre maman.

RESUME

La tularémie est une zoonose causée par la bactérie à Gram-négatif *Francisella tularensis*. Deux sous-espèces sont virulentes pour les humains : *F. tularensis* ssp. *tularensis*, présente uniquement en Amérique du Nord et *F. tularensis* ssp. *holarctica*, présente dans tout l'hémisphère Nord et en Australie. Des contaminations d'origine environnementale sont notamment possibles par des aérosols contenant la bactérie, à l'origine d'infections pulmonaires. Cette possibilité ainsi que la haute pathogénicité de cette bactérie pour les humains, la classe parmi les agents potentiels de bioterrorisme. Afin de maîtriser une dispersion accidentelle de *F. tularensis*, il est nécessaire de comprendre ses mécanismes de survie dans l'environnement. Le cycle de vie terrestre de *F. tularensis* ssp. *holarctica* est relativement bien caractérisé. A l'inverse, le cycle de vie aquatique de cette sous-espèce l'est encore peu. Des contaminations humaines sporadiques et des épidémies d'origine aquatique existent dans le contexte d'activités aquatiques, suite à l'ingestion d'eau contaminée ou à des piqûres de moustiques. Quelques études ont rapporté la persistance de *F. tularensis* pendant plusieurs semaines dans l'environnement, sans que les mécanismes de cette survie ne soient identifiés.

L'objectif de ce travail de thèse était de caractériser la persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans un environnement aquatique. Deux études de terrain réalisées en 2019 et en 2020 ont démontré la présence d'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans des étendues d'eau environnementales en France. Sur l'ensemble des deux campagnes, 9,2 % des 87 échantillons d'eau analysés contenaient de l'ADN de la bactérie responsable de la tularémie. Bien que la présence d'ADN ne soit pas une preuve de la persistance aquatique de la bactérie sous une forme infectieuse, ce travail questionne sur la survie à long terme de *F. tularensis* dans l'eau environnementale, et sur sa responsabilité dans certains cas de tularémie.

Des modèles *in vitro* de survie environnementale d'une souche virulente de *F. tularensis* ssp. *holarctica* ont permis de démontrer que cette bactérie était capable de passer dans un état de dormance appelé état viable mais non-cultivable (VBNC). Dans cet état, les bactéries n'étaient plus capables de pousser en milieu riche adapté, mais restaient vivantes. Cet état a permis aux bactéries de persister plus de 18 mois dans l'eau en échappant aux outils de détection classiques basés sur la culture bactérienne. La température de l'eau semble être un facteur essentiel pour la survie de *F. tularensis*, car l'état VBNC n'a été induit que dans de l'eau fraîche (4 et 18°C), alors que de l'eau plus chaude (37°C) était létale pour les bactéries en quelques jours. Bien que

l'état VBNC soit un moyen de résister aux stress environnementaux, les bactéries à l'état VBNC restaient sensibles à la température, ce qui pourrait expliquer la répartition géographique de la tularémie et la persistance bactérienne limitées aux pays de l'hémisphère Nord.

Une caractérisation protéomique de *F. tularensis* à l'état VBNC a été initiée pour finir ce travail de thèse. Un remodelage de l'enveloppe bactérienne et une régulation des facteurs de virulence semble s'opérer dans cet état de dormance. Une réduction des protéines synthétisant le peptidoglycane, les pili de type IV, le système de sécrétion de type VI et l'antigène-O a été observée.

Les résultats complémentaires de ces travaux ont permis de proposer une actualisation du cycle de vie aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Ce travail de thèse a démontré que *F. tularensis* ssp. *holarctica* est capable de survivre plusieurs mois dans un environnement aquatique à l'état VBNC, soulevant de nouvelles questions sur la résistance et la virulence de ces bactéries à l'état VBNC dans l'environnement, qui devront faire l'objet de futures investigations.

ABSTRACT

Tularemia is a zoonosis caused by the Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. Two subspecies are virulent to humans: *F. tularensis* ssp. *tularensis*, found only in North America, and *F. tularensis* ssp. *holarctica*, found throughout the Northern Hemisphere and in Australia. In particular, it is possible to be contaminated by aerosols containing the bacterium, which causes pulmonary infections. This possibility, as well as the high pathogenicity of this bacterium for humans, classifies it as a potential bioterrorism agent. In order to control an accidental spread of *F. tularensis*, it is necessary to understand its survival mechanisms in the environment. The terrestrial life cycle of *F. tularensis* ssp. *holarctica* is relatively well characterized. In contrast, the aquatic life cycle of this subspecies is still poorly characterized. Sporadic human infections and epidemics of aquatic origin occur after aquatic activities, ingestion of contaminated water or mosquito bites. A few studies have reported the persistence of *F. tularensis* for several weeks in the environment, without identifying the mechanisms of this survival.

The objective of this thesis work was to characterize the persistence of *F. tularensis* ssp. *holarctica* in an aquatic environment. Two field studies conducted in 2019 and 2020 demonstrated the presence of *F. tularensis* DNA in environmental bodies of water in France. Across both campaigns, 9.2% of the 87 water samples analyzed contained DNA from the tularemia-causing bacterium. Although the presence of DNA is not a proof of aquatic persistence of the bacterium in an infectious form, this work questions the survival of *F. tularensis* in environmental water, and its responsibility in some cases of tularemia.

In vitro models of environmental survival of a virulent strain of *F. tularensis* ssp. *holarctica* demonstrated that this bacterium was able to enter a dormant state called the viable but non-cultivable (VBNC) state. In this state, the bacteria were no longer able to grow in a suitable rich environment, but remained alive. This state allowed the bacteria to persist for more than 18 months in the water, evading conventional detection tools based on bacterial culture. Water temperature appears to be a critical factor for the survival of *F. tularensis*, as the VBNC state was only induced in cool water (4 and 18°C), whereas warmer water (37°C) was lethal to the bacteria within a few days. Although the VBNC state is a means of resisting environmental stresses, bacteria in the VBNC state remained temperature sensitive, which may explain the

geographic distribution of tularemia and bacterial persistence limited to Northern Hemisphere countries.

A proteomic characterization of *F. tularensis* in the VBNC state was initiated to finish this thesis work. Remodeling of the bacterial envelope and regulation of virulence factors seems to take place in this dormant state. A reduction of proteins synthesizing peptidoglycan, type IV pili, type VI secretion system and O-antigen was observed.

The complementary results of this work allowed us to propose an update of the aquatic life cycle of *F. tularensis* ssp. *holarctica*. This thesis work demonstrates that *F. tularensis* ssp. *holarctica* is capable of surviving several months in an aquatic environment in the VBNC state raising new questions about the resistance and virulence of these bacteria in the VBNC state in the environment that will need to be investigated in the future.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	I
Résumé	V
Abstract	VII
Table des matières	IX
Liste des tableaux et figures	XIII
Liste des abréviations	XIV
Avant-propos	2
Introduction générale	4
I. <i>Francisella tularensis</i>	6
I.1 Historique de la tularémie	7
I.1.1 Découverte de la maladie et de son agent étiologique	7
I.1.2 Agent potentiel de bioterrorisme pendant la guerre froide	8
I.2 Risques et réglementations actuels associés à <i>F. tularensis</i>	10
I.3 Taxonomie du genre <i>Francisella</i>	12
I.3.1 <i>Francisella tularensis</i>	12
I.3.2 <i>Francisella novicida</i>	13
I.3.3 <i>Francisella philomiragia</i>	14
I.3.4 Autres espèces de <i>Francisella</i>	15
I.3.5 Endosymbiotes <i>Francisella</i> -like	15
I.3.6 Espèces modèles	16
I.4 Mécanismes de virulence de <i>F. tularensis</i>	17
I.4.1 Cycle de vie intracellulaire	17

I.4.2	L'enveloppe bactérienne, un acteur majeur de la virulence	19
I.4.3	Ilot de pathogénicité de <i>Francisella</i> (FPI)	27
I.5	La tularémie	29
I.5.1	Symptômes et formes cliniques	29
I.5.2	Diagnostic	30
I.5.3	Prophylaxie et traitements	33
I.5.4	Epidémiologie	34
I.6	Les cycles de vie de <i>F. tularensis</i>	38
I.6.1	Les mammifères	39
I.6.2	Les tiques	39
I.6.3	Les moustiques	40
I.6.4	Autres hôtes et/ou vecteurs potentiels	40
I.7	Persistance dans l'environnement aquatique	41
I.7.1	Interaction potentielle avec les protozoaires	41
I.7.2	Formation potentielle de biofilm	42
I.7.3	Détection de <i>F. tularensis</i> en milieu aquatique	43
I.7.4	Modèles <i>in vitro</i> de survie environnementale aquatique de <i>F. tularensis</i> en condition axénique	44
II.	L'état bactérien viable mais non cultivable (VBNC)	48
II.1	Définition	48
II.1.1	Comment définir une bactérie vivante (viable) ?	48
II.1.2	Sémantique et controverse scientifique	49
II.1.3	Définition de l'état « viable mais non cultivable »	50
II.2	Détection	53
II.2.1	Techniques basées sur l'intégrité cellulaire	53
II.2.2	Techniques basées sur le métabolisme et la transcription	55
II.3	Mécanismes d'induction des VBNC	57
II.3.1	Induction par régulation transcriptionnelle de RpoS	58
II.3.2	Induction par certains systèmes toxine-antitoxine	59

II.3.3	Induction par le stress oxydant _____	59
II.3.4	Induction par des protéines senseurs sur la membrane externe _____	60
II.4	Caractéristiques protéomiques de l'état VBNC _____	61
II.4.1	Modification du peptidoglycane _____	61
II.4.2	Modification de certains systèmes à deux composants _____	62
II.4.3	Modification du métabolisme de l'énergie _____	62
II.4.4	Modification des activités transcriptionnelle et traductionnelle _____	63
II.5	Impact de l'état VBNC sur la virulence des bactéries _____	64
II.6	Impact de l'état VBNC sur la résistance aux antibiotiques des bactéries _____	65
II.7	Réactivation des bactéries à l'état VBNC _____	66
II.8	Impact potentiel de l'état VBNC des bactéries sur la santé publique _____	67
	Problématiques _____	68
	Résultats _____	72
I.	Etudes de terrain : Recherche d'ADN de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> dans l'environnement en France _____	74
I.1	Introduction _____	74
I.2	Publication _____	75
I.2.1	Manuscrit _____	75
I.2.2	Données supplémentaires _____	86
II.	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> persiste dans l'eau à l'état VBNC _____	88
II.1	Introduction _____	88
II.2	Publication _____	89
II.2.1	Manuscrit _____	89
II.2.2	Figures et légendes _____	109
II.2.3	Données supplémentaires _____	113

II.3	Résultats complémentaires	120
II.3.1	Infection de <i>G. mellonella</i> par <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	120
II.3.2	Coculture d'amibes et de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> à l'état VBNC	121
II.3.3	Coculture de macrophages et de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> à l'état VBNC	122
II.3.4	Réactivation de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> à l'état VBNC	122
III.	Le protéome de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> à l'état VBNC est différent de celui à l'état cultivable	124
III.1	Introduction	124
III.2	Publication	125
III.2.1	Manuscrit	125
III.2.2	Figures et légendes	147
III.2.3	Données supplémentaires	150
	Discussion et perspectives	152
	Références	162
	Annexe	178

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1 : Caractéristiques des bactéries du genre <i>Francisella</i>	14
Tableau 2 : Résumé des études de recherche environnementale aquatique de <i>Francisella</i>	44
Tableau 3 : Résumé des études de cultivabilité de <i>F. tularensis</i> dans l'eau	46
Tableau 4 : Liste non-exhaustive de bactéries connues pour entrer en état VBNC	52
Figure 1 : Colonies de <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> sur gélose PVX	6
Figure 2 : Répartition géographique des espèces de <i>Francisella</i>	15
Figure 3 : Cycle de vie intracellulaire de <i>F. tularensis</i>	18
Figure 4 : Schéma de l'enveloppe de <i>F. tularensis</i> et des facteurs de virulence.	20
Figure 5 : Schéma de l'antigène-O de la capsule et du LPS.	22
Figure 6 : Schéma du SST6 décontracté (gauche) et contracté (droite)	24
Figure 7 : Schéma du pilus de type IV de <i>Francisella</i>	26
Figure 8 : Organisation schématique du FPI.	27
Figure 9 : Schéma de la régulation transcriptionnelle du FPI	28
Figure 10 : Cas de tularémie déclarés en France entre 2003 et 2018	36
Figure 11 : Répartition géographique des cas de tularémie en France de 2015 à 2018	37
Figure 12 : Cycles terrestre et aquatique de <i>F. tularensis</i>	38
Figure 13 : Dynamique de dormance bactérienne	50
Figure 14 : Evaluation de la viabilité bactérienne par marqueurs fluorescents	54
Figure 15 : Principe de la PCR viabilité (vPCR)	55
Figure 16 : Mesure de la respiration cellulaire des bactéries vivantes	56
Figure 17 : Voies d'induction de l'état VBNC	58

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ARN : acide ribonucléique

CDC : centers for disease control and prevention (centre de contrôle et de prévention des maladies)

CNR : centre national de référence

EMA : ethidium monoazide

FPI : *Francisella* pathogenicity island (îlot de pathogénicité de *Francisella*)

IP : iodure de propidium

LPS : lipopolysaccharide

LVS : live vaccine strain (souche vivante vaccinale)

MOT : microorganismes et toxines hautement pathogènes

OMS : organisation mondiale de la santé

PCR : polymerase chain reaction

PMA : propidium monoazide

(p)ppGpp : guanosine (penta/tetra-) phosphate

PYG : peptone-yeast extract-glucose

qPCR : PCR quantitative

sp. : une espèce non identifiée d'un genre

ssp. : sous-espèce

SST6 : système de sécrétion de type 6

UFC : unité formant colonie

URSS : union des républiques socialistes soviétiques

ROS : espèces réactives de l'oxygène

VBNC : viable but non-culturable (viable mais non-cultivable)

vPCR : viability PCR (PCR viabilité)

Les unités du système international d'unité (SI) sont utilisées.

AVANT-PROPOS

Francisella tularensis est l'espèce bactérienne responsable de la zoonose appelée tularémie. Il existe plusieurs formes cliniques de cette maladie chez les humains, selon le point d'entrée de la bactérie dans l'organisme. La majorité des contaminations ont lieu par contact direct avec un animal infecté (mammifères et arthropodes), mais les contaminations d'origine environnementale, non reliées à des animaux infectés, sont en augmentation, notamment en France (1,2).

Le cycle de vie terrestre de *F. tularensis* est assez bien caractérisé et comprend les tiques et les petits mammifères, comme les rongeurs et les lagomorphes (1). Parmi eux, les lièvres sont connus depuis longtemps comme réservoirs de la bactérie. L'existence d'un deuxième cycle aquatique est suggérée depuis les travaux de Jellison dans les années 1950 (3), en particulier pour la sous-espèce *F. tularensis* ssp *holarctica*. Régulièrement, dans les pays Scandinaves, des épidémies de tularémie sont provoquées par les moustiques qui sont contaminés au stade larvaire dans des milieux aquatiques. Par ailleurs, des cas de tularémie humaine sont recensés lors des activités aquatiques ou suite à l'ingestion d'eau contaminée. Des formes pulmonaires ont été décrites après une exposition environnementale, sans facteurs de risque clairement identifiés. Le cycle aquatique implique les moustiques et les mammifères aquatiques, mais à ce jour il est encore peu caractérisé (1). Il ne permet pas d'expliquer la survie environnementale de la bactérie sur de longues périodes, ni d'expliquer certaines formes pulmonaires de source environnementale. Des données récentes suggèrent une possible survie de cette bactérie dans l'eau en l'absence d'hôte. C'est ce que nous avons cherché à caractériser dans ce travail de doctorat.

Les études conduites ont permis :

- d'identifier la présence d'ADN de *Francisella* et particulièrement *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans des environnements aquatiques de l'Ouest de la France ;
- de démontrer la survie *in vitro* de *F. tularensis* ssp. *holarctica* pendant plusieurs mois dans l'eau à basse température sans ajout de nutriments ;

- de démontrer que cette survie se fait dans un état de dormance appelé état viable mais non cultivable (VBNC) ;
- de démontrer que *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC est sensible à la température.
- d'initier la caractérisation protéique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC, qui permet de supposer une adaptation protéique des bactéries lors de la transition vers cet état.

Ce travail de doctorat a aidé à compléter le cycle aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et à confirmer la persistance de cette bactérie en milieu aquatique à l'état VBNC sur des périodes très longues et en dehors de tout hôte.

INTRODUCTION GENERALE

I. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis est une espèce bactérienne hautement pathogène pour les humains. Cette bactérie de culture fastidieuse est un petit coccobacille à Gram-négatif, non motile (4). La culture sur milieu solide de *F. tularensis* nécessite des géloses enrichies au sang cuit, en vitamines et en acides aminées dont la cystéine. La croissance bactérienne est lente, les colonies blanchâtres sont visibles à l'œil nu en 48-72 heures (Figure 1). Sa pathogénicité est élevée pour les humains, ce qui nécessite un recours à un traitement antibiotique en cas d'infection, et sa transmission est possible sous forme d'aérosols. Ainsi, le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) des Etats-Unis classe *F. tularensis* dans la catégorie A des agents infectieux. Quant à la France, elle classe cette bactérie comme micro-organisme et toxine hautement pathogène (MOT). Cela signifie que *F. tularensis* est considérée comme un agent potentiel de bioterrorisme. La législation française impose la manipulation de *F. tularensis* en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3.

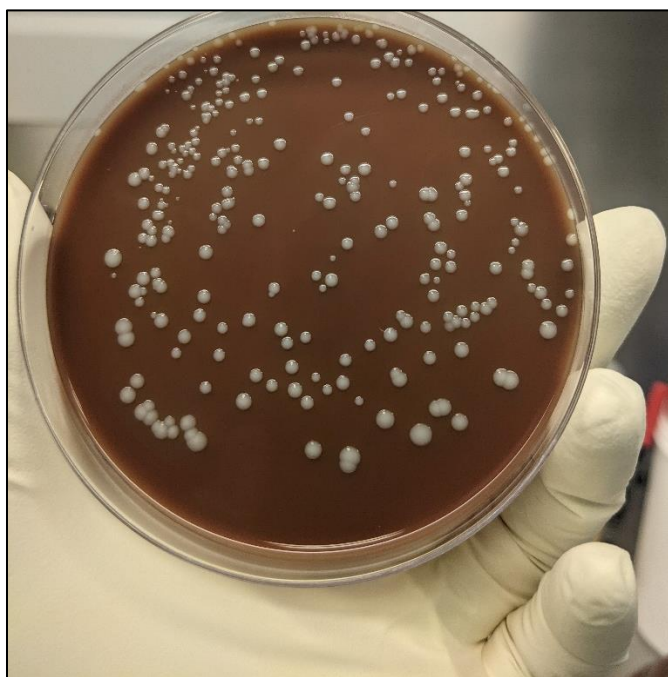


Figure 1 : Colonies de *F. tularensis* ssp. *holarctica* sur gélose PVX (CNR des *Francisella*, CHU Grenoble Alpes)

I.1 Historique de la tularémie

I.1.1 Découverte de la maladie et de son agent étiologique

Bien que la bactérie responsable de la tularémie fût isolée et caractérisée pour la première fois par les américains McCoy et Chapin en 1911, la tularémie était connue depuis le XVIIe siècle, comme une « peste des rongeurs » dans de nombreux pays. En Norvège, une maladie similaire a été décrite chez les lemmings en 1653. Au Japon, en 1820, plusieurs humains malades ont été détectés après la consommation de lapins. La maladie y était connue sous le nom de “ohara” puis “yato – byo” (4–7).

En 1909, après des cas ressemblant à la peste chez des rongeurs, et notamment chez les écureuils (*Citellus beecheyi*), Georges Mc Coy, directeur du laboratoire de recherche sur la peste aux Etats-Unis fut envoyé en Californie. Cette épizootie avait débuté après d’importants tremblements de terre à San Francisco en 1906, et donc une modification brutale de l’environnement. Mc Coy commença par recenser les écureuils infectés et leurs parasites. En 1911, avec Charles Chapin, ils réussirent à isoler et cultiver la bactérie sur un milieu de culture supplémenté en jaune d’œuf, permettant de décrire l’agent de cette peste. Enzootique chez les rongeurs dans le comté de Tulare, en Californie, ils ont initialement nommé la bactérie *Bacterium tularense*. Ils ont par la suite montré que ce pathogène pouvait être porté et transmis par de nombreux mammifères comme les écureuils, les cochons d’Inde, les rats et les souris (8–10). En 1914, la bactérie fut isolée pour la première fois, à partir de prélèvements humains provenant d’un cuisinier travaillant dans l’Ohio (USA) et d’une fermière, qui souffraient d’adénopathies et de fièvre. Wherry et Lamb isolèrent l’agent pathogène des malades puis l’inoculèrent à des petits mammifères. Ils observèrent la bactérie sous forme de bacille dans les tissus frais et sous forme coccoïde quelques heures après la mort du mammifère (11,12).

Dans la décennie 1920, Edward Francis, officier en santé publique dans l’Utah aux Etats-Unis, publia d’importants manuscrits sur ses nombreux travaux sur la tularémie (13,14). Il réussit à isoler la bactérie à partir de lapins, et de plusieurs malades atteints de la “fièvre de la mouche du cerf”. Il mit au point un milieu gélosé glucosé supplémenté en sang et en cystéine pour cultiver la bactérie. L’inoculation de l’agent pathogène à des petits mammifères lui permit de définir qu’il s’agissait du même germe que celui isolé précédemment par McCoy et Chapin. Comme elle était responsable d’une bactériémie, Francis a nommé cette peste la tularémie. Il a

également identifié les différentes formes cliniques de cette pathologie chez les humains. Il a démontré la possibilité d'une transmission des bactéries d'animal à humain par piqûres d'insectes hématophages, et a mis au point un test d'agglutination pour le diagnostic sérologique de la tularémie. Dans ses travaux, il a rapporté la présence de tularémie au Japon, en Europe et en Amérique du Nord. Francis était déjà conscient de la dangerosité de *F. tularensis* puisqu'il alertait sur des précautions à prendre quant à la manipulation de cette bactérie. Il faut noter que six cas de tularémie ont été recensés parmi le personnel de son laboratoire (5,13,15). L'agent étiologique de la tularémie a été classé tour à tour dans les genres *Pasteurella* puis *Brucella*, mais les expériences d'hybridation ADN/ADN ont montré que le genre *Francisella* était un genre à part entier (16). Ainsi, en 1947, en l'honneur d'Edward Francis et de son travail, les taxonomistes renommèrent le genre de cette bactérie *Francisella*, et par conséquent l'agent étiologique responsable de la tularémie a été renommé *Francisella tularensis* (5).

En 1959, deux biovars de *F. tularensis* furent identifiés par des chercheurs russes, *F. tularensis* biovar *tularensis* en Amérique et *F. tularensis* biovar *palaeartica* dans le reste de l'hémisphère Nord. Ils se distinguent par la composition en acides gras de leur membrane cellulaire (5,16). Quelques années plus tard, l'américain W. L. Jelison démontra la présence des deux biovars en Amérique du Nord. Il proposa ainsi une distinction entre les souches de « type A » présentes uniquement en Amérique du Nord et les souches de « type B » présentes dans tout l'hémisphère Nord (3,17,18). En 1970, ces biovars sont devenus respectivement les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*, et les Russes ont décrit une nouvelle sous-espèce présente en Asie centrale : *F. tularensis* ssp. *mediasiatica*. Dans les années 1970-80, les Russes apportèrent d'importantes contributions à la compréhension de *F. tularensis*, notamment en analysant les résistances naturelles aux antibiotiques de cette bactérie. Ils distinguèrent ainsi deux biovars pour la sous-espèce *holarctica* selon la sensibilité à l'érythromycine des souches. Le biovar I était sensible à l'érythromycine alors que le biovar II était résistant (19,20).

I.1.2 Agent potentiel de bioterrorisme pendant la guerre froide

Les premiers à entrevoir la possibilité d'utilisation de *F. tularensis* comme arme biologique potentielle furent les Japonais durant les années 1930, en étudiant la capacité de dispersion des bactéries. De nombreuses études sur *F. tularensis* furent ensuite réalisées par les

Etats-Unis et l'URSS durant la guerre froide. Ces deux nations considéraient les armes biologiques comme une priorité des programmes militaires (5). Leur intérêt pour *F. tularensis* était surtout dû à sa virulence élevée causant notamment des pneumonies aiguës et mortelles en l'absence de traitement antibiotique, à son infectiosité et à sa capacité à pouvoir être dispersée par aérosols. Des volontaires américains ont ainsi été exposés à différentes formes bactériennes pour tester leur pouvoir infectieux. Dans les années 1950, il a ainsi été démontré que l'inhalation de 10 à 50 bactéries de la sous-espèce *tularensis* induisait une pneumonie chez les humains. Quant aux Russes, ils ont produit des souches résistantes aux antibiotiques et une souche vaccinale (5). C'est à partir de souches de *F. tularensis* ssp. *holarctica* atténuées par des passages successifs en milieu riche, qu'ils ont développé un vaccin administré en masse à la population russe dès 1946. Cette souche vaccinale a été envoyée aux Américains en 1956, qui l'ont encore modifié par des passages dans la souris et des étapes de lyophilisation. Cette souche modifiée de *F. tularensis* ssp. *holarctica* appelée Live Vaccine Strain (LVS) a ensuite été injectée aux militaires américains (6,21,22).

Dans les années 1960, les deux nations avaient militarisé plusieurs agents pathogènes comme *F. tularensis*, ce qui signifie que des systèmes de production et de dissémination d'aérosols de *F. tularensis* sous forme d'arme biologique ont été mis au point (23). Cependant, en 1969, le président Américain Richard Nixon a jugé les armes biologiques trop imprévisibles, avec un risque important d'épidémies non contrôlées. Il annonça la fin du programme d'armement biologique américain, et ratifia en 1972 la convention interdisant le développement, la production et le stockage des armes biologiques (16,23). L'objectif de cette convention pour les Américains, était d'empêcher d'autres nations de produire ces armes qu'ils jugeaient trop risquées. Cependant la position des autres Etats était moins claire et l'URSS a continué de produire des bactéries militarisées jusque dans les années 1990 (5,16,23).

I.2 Risques et réglementations actuels associés à *F. tularensis*

F. tularensis était classée comme agent potentiel de bioterrorisme jusque dans les années 1990. A la fin de la guerre froide, elle a été retirée de cette liste, puis réintroduite dans des nouvelles classifications en 2001 (24). En effet, cette année là, le CDC, aux Etats-Unis, a identifié les micro-organismes susceptibles de servir comme arme biologique, suite aux attaques aux enveloppes piégées à l'anthrax. *F. tularensis* fait partie des six agents classés dans la catégorie A, car présentant le plus de risque pour les nations. Dans cette classe figurent également les bactéries *Bacillus anthracis*, agent de l'anthrax, *Yersinia pestis*, agent de la peste, *Clostridium botulinum* agent du botulisme qui produit la toxine botulique ; les virus *Variola major*, l'agent de la variole humaine ; les *Filovirus* agents des fièvres hémorragiques Ebola et Marburg et les *Arenavirus* agent de Lassa et Machupo provoquant eux aussi des fièvres hémorragiques (25). Il est à noter que parmi ces agents pathogènes, seul *Variola major* a été déclaré comme éradiqué de la surface de la Terre par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1980 grâce à la vaccination (26).

Concernant la tularémie, le risque d'épidémies de tularémie est à nuancer selon la sous-espèce de *F. tularensis* et le mode de dispersion des bactéries. Dans la classification française des agents biologiques selon l'importance du risque d'infection, la sous-espèce *tularensis* est classée de risque biologique 3, alors que la sous-espèce *holarctica* est classée 2, du fait de sa virulence moindre. Aussi, les formes de tularémie sont très différentes selon le mode d'inoculation des bactéries, et la forme pulmonaire due à l'inhalation de bactéries notamment sous la forme d'aérosols est particulièrement redoutée.

Depuis les années 1970, l'OMS établit des scénarios en cas de dispersion de *F. tularensis*. Ainsi, une dispersion de 50 kilogrammes de bactéries dans une zone urbaine de 5 millions d'habitants entrainerait 250 000 malades et 25 000 décès, avec une épidémie de plusieurs mois, malgré la diffusion d'une antibiothérapie (16,22). A titre de comparaison, si cette dispersion avait lieu dans l'agglomération grenobloise, 2 500 décès seraient déplorés. Il faut également noter qu'un événement de ce type causerait une désorganisation massive, une saturation des hôpitaux et un retard dans les prises en charge.

Aujourd'hui, sur les 197 Etats, 182 ont ratifié la convention de 1972 sur l'interdiction des armes biologiques (27). Ainsi, ces Etats ne devraient pas développer, stocker ou acquérir

des armes biologiques. Les garenties de la convention sont cependant limitées puisqu'elle se base uniquement sur la bonne foi des Etats, sans aucun contrôle.

En France, l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) réglemente la manipulation des MOT. Elle doit se faire dans les laboratoires autorisés, en milieu confiné et sécurisé, par du personnel au préalable autorisé. L'ANSM veille également à la traçabilité des échanges de MOT. La tularémie fait partie des maladies humaines à déclaration obligatoire depuis 2002, ce qui permet sa surveillance. Ces déclarations sont adressées au centre national de référence (CNR) des *Francisella* qui est actuellement situé au sein du laboratoire de bactériologie du CHU Grenoble Alpes.

I.3 Taxonomie du genre *Francisella*

La famille des *Francisellaceae* appartient à l'ordre des *Thiotrichales* et à la classe des Gamma-protéobactéries. Elle comprend les genres *Cysteiniphilum*, *Pseudofrancisella*, *Allofrancisella* et *Francisella*. La famille la plus proche phylogénétiquement est la famille des *Piscirickettsiaceae* dont toutes les espèces sont aérobies et retrouvées en milieu aquatique. Cette famille contient aussi une espèce pathogène pour les poissons salmonidés : *Piscirickettsia salmonis* (5). Les *Francisella* sont donc assez éloignées phylogénétiquement des autres espèces pathogènes pour les humains, les espèces pathogènes les plus proches étant *Coxiella burnetti* et *Legionella pneumophila*. Le Tableau 1 résume les caractéristiques des espèces de *Francisella* les mieux documentées à ce jour et leur répartition géographique est présentée Figure 2.

I.3.1 *Francisella tularensis*

Il s'agit de la principale espèce de *Francisella* pathogène pour les humains. Le génome de *F. tularensis* fait 1,9 Mb, et est contenu dans un seul chromosome circulaire, stable. Il est très conservé et riche en AT. Actuellement, il en existe trois sous-espèces dont seules deux sont responsables de la tularémie. Elles sont différenciées selon leur virulence et leurs caractéristiques biochimiques. Bien que les *Francisella* aient un génome extrêmement conservé, les souches de *F. tularensis* sont divisées en clades et sous-clades selon la présence de SNP canoniques (canSNP) (28,29).

I.3.1.1 *Francisella tularensis* ssp. *tularensis*

Aussi appelée souche de Type A, cette sous-espèce est retrouvée uniquement en Amérique du Nord. Elle est responsable de 70% des cas de tularémie du continent américain. C'est la sous-espèce la plus virulente de *F. tularensis*, que ce soit chez les animaux ou les humains. Elle est capable d'infecter un grand nombre d'animaux et d'arthropodes. Chez le lapin, l'injection sous-cutanée de 10 bactéries est fatale (30). Pour les humains, l'injection de 10 bactéries peut causer une infection et l'inhalation de 25 bactéries sous forme d'aérosols peut causer une pneumonie (5,31).

Cette sous-espèce contient plusieurs clades. Les souches de clade A.1a entraînent une létalité de 4% chez les humains ; celles de clade A.1b sont plus virulente avec une létalité de 24% chez les humains. Les souches de clade A.2 ne sont pas mortelles pour les humains (29,32).

I.3.1.2 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*

Aussi appelée souche de Type B, cette sous-espèce est retrouvée dans tout l'hémisphère Nord. Cette dernière décennie, quelques rares cas ont été décrits en Australie (33). Elle est également retrouvée chez de nombreux mammifères dont des rongeurs semi-aquatiques. L'écologie de cette sous-espèce semble plus associée aux milieux aquatiques (5). Elle est moins virulente que la sous-espèce *tularensis*, puisque l'injection sous-cutanée de 10⁶ UFC à un lapin ne lui est pas fatale (30). Pour les humains, une forme pulmonaire modérée de tularémie peut être provoquée par l'inhalation de 12 000 UFC (31,34). Les souches de cette sous-espèce induisent une létalité de 7% chez les humains (32).

Cette sous-espèce contient 3 biovars différents de virulence similaire (32). Le biovar I est sensible à l'érythromycine, il est retrouvé en Europe de l'Ouest. Le biovar II est résistant à l'érythromycine, il est retrouvé en Russie ainsi qu'en Europe Centrale et de l'Est. Le biovar *japonica* est également sensible à l'érythromycine et il est capable de fermenter le glycérol. Il est majoritairement retrouvé au Japon et en Asie (35,36).

I.3.1.3 *Francisella tularensis* ssp. *mediasiatica*

Cette sous-espèce est retrouvée uniquement en Russie et en Asie Centrale. Elle a été détectée chez des tiques et petits mammifères (5). Chez le lapin sa virulence semble similaire à celle de la sous-espèce *holarctica* (37). A ce jour aucune contamination humaine n'a été recensée.

I.3.2 *Francisella novicida*

F. novicida est l'espèce environnementale génétiquement la plus proche de *F. tularensis*. Elle a longtemps été considérée comme une sous-espèce de *F. tularensis* car sa composition en acide gras membranaires est similaire à cette espèce, tout comme la séquence

de l'ADN ribosomal 16S qui est très conservée (5,38). Sa classification comme espèce à part entière a longtemps été controversée dans la littérature, cependant la faible pathogénicité pour les humains de *F. novicida* et des différences génétiques la définissent comme une espèce différente de *F. tularensis* (39,40).

Isolée en 1950 à partir d'eau dans l'Utah aux Etats-Unis, cette espèce est retrouvée dans les réservoirs aquatiques. Elle induit une forme classiquement bénigne pour les humains mais a été à l'origine de quelques infections opportunistes chez des patients immunodéprimés ou présentant des comorbidités. Les rares contaminations à *F. novicida* sont liées à de l'eau environnementale, comme en témoignent trois cas suite à la contamination d'une machine à glace dans une prison américaine en 2011, et des cas liés à des quasi noyades (38,41).

I.3.3 *Francisella philomiragia*

Originellement identifiée comme *Yersinia philomiragia*, cette espèce environnementale est restée de genre incertain jusqu'en 1989, où elle a été classée parmi les *Francisella* du fait de son ADN ribosomal 16S et de sa composition en acide gras membranaires typique des *Francisella* (5). Contrairement à *F. tularensis*, *F. philomiragia* peut croître rapidement et sans ajout de cystéine, sa croissance est aussi plus rapide. Cette bactérie est à l'origine de cas d'infections opportunistes après des semi-noyades. Son réservoir est aquatique et il faut probablement en ingérer une grande quantité pour développer la maladie (2,42).

Espèce	Sous-espèce	Réservoir décrit	Localisation géographique	Virulence humaine
<i>F. tularensis</i>	<i>tularensis</i>	animal	Amérique du Nord	très élevée
	<i>holarctica</i>	animal et environnemental	Hémisphère Nord et Australie	élevée
	<i>mediasiatica</i>		Asie centrale	non recensée
<i>F. novicida</i>		aquatique	Hémisphère Nord et Australie	très faible
<i>F. philomiragia</i>		aquatique	Hémisphère Nord	très faible

Tableau 1 : Caractéristiques des bactéries du genre *Francisella*

I.3.4 Autres espèces de *Francisella*

Cette dernière décennie, de nombreuses autres espèces environnementales de *Francisella* ont été décrites. *F. noatunensis* et *F. haliotcida* sont infectieuses pour les animaux marins et ont été identifiées chez des morues, des mollusques et des cabillauds (43–45). *F. hispaniensis*, *F. opportunist* et *F. salinarina* ont été détectées chez des patients immunodéprimés lors de bactériémie (46,47). Récemment *F. salina*, *F. oliginis* et *F. frigituris* ont été détectées dans des échantillons environnementaux (47,48).

Il est à noter que toutes ces espèces nouvellement identifiées sont d'origine aquatique. Les *Francisella* seraient donc un genre majoritairement aquatique.

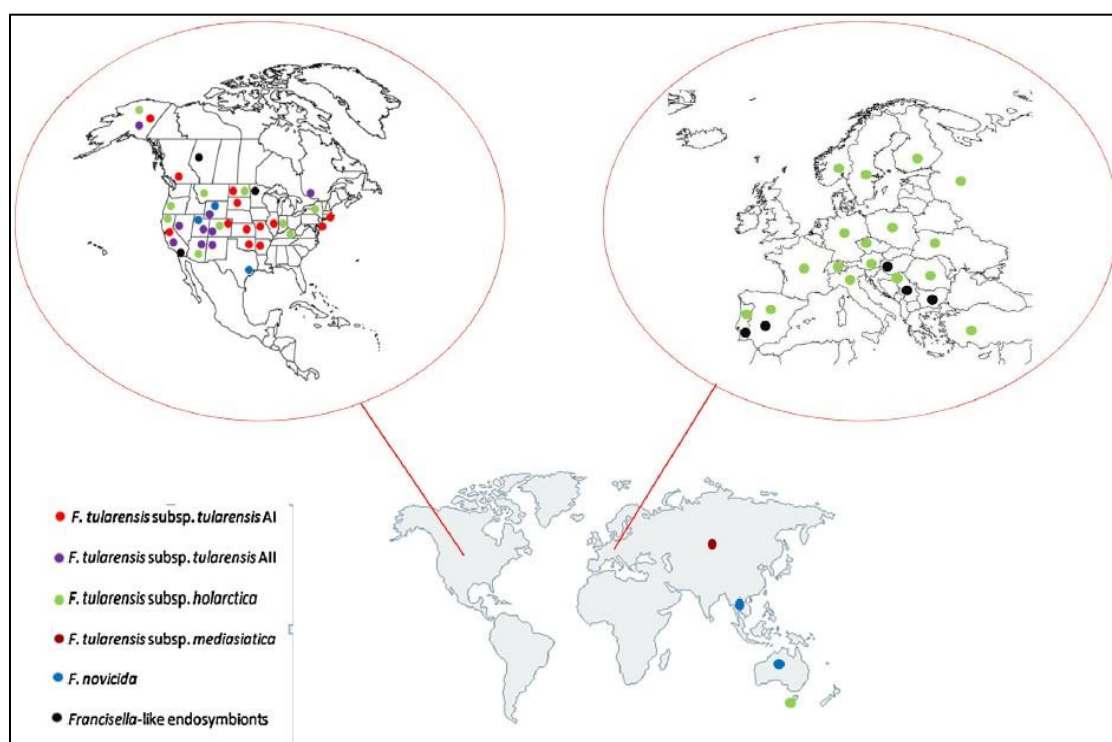


Figure 2 : Répartition géographique des espèces de *Francisella*. D'après Carvalho et al., 2014 (49)

I.3.5 Endosymbiotes *Francisella*-like

Les endosymbiotes *Francisella*-like sont des bactéries endosymbiotes d'arthropodes qui ont des séquences d'ADN ribosomal 16S proches de celles des *Francisella* (5). Elles sont non pathogènes pour les humains.

I.3.6 Espèces modèles

Les manipulations de *F. tularensis* Type A et Type B sont strictement réglementées, à cause de leur classification comme agents pathogènes de classe 2 et 3 et de la réglementation MOT. Au laboratoire, les expériences sont assez lourdes, car elles doivent se faire en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Ainsi, dans la littérature, de nombreuses études sont réalisées sur des espèces modèles.

Du fait de sa proximité génétique avec *F. tularensis*, *F. novicida* est l'espèce la plus utilisée comme modèle expérimental (38). Cependant, elle est beaucoup moins virulente pour les humains que *F. tularensis*.

La souche génétiquement modifiée de *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS est aussi largement utilisée. Cependant, sa sélection a été faite aléatoirement et une partie du génome est manquante, cela peut avoir une incidence sur plusieurs paramètres comme la virulence. En effet, la souche *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS possède une délétion au niveau des gènes impliqués dans la production du pilus de type IV qui est connu comme un facteur de virulence de *F. tularensis* (détaillé dans le §I.4.2.7) (50).

I.4 Mécanismes de virulence de *F. tularensis*

Plusieurs des protéines impliquées dans les mécanismes de virulence de *F. tularensis* sont regroupées dans l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI). Certains facteurs de virulence intracellulaire de *F. tularensis* interviennent dans des mécanismes permettant à la bactérie de prévenir l'acidification du phagosome et de s'en échapper. La virulence des souches est également liée aux éléments de l'enveloppe bactérienne : la capsule, le lipopolysaccharide (LPS) spécifique de *Francisella*, le pilus de type IV et les systèmes de sécrétion.

I.4.1 Cycle de vie intracellulaire

F. tularensis est une bactérie intracellulaire facultative capable de se multiplier dans de nombreux types cellulaires. Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules dans lesquelles la multiplication bactérienne a lieu. Comme ce sont des cellules motiles, elles participent à la dissémination de la bactérie dans l'organisme (51,52). Le cycle intracellulaire des souches virulentes de *F. tularensis* est assez bien caractérisé. Il est résumé dans la Figure 3 et comprend les étapes suivantes (53) :

- endocytose de la bactérie ;
- échappement du phagosome ;
- multiplication bactérienne dans le cytosol ;
- lyse cellulaire.

Même si ce phénomène est maintenant bien caractérisé, tous les mécanismes moléculaires précis ne sont pas encore compris.

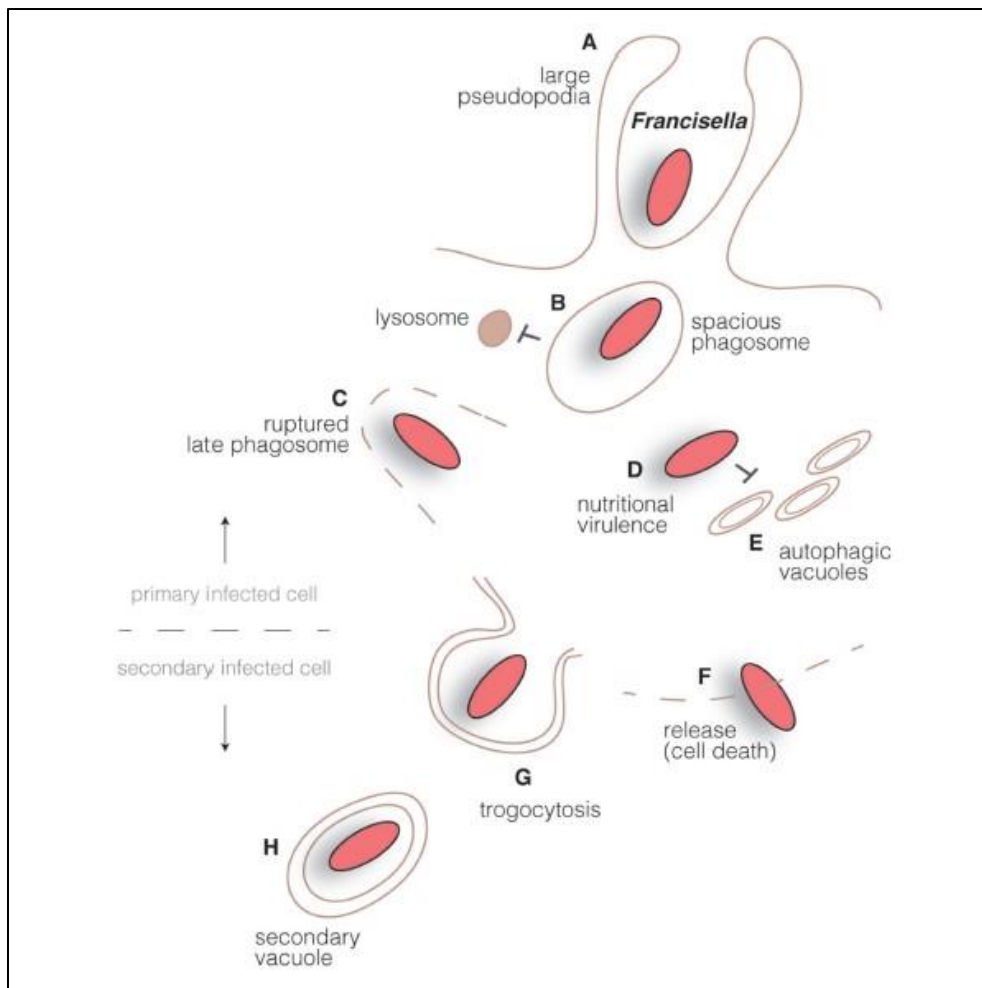


Figure 3 : Cycle de vie intracellulaire de *F. tularensis*.

La bactérie se lie aux récepteurs membranaires du macrophage et est internalisée par de grands pseudopodes (A). *F. tularensis* survit à l'intérieur du phagosome (B), puis s'en échappe (C). Une fois dans le cytoplasme cellulaire, la bactérie se multiplie (D). Pour infecter d'autres cellules, *F. tularensis* peut lyser la cellule infectée (F) ou passer directement dans la seconde cellule par trophocytose (G). D'après Pizarro-Cerda et al., 2016 (53).

I.4.1.1 Endocytose de la bactérie

Plusieurs structures bactériennes permettent l'attachement aux récepteurs cellulaires, comme les pili de type IV, la protéine FsaP et le facteur d'élongation Tu (54). Une fois la bactérie liée aux récepteurs membranaires de la cellule, de grands pseudopodes asymétriques permettent d'internaliser la bactérie dans une vacuole d'endocytose. Cette dernière se rétrécit pour former un phagosome (53).

I.4.1.2 Echappement du phagosome

Une fois dans le phagosome, *F. tularensis* bloque la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en inhibant la formation de la NADPH oxydase cellulaire. La superoxyde dismutase, la catalase et l'acide phosphatase bactérienne permettent également de lutter contre les stress du phagosome (53). La membrane du phagosome est dégradée par l'action d'effecteurs libérés dans le cytoplasme de la cellule par le système de sécrétion de type VI (55), ce qui permet de libérer la bactérie dans le cytosol. La sortie du phagosome est relativement rapide, puisque 6 heures après l'infection 50% des bactéries s'en sont échappées (51,53,56).

I.4.1.3 Multiplication bactérienne dans le cytosol

Dans le cytosol, *F. tularensis* survit et prolifère. Des régulateurs transcriptionnels dépendants de la concentration en (p)ppGpp intra-bactérien permettent d'activer les gènes de résistance aux stress intracellulaires. Des transporteurs d'acides aminés et des protéines impliquées dans la biosynthèse de base azoté permettent de détourner les éléments cellulaires (51,53,57).

I.4.1.4 Lyse cellulaire

Une fois qu'elle s'est multipliée, *F. tularensis* entraîne la lyse de la cellule hôte par apoptose ou pyroptose. Elle peut aussi passer d'une cellule à l'autre par trogocytose (53,58,59).

I.4.2 L'enveloppe bactérienne, un acteur majeur de la virulence

L'enveloppe bactérienne de *F. tularensis* est l'ensemble des structures qui séparent le cytoplasme bactérien du milieu extracellulaire. Plusieurs de ses composants sont des facteurs de virulence (Figure 4). Elle comprend :

- La capsule : composée d'antigène-O, c'est le premier élément bactérien en contact avec le milieu extérieur ;
- Le lipopolysaccharide (LPS) qui tapisse la membrane externe ;
- La membrane externe ;

- Le périplasma : espace entre la membrane externe et la membrane interne qui comporte le peptidoglycane ;
- La membrane interne ;
- Les systèmes de sécrétions et les pili : structures protéiques complexes dont la base est attachée à la membrane interne et dont l'extrémité se situe dans le milieu extérieur. Leur rôle est d'excréter des molécules et de participer à l'adhérence bactérienne.

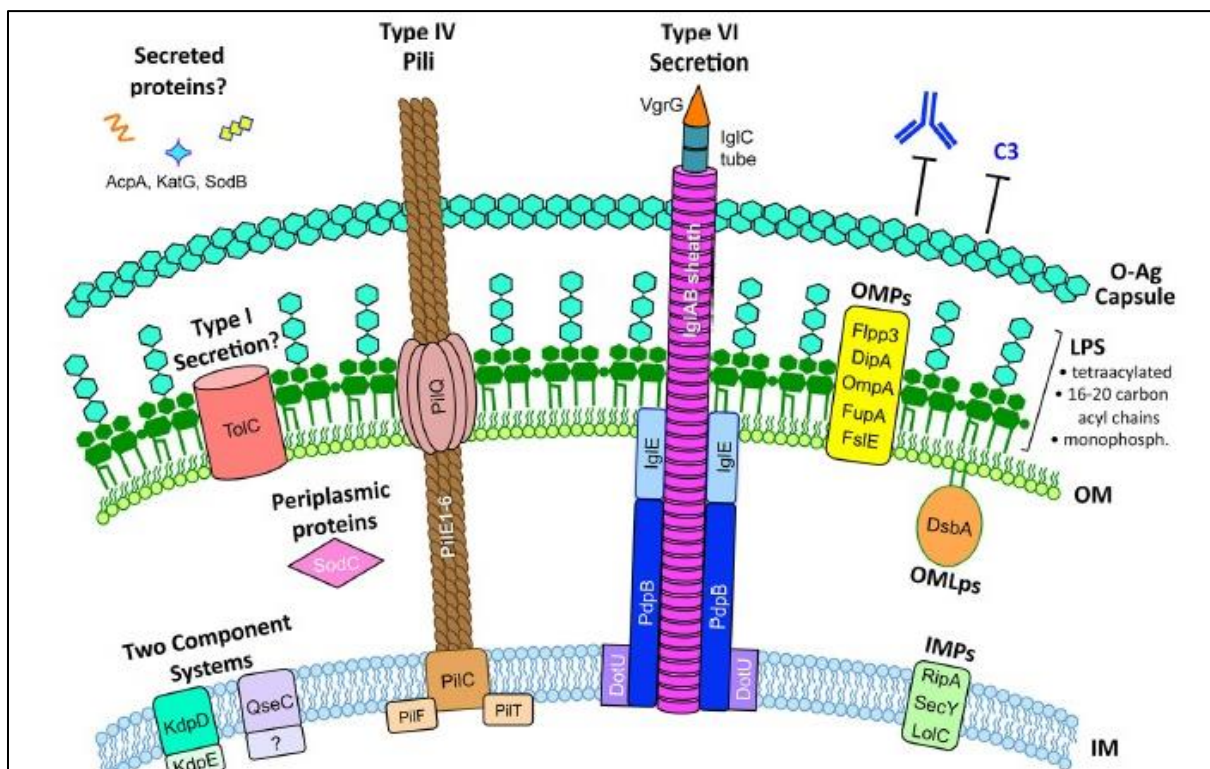


Figure 4 : Schéma de l'enveloppe de *F. tularensis* et des facteurs de virulence qu'elle contient. D'après Rowe et Huntley, 2015 (60).

I.4.2.1 Capsule

La paroi de *F. tularensis* est composée à 70% de lipides, elle est entourée d'une capsule polysaccharidique de 100 à 250 kDa. Ce polysaccharide est composé d'une unité identique répétée de 792 Da, l'antigène-O, décrit dans le §I.4.2.3. Cette capsule joue un rôle essentiel dans la virulence bactérienne, puisque sa déplétion induit une baisse de la multiplication intracellulaire (61). Classiquement, la capsule bloque également la liaison au système du

complément, mais son rôle dans la résistance au anticorps spécifique de *F. tularensis* dans le serum est encore mal définie (60).

I.4.2.2 Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un constituant majeur de la membrane plasmique externe des bactéries à Gram-négatif. Il tapisse la membrane et est constitué de trois parties : l'antigène O, le core oligosaccharide et le lipide A. Ce dernier permet l'ancrage dans la membrane. C'est ce lipide qui est reconnu et active le système immunitaire inné (62). De ce fait, pour échapper à une reconnaissance immunitaire, de nombreuses bactéries ont un lipide A modifié. Celui de *F. tularensis*, est constitué de quatre chaînes d'acides gras acétylés de 16 à 18 carbones alors que de nombreuses bactéries à Gram-négatif ont un lipide A constitué de 6 chaînes d'acides gras acétylés de 12 à 14 carbones et d'un groupement phosphate. Grâce à cette structure particulière du lipide A, l'activation de la voie des récepteurs TLR-4 est inhibée et la réponse inflammatoire est initiée par les TLR-2 qui reconnaissent les lipoprotéines (63).

I.4.2.3 L'antigène-O

L'antigène-O un composant de la capsule et du LPS de *F. tularensis*. La présence de cette molécule dans la capsule de *F. tularensis* a été observée phénotypiquement pendant longtemps sans être identifiée pour autant. En effet, lorsque des bactéries virulentes croissent sur gélose au sang supplémentée en vitamine B12, acides aminées et facteurs de croissances, elles forment de petites colonies lisses blanchâtres-bleutées. Après plusieurs passages successifs, les colonies deviennent plus grosses, rugueuses et grisâtres. Les bactéries composant ces colonies sont également moins virulentes. Pendant longtemps, la perte de virulence et le changement phénotypique des colonies grises étaient imputés à un changement de composition du LPS. Il s'agit en réalité d'une perte de l'expression de l'antigène-O (64).

L'antigène-O est très conservé chez l'espèce *F. tularensis*. Il a la même composition dans la capsule et le LPS, c'est-à-dire la répétition d'un saccharide de 792 Da. Cependant, l'antigène-O du LPS est plus immunogène que celui de la capsule, car ils ont des épitopes différents. Des techniques basées sur l'utilisation d'anticorps permettent donc de les distinguer. Similairement à l'antigène-O du LPS qui est lié au lipide A au niveau du core oligosaccharide, celui de la capsule semble avoir une liaison covalente avec un lipide A-like (Figure 5). Ainsi,

du fait de leur proximité structurale, le LPS et la capsule partagent des voies de synthèse de leurs composants (60,64). La déplétion des gènes codant les protéines Wbt entraîne une perte d'expression de l'antigène-O des 2 structures, c'est d'ailleurs l'interruption des gènes *wbtI*, *wbtA1*, *wbtM*, et *wbtC*, qui est responsable de la perte d'antigène-O chez la souche LVS. Les gènes *wzx* et *wzy* sont responsables de la polymérisation de l'antigène-O et les gènes *waa* et *manB* sont responsables de l'attachement du saccharide au lipide A. Quant à la synthèse de ce dernier, elle est médiée par les gènes *lpx*.

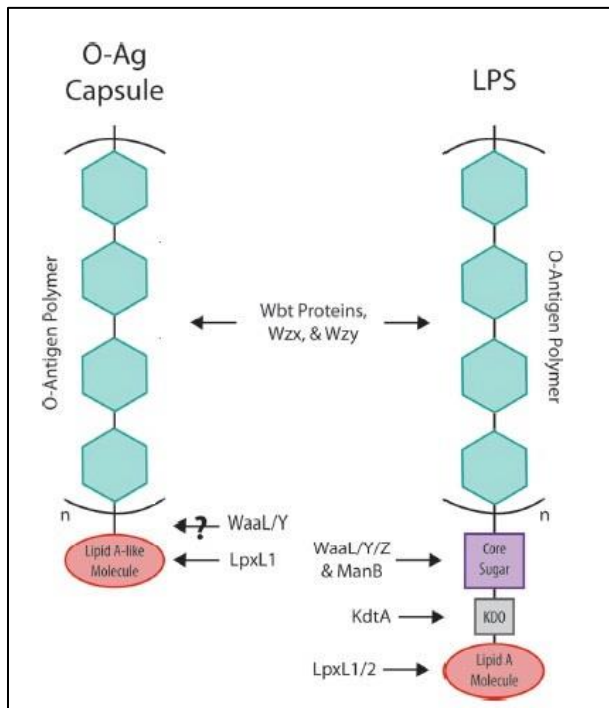


Figure 5 : Schéma de l'antigène-O de la capsule et du LPS. Modifié d'après Catanzaro et Inzana, 2020. (64).

I.4.2.4 Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est une structure élastique qui entoure la membrane plasmique. Cette structure est cependant suffisamment rigide pour être responsable de la forme bactérienne. Elle permet aussi de maintenir l'intégrité structurale de l'enveloppe cellulaire lors de la division bactérienne. Les bactéries à Gram-négatif possèdent un peptidoglycane fin, situé dans le périplasme et attaché à la membrane externe. C'est un polymère composé de brins de glycanes linéaires réticulés par de petits peptides. Les brins de glycanes sont constitués d'une alternance de GlcNAc et MurNAc dépendant de l'espèce bactérienne. En effet, la structure du peptidoglycane présente des divergences entre les espèces bactériennes mais est très conservée

au sein des espèces. Ces modifications peuvent affecter, entre autres, la fitness, la virulence, la résistance aux stress environnementaux et à l'hôte (65).

La synthèse du peptidoglycane se fait en de nombreuses étapes médiées par plusieurs enzymes. Elle commence dans le cytoplasme, à partir de fructose-6-phosphate. Les transférases permettent de synthétiser le glycane. La polymérisation du peptidoglycane se fait ensuite par transglycosylation et transpeptidation. Ce précurseur synthétisé dans le cytoplasme est ensuite inséré dans le peptidoglycane périplasmique existant grâce à des hydrolase (66).

I.4.2.5 Le système de sécrétion de type VI (SST6)

Le SST6 est un système de sécrétion très commun puisque les gènes le codant sont retrouvés dans le génome d'un quart des bactéries à Gram-négatif séquencées. Il est très répandu chez les espèces les plus pathogènes. Chez *Francisella*, cette machinerie permet d'injecter des molécules effectrices à l'extérieur de la bactérie car elle traverse les membranes interne et externe. Elle est nécessaire à l'échappement du phagosome, la réplication intra-macrophagique et plus généralement à la virulence des *Francisella in vivo*.

Le SST6 se compose d'une gaine contractile qui est décontractée dans l'organisme bactérien, lorsque le SST6 n'est pas exprimé à la surface bactérienne. A l'inverse, la gaine est contractée à l'intérieur de la bactérie lorsque les protéines formant la pointe du SST6 sont exprimées. La gaine traverse alors l'enveloppe bactérienne grâce à une plaque de base qui ancre sa base à la membrane interne, et grâce à un complexe membranaire qui permet le passage de l'enveloppe bactérienne sans compromettre son intégrité (Figure 6) (55).

Les protéines IglA et IglB sont impliquées dans la contraction du SST6, et par conséquent dans les étapes d'échappement du phagosome et de multiplication intra-cellulaire. Ces protéines forment un hétérodimère qui s'empile de manière hélicoïdale. Cette structure permet le déploiement de la gaine du SST6. La protéine IglC se situe à l'intérieur de la gaine contractile du SST6. Elle est impliquée dans la croissance intra-cellulaire et la réponse au stress oxydant. La plaque de base permet d'ancrer la gaine au complexe membranaire. Elle est composée de protéine IglD qui est liée l'hétérodimère IglA/IglB. Le complexe membranaire, composé des protéines IglE, DotU et PdpB, forme un canal qui traverse l'enveloppe bactérienne. IglE est une lipoprotéine de la membrane externe qui permet le passage de la gaine du SST6 sans abimer la paroi. Ce complexe pourrait être ancré dans l'espace périplasmique

grâce à des liaisons au peptidoglycane. Les protéines VgrG et PdpA forment la pointe du SST6, elles sont exprimées quand la gaine est contractée et qu'elle traverse l'enveloppe cellulaire. Elles permettent également la croissance intracellulaire. Les protéines PdpA, PdpE, IglC, IglE, IglF, IglI, IglJ et VgrG sont sécrétées et retrouvées dans le cytoplasme des macrophages infectés (55).

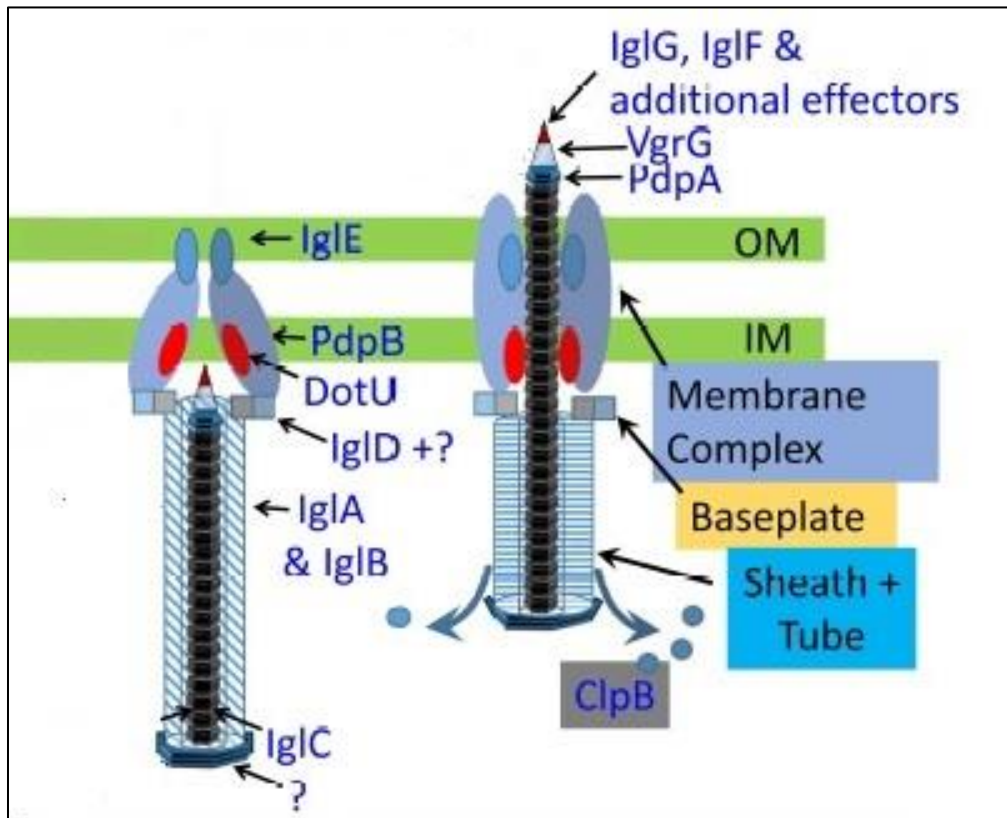


Figure 6 : Schéma du SST6 décontracté (gauche) et contracté (droite). Le SST6 est exprimé à la surface cellulaire lorsqu'il est contracté. Modifié d'après Clemens et al., 2018 (55).

I.4.2.6 Autres systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion sont des machineries permettant de sécréter des protéines repliées ou non. La majorité d'entre eux est impliquée dans les interactions bactéries-cellules eucaryotes car ils permettent le passage de protéines bactériennes vers le milieu intracellulaire.

Un système de sécrétion de type I existe chez *F. tularensis*. Il s'agit d'une pompe à efflux qui permet la sécrétion de composés à l'extérieur de la bactérie. Lorsqu'une de ces

protéines est déplétée (TolC, FtlC ou SilC), la virulence bactérienne diminue et la sensibilité aux antibiotiques augmente (60).

Un système de sécrétion de type II est décrit chez l'espèce environnementale *F. novicida* et est synthétisé par des protéines également codées dans le génome de *F. tularensis*. Ces protéines permettent aussi la synthèse du pilus de type IV (67).

Des systèmes de sécrétion de type III et IV sont décrits chez les espèces environnementales *F. novicida* et *F. philomiragia*, mais pas chez *F. tularensis*. Le génome des souches virulentes ne contient pas les gènes codant ces systèmes de sécrétion. Ils ne sont donc pas impliqués dans la virulence humaine de *F. tularensis* (60).

I.4.2.7 Pilus de type IV

Les pili sont des appendices présents à la surface de certaines espèces bactériennes. Ils sont composés, entre autres, d'oligomères de pilines. Comme ils sont exposés au milieu extracellulaire, ce sont des structures antigéniques. Le pilus de type IV est un facteur de virulence commun chez les bactéries à Gram-négatif, car il joue un rôle dans l'adhérence, l'agrégation, la motilité par contraction et l'échange d'ADN. Il est composé d'oligomères de pilines PilA et PilE1-6, clivées par la peptidase PilD et de deux protéines transmembranaires : PilC pour la membrane interne et PilQ pour la membrane externe. La protéine PilB (aussi appelée PilF) permet l'extension du pilus alors que la protéine PilT permet sa rétraction (Figure 7) (68). Les gènes codant ces protéines sont considérés comme des gènes de virulence, puisque leur déplétion induit une diminution de la virulence. D'autres protéines, comme PilO, sont identifiées comme participant à la synthèse du pilus de type IV, mais leurs fonctions ne sont pas clairement établies. PilO par exemple, permettrait de glycolyser la piline PilE1, mais l'effet de cette glycolisation reste indéterminé (60,69).

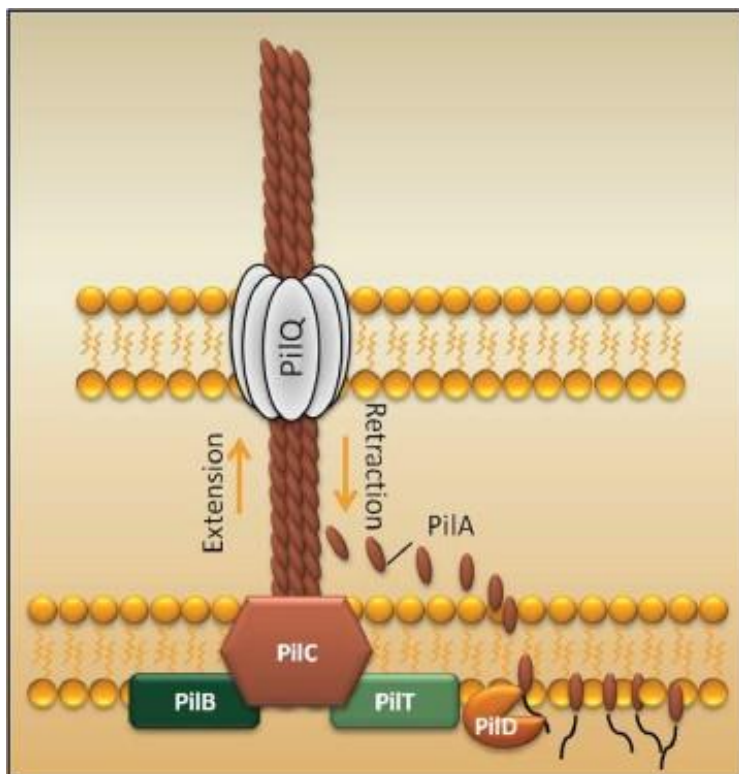


Figure 7 : Schéma du pilus de type IV de *Francisella*.

Le pilus de type IV est composé des protéines intramembranaires PilQ et PilC, des pilines PilA et PilE1-6 clivées par PilD, ainsi que des ATPase PilB (PilF) et PilT. D'après Näslund Salomonsson et al., 2011 (68).

Le pilus de type IV est ainsi considéré comme un facteur de virulence majeur chez les espèces du genre *Francisella*. Il est exprimé chez *F. tularensis* et *F. novicida* et des données génomiques montrent que les gènes sont présents chez toutes les *Francisella*. Chez *F. novicida*, plusieurs protéines du pilus de type IV sont communes avec les protéines du système de sécrétion de type II. Bien que *F. tularensis* ne semble pas posséder de système de sécrétion de type II, les gènes *pilB* (*pilF*), *pilC* et *pilD* ont des homologies avec les gènes impliqués dans ce système de sécrétion. Ces homologies sont probablement héritées d'une structure ancestrale commune et il est possible que *F. tularensis* ait perdu le système de sécrétion de type II au cours de l'évolution (67,68).

I.4.3 Ilot de pathogénicité de *Francisella* (FPI)

Le FPI est une région de 34 kb qui est dupliquée dans les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*. Ce doublement des gènes de virulence par rapport aux espèces environnementales *F. novicida* et *F. philomiragia* pourrait expliquer une partie la pathogénicité de *F. tularensis* (70).

Le FPI contient 18 gènes répartis en deux opérons orientés en sens inverse l'un par rapport à l'autre. Un opéron contient les gènes *iglA*, *iglB*, *iglC*, *iglD*, *pdpD*, *anmK*, le second opéron contient les gènes *pdpA*, *pdpB*, *pdpC*, *pdpE*, *iglE*, *iglF*, *iglG*, *iglH*, *iglI*, *iglJ*, *vgrG*, *dotU*. Parmi ces 18 gènes, 16 sont essentiels pour la virulence chez la souris et 14 pour la croissance intra-macrophagique (Figure 8) (55). Ces gènes sont sur-exprimés dans un environnement cellulaire par rapport à un milieu acellulaire. Ce qui suggère que l'environnement bactérien module la production de ces protéines de virulence (71–73). Ils codent le SST6 et des protéines permettant l'échappement du phagosome puisque cette action est rendue impossible lorsque le FPI est délété (74). Les rôles de ces protéines codant le SST6 sont détaillés dans le paragraphe I.4.2.5. Les protéines PdpC et PdpD ne sont pas requises pour l'assemblage du SST6. Ces protéines sont nécessaires dans la virulence *in vivo*, mais pas pour l'infection de modèles cellulaires (55).

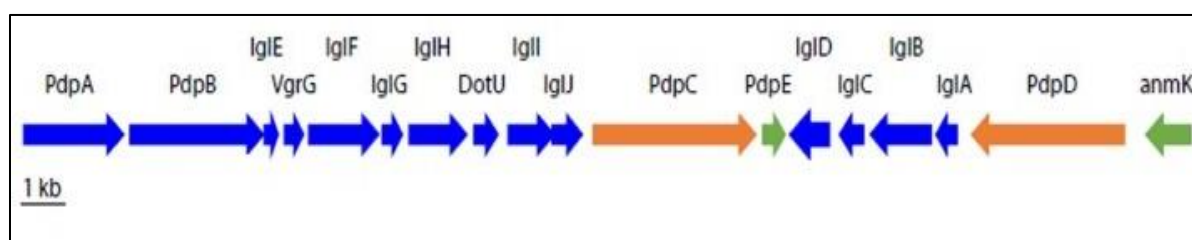


Figure 8 : Organisation schématique du FPI.

Les gènes représentés par des flèches bleues sont essentiels pour la croissance intra-macrophagique. Les gènes représentés par des flèches bleues et oranges sont essentiels pour la virulence chez les souris. Les gènes représentés par des flèches vertes ne semblent pas nécessaires pour la virulence ou la croissance intra-macrophagique. Modifié d'après Clemens et al., 2018 (55).

Le FPI est induit par les protéines SspA (stringent starvation protein A), MglA (macrophage growth locus protein A) et PigR (pathogenicity island gene regulator) (aussi appelé FevR) (72). Ces protéines forment un complexe qui régule la transcription du FPI. La

formation de ce complexe est induite par le nucléotide guanosine (penta/tetra-) phosphate ((p)ppGpp). Ce nucléotide est un signal de stress très conservé chez les bactéries, il est induit par des enzymes de réponse aux stress (comme RelA et SpoT). Le complexe hétérodimérique entre MglA et SspA se lie au facteur sigma 70 de l'ARN polymérase. Lorsqu'il est formé, le complexe MglA/SspA est recruté par la protéine PigR liée à la région promotrice du FPI, ce qui permet d'activer la transcription des gènes du FPI (Figure 9) (73,75). La transcription du FPI semble également dépendre du taux de fer dans le milieu (70).

Il est à noter que l'espèce environnementale *F. novicida* possède une copie du FPI et une copie d'un îlot génomique différent appelé *F. novicida* Island (FNI) qui code pour un SST6 différent, qui n'est pas impliqué dans la réplication intra-macrophagique (76).

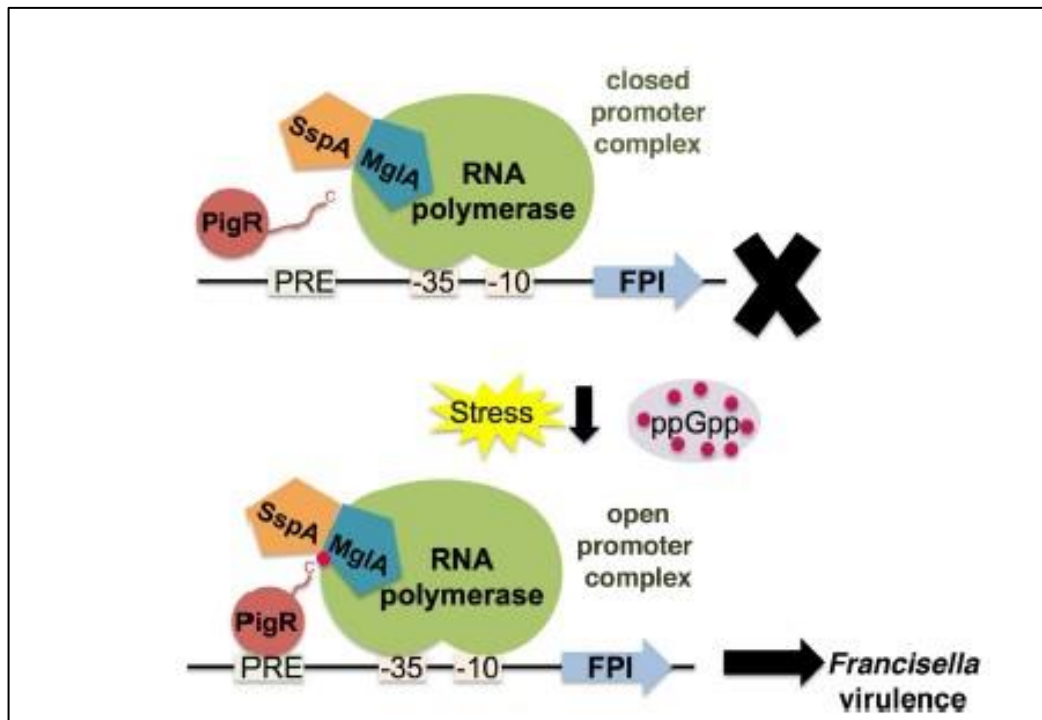


Figure 9 : Schéma de la régulation transcriptionnelle du FPI, d'après Cuthbert et al., 2017 (71).

I.5 La tularémie

I.5.1 Symptômes et formes cliniques

La période d'incubation de la maladie est généralement de moins d'une semaine. Les symptômes généraux sont un état pseudo-grippal alors que d'autres symptômes dépendent de la forme clinique de tularémie. Ces symptômes généraux peuvent parfois être confondus avec ceux d'autres pathologies et retarder le diagnostic (16).

Six formes cliniques principales de tularémie sont identifiées dépendant du mode de contamination et du point d'entrée de la bactérie :

- La forme ulcéro-ganglionnaire survient après que la bactérie ait pénétré dans l'organisme au niveau d'une lésion cutanée qui peut évoluer en ulcère. Elle a lieu suite à un contact direct avec un animal ou suite à une pique d'arthopode. La lésion peut nécroser et des adénopathies se forment au niveau des zones de drainage lymphatique de la plaie. Les ulcérations sont principalement localisées au niveau des membres inférieurs et supérieurs.
- La forme ganglionnaire est identifiée en cas d'adénopathie sans ulcération retrouvée à l'examen clinique du patient.
- La forme oculo-ganglionnaire survient après pénétration de la bactérie au niveau de la conjonctive oculaire suite à une contamination manuportée ou une projection de liquide contaminé. Elle provoque une conjonctivite et des adénopathies régionales.
- La forme oropharyngée survient après ingestion de la bactérie présente dans de l'eau ou de la viande contaminée et mal cuite. Elle cause une angine associée à des adénopathies régionales, principalement cervicales.
- La forme pulmonaire survient après inhalation de la bactérie sous la forme d'aérosols. C'est la forme la plus grave pouvant induire jusqu'à 30% de létalité avec les souches de Type A en l'absence de traitement. Elle cause une toux sèche, une pleuropneumonie avec des adénopathies associées principalement médiastinales ou hilaires ou une pneumonie grave. Les formes aiguës causées par *F. tularensis* Type A sont rapidement mortelles, alors que *F. tularensis* Type B induit des formes chroniques avec adénopathies médiastinales.

- La forme typhoïdique est associée à une bactériémie qui peut évoluer vers un choc septique sans porte d'entrée identifiée. Bien que cette forme soit plus rare, c'est également une des formes les plus graves de la maladie (1).

I.5.2 Diagnostic

Une tularémie est suspectée lorsque des symptômes cliniques évocateurs sont retrouvés avec une source d'exposition identifiée mais sans documentation microbiologique. Pour confirmer une tularémie, des tests sérologiques, une culture ou la recherche de la bactérie par biologie moléculaires sur un échantillon clinique peuvent être réalisés. L'obtention et l'identification de la bactérie par culture est la preuve la plus formelle d'une tularémie, cependant la culture de *F. tularensis* est fastidieuse et seules 10 à 20% des souches sont isolées depuis un prélèvement (77). C'est donc principalement par PCR (Polymerase Chain Reaction) que l'ADN bactérien de *F. tularensis* est recherché dans une biopsie tissulaire.

Santé Publique France distingue les cas confirmés des cas probables de tularémie. Un cas est confirmé lorsque le tableau clinique est évocateur d'une tularémie, avec au moins un des trois critères biologiques suivant :

- La souche bactérienne est isolée depuis le prélèvement clinique ;
- Une séroconversion est observée entre deux sérums prélevés à 2 semaines d'intervalle ;
- Un test PCR spécifique sur le prélèvement biologique avec un résultat positif.

Lorsque le tableau clinique est évocateur avec un seul sérum positif à *F. tularensis*, le cas de tularémie est considéré comme probable.

I.5.2.1 Sérologie

La sérologie est l'outil de diagnostic principal pour la tularémie. Les anticorps sont détectables environ 10 jours après le début des symptômes. Le titre en anticorps est maximal après environ six semaines après le début de l'infection, puis il décroît mais des taux résiduels peuvent persister plusieurs mois (78). Les techniques utilisées sont la micro-agglutination, l'immunofluorescence, le test ELISA et le Western-Blotting (49). Pour pouvoir les comparer, les résultats des sérologies successives d'un même patient, ils doivent être analysés dans le

même laboratoire, car il n'y a pas de standardisation entre les techniques. Ainsi les seuils, différents selon la technique sérologique utilisée, ne sont pas les mêmes d'un laboratoire à l'autre. Les kits ELISA commerciaux ont une sensibilité supérieure à 95%, mais il est recommandé de confirmer les résultats sérologiques positifs obtenus avec ces kits, car la spécificité des techniques d'immunofluorescence est meilleure. Des réactions croisées peuvent avoir lieu avec des anticorps de *Brucella* et *Yersinia*, conduisant à des résultats faussement-positifs des tests sérologiques (79).

I.5.2.2 Tests PCR

Pour diagnostiquer la tularémie à partir de prélèvements humains plusieurs tests PCR ont été mis au point. La forte homologie observée entre les génomes des différentes espèces de *Francisella*, demande d'être vigilant quant au choix des amorces, afin qu'elles soient spécifiques de l'espèce de *Francisella* recherchée (80,81). A ce jour, les principales régions ciblées par test PCR sont :

- La séquence d'insertion *ISFTtu2*, présente en multicopie dans le génome des *Francisella*. Elle est utilisée presque systématiquement pour le criblage du genre *Francisella*. Le test PCR qui l'utilise est très sensible (il détecte moins de 20 UFC / mL) car il amplifie une région répétée du génome (26 à 30 copies dans le génome de la sous espèce *holarctica* ; 12 à 17 copies dans le génome de la sous-espèce *tularensis* ; 6 à 18 copies dans le génome de l'espèce *F. novicida* ; 1 à 2 copies dans le génome de l'espèce *F. philomiragia*). Ce test PCR n'est pas spécifique de *F. tularensis* puisqu'il détecte toutes les espèces de *Francisella* et les endosymbiotes *Francisella*-like (82,83).
- Le gène *23kDa* code une protéine exprimée dans la réponse aux macrophages. Ce gène est présent dans les génomes de *F. tularensis*, *F. novicida* et quelques souches de *F. philomiragia*. Ce test PCR ne distingue donc pas ces trois espèces (82).
- Le gène *fopA* est une protéine membranaire. Il est présent en une copie dans le génome des espèces *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*. Cependant la spécificité du test PCR est variable selon l'espèce (82).
- Le gène *tul4* (aussi appelé *LpnA*) code une protéine membranaire de 17kDa. Ce gène est présent dans les génomes de *F. tularensis* et *F. novicida*. Ce test PCR a une très bonne sensibilité avec une limite de detection de 1 UFC. Comme ce gène n'est pas présent

chez les espèces *F. philomiragia* et d'endosymbionte *Francisella*-like, ce test PCR ne détecte pas ces espèces (82).

Il est recommandé de combiner plusieurs de ces tests PCR pour accroître la sensibilité et la spécificité du diagnostic par PCR. Cependant, aucune de ces PCR ne distingue spécifiquement l'espèce virulente *F. tularensis* (la PCR la plus spécifique détecte également *F. novicida*). Pour cela, au CNR de la tularémie, une PCR spécifique de la sous-espèce *holarctica* est réalisée lorsqu'une des PCR de criblage est positive. Elle cible une jonction particulière entre une copie de la séquence d'insertion *ISFtu2* et une région 3' accolée. Cette région non-codante est présente uniquement dans le génome de la sous-espèce *holarctica* (ou Type B) (84).

D'autres outils moléculaires permettent aussi la distinction entre les deux sous-espèces de *F. tularensis* :

- Une PCR spécifique de la sous-espèce *tularensis* ciblant le gène *pdpD* (84).
- L'amplification et le séquençage de la région FtM19 qui présente une délétion de 30 nucléotides dans le génome de la sous-espèce *holarctica* par rapport à la sous-espèce *tularensis* et à *F. novicida* (85).
- La combinaison de plusieurs PCR en temps réel ciblant des régions du génome comportant 11 SNP. Ces derniers permettent d'identifier la sous-espèce et le clade de la souche analysée (86).

Ces techniques de biologie moléculaire peuvent aussi être appliquées à des prélèvements animaux ou environnementaux, afin de rechercher la bactérie *F. tularensis*.

I.5.2.3 Culture

La culture de *F. tularensis* doit se faire en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Elle peut être réalisée sur des prélèvements au niveau de lésions (cutanées, muqueuses ou conjonctivales), sur des biopsies et des prélèvements sanguins. L'efficacité de la culture dépend de la conservation du prélèvement et du délai avant la mise en culture. Si cette dernière ne peut pas se faire rapidement, il est conseillé de congeler le prélèvement (87).

Comme *F. tularensis* est une bactérie de culture fastidieuse, les milieux utilisés doivent être riches et enrichis en cystéine à cause de l'auxotrophie de la bactérie pour cet acide aminé. En cas de bactériémie, *F. tularensis* peut croître en flacons d'hémocultures aérobie. Les milieux

solides utilisés sont des géloses au sang (cuit ou non) enrichies en cystéine et Polyvitex®. Ces géloses doivent être incubées à 37°C et une atmosphère enrichie en CO₂ (5%) est recommandée. Les colonies sont généralement visibles en 48h, mais leur apparition peut prendre plusieurs jours à partir d'un prélèvement clinique. Les colonies sont blanche-grisâtre, brillantes avec un halo transparent. L'identification de la souche bactérienne se faisait classiquement grâce à ses caractéristiques biochimiques. Les laboratoires équipés utilisent maintenant principalement la spectrométrie de masse MALDI-TOF qui rend un résultat fiable et rapide mais qui ne permet pas d'identifier la sous-espèce.

I.5.3 Prophylaxie et traitements

A ce jour il n'y a plus de vaccin disponible contre la tularémie, le vaccin avec la souche LVS n'ayant pas un bon ratio bénéfice/risque. La protection des personnes à risque est donc essentielle, elles doivent être informées du risque de tularémie. Des protections contre les piqures de tiques, de moustiques, et lors de la manipulation de petits mammifères dans les zones endémiques et enzootiques, permettent de limiter les infections.

En cas d'exposition à *F. tularensis*, une surveillance générale ainsi que des sérologies initiales et à 14 jours post-expositions sont recommandées. Si l'exposition est avérée (contact cutané ou fièvre), un traitement antibiotique doit être mis en place.

La tularémie est une maladie qui se soigne obligatoirement par traitement antibiotique. Selon l'OMS, trois grandes classes d'antibiotiques sont disponibles pour traiter la tularémie : les aminoglycosides (streptomycine et gentamicine), les fluoroquinolones (ciprofloxacine), et les tétracyclines (doxycycline) (88). Le traitement a généralement une durée de 2 à 3 semaines et peut être associé à une chirurgie en cas d'adénopathie volumineuse suppurée ou fistulisant la peau, ou en cas d'échec thérapeutique si la bactérie a formé un biofilm.

Un cas sévère de tularémie se traite avec de la gentamicine (adultes et enfants : 5mg/kg/j) pendant au moins 10 jours, ou de la streptomycine (adultes : 2g/j, enfants : 15mg/kg/j) pendant 10 jours. Une forme modérée de tularémie se traite à l'aide de ciprofloxacine (adultes : 800-1000mg/j, enfants : 15mg/kg/j) pendant au moins 10 jours, ou de doxycycline (adultes : 200 mg/j) pendant au moins 15 jours.

F. tularensis est naturellement résistante aux bêtalactamines car elle produit une bêta lactamase de classe A. A ce jour, aucune résistance antibiotique acquise aux trois classes utilisées pour le traitement de la tularémie n'a été décrite, cependant des souches résistantes aux fluoroquinolones, aux macrolides et aux aminosides ont été générées *in vitro* (89–91).

I.5.4 Epidémiologie

La surveillance nationale des cas de tularémie, dans la plupart des pays européens et aux Etats-Unis, permet d'avoir des données épidémiologiques fiables dans ces régions. Cette maladie est, en général, cantonnée à quelques cas sporadiques, car il n'y a pas de transmission interhumaine. Certains pays sont endémiques ou enzootique pour la tularémie et sont associés à des cas plus fréquents, notamment suite à des piqûres de moustique (92). Des épidémies sont également possibles suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (93).

I.5.4.1 La tularémie dans le monde

Classiquement, la tularémie est décrite dans l'hémisphère Nord. Les deux sous-espèces de *F. tularensis* sont présentes en Amérique du Nord où la majorité des cas sont dus à la sous-espèce *tularensis* (94). En Europe et en Asie, seule la sous-espèce *holarctica* est présente et responsable des cas de tularémie détectés. La sous-espèce *tularensis* serait absente du vieux continent. Cependant, dans les années 1980, la sous-espèce *tularensis* a été isolée de façon exceptionnelle à partir d'arthropodes en Slovaquie et en Autriche. En 2007, une étude phylogénétique a montré que ces souches étaient génétiquement très proches de la souche de Type A de laboratoire Schu4 largement étudiée en URSS. Les auteurs ont conclu à une fuite de laboratoire de cette souche en Europe Centrale (95).

Aux Etats-Unis, entre 2001 et 2010, un total de 1208 cas ont été rapportés, soit un taux d'incidence moyen de 0,041 cas pour 100 000 habitants. Les états les plus touchés sont au centre du pays, avec une incidence moyenne de 0,84 cas pour 100 000 habitants en Dakota du Sud (96). En Europe, en 2019, 1463 cas ont été rapportés, soit un taux d'incidence de 0,3 cas pour 100 000 habitants. Les pays scandinaves ont la plus forte incidence, avec un taux d'incidence de 8 pour 100 000 habitants en Suède et de 3,4 pour 100 000 habitants en Norvège (97). La prévalence est élevée dans plusieurs pays comme la Turquie, la Suède et la Finlande, où des

épidémies de grandes ampleurs peuvent se déclarer (1). En Europe et aux Etats-Unis, la grande majorité des cas survient en période estivale, qui est plus favorable aux activités extérieures et propice aux contacts avec des arthropodes (96,97).

Historiquement, la tularémie est absente de l'Hémisphère Sud. Cependant, en 2011, une infection à *F. tularensis* ssp. *holarctica* a été décrite en Tasmanie, dans le Sud de l'Australie, après une morsure par un opossum à queue en anneau (*Pseudocheirus peregrinus*) (33). Par la suite, la bactérie a été identifiée chez plusieurs de ces marsupiaux (98).

Il est difficile de conclure sur l'incidence de la tularémie dans les pays en voie de développement, du fait de l'absence de travaux de recherche. Sur le continent Africain, quelques travaux laissent à penser que *F. tularensis* pourrait être présente, et que la tularémie passerait totalement inaperçue. Il faut noter que les symptômes de tularémie peuvent se confondre avec ceux d'autres maladies bactériennes et que la recherche du germe infectieux n'est pas toujours réalisée. Aussi, à l'exception des bêta-lactamines, inefficaces contre *F. tularensis*, certains des antibiotiques distribués en cas de suspicion d'infection bactérienne sont actifs contre *F. tularensis*. La tularémie peut donc être traitée, sans qu'un diagnostic n'ait été réalisé. Au Soudan, en 2012, une bactériémie à *F. tularensis* a été décrite, mais la souche n'a pas été formellement identifiée. Un coccobacille à Gram-négatif a été détecté mais l'identification reposait sur un diagnostic d'exclusion, la souche n'appartenait pas au groupe HACEK qui contient des bacilles à Gram-négatif faiblement virulents (99). Enfin, au Kenya, une étude sérologique sur 730 patients fébriles en 2014 et 2015, a identifié 27 sérums possédant des anticorps contre *F. tularensis*. Cependant, les sérologies ont été réalisées avec la technique ELISA qui peut donner des faux-positifs et aucune souche n'a été isolée (100).

I.5.4.2 La tularémie en France

La tularémie est une maladie à déclaration obligatoire en France chez les humains, ce qui permet à Santé Publique France d'en faire un rapport épidémiologique annuel. La tularémie est une maladie relativement rare ; ainsi entre 2014 et 2017, 290 cas ont été recensés, avec environ 2/3 d'hommes. L'âge médian des patients est d'une cinquantaine d'années. Les formes ulcéro-ganglionnaire et ganglionnaire sont les plus fréquentes, correspondant à plus de 60% des cas annuels. Les formes pulmonaire et typhoïdique sont plus graves, mais moins nombreuses ; elles correspondent à moins de 25% des cas annuels. Les sources d'exposition les plus fréquentes sont le contact animal (lièvres chassés), les tiques et les activités en plein-air (101–

104). La tularémie peut être reconnue comme maladie professionnelle pour les professions de plein-air, les éleveurs, les vétérinaires, ou encore les professions liées aux traitements de la viande et le personnel de laboratoire (105). Il est intéressant de noter, que fréquemment la source d'exposition n'est pas clairement identifiée : une morsure de tique, la respiration d'aérosols ou encore une griffure végétale peuvent passer inaperçus.

L'année où ce travail de thèse a commencé, en 2018, 133 cas de tularémie ont été recensés en France, ce qui représentait une augmentation d'environ 30% par rapport à l'incidence habituellement observée (moins de 100 cas par an) (Figure 10), et deux patients sont décédés. Cette année a été qualifiée d'épidémique par Santé Publique France, avec une majorité de cas détectée entre janvier et juin 2018. Une forte prédominance des cas a été observée dans l'Ouest de la France, avec 55% des cas survenus dans les régions Bretagne et Pays de la Loire (Figure 11) (106). Les formes pulmonaires ont été deux fois plus fréquentes que l'année précédente (21% des cas) (106,107). Cette forme clinique est principalement due à l'inhalation de la bactérie sous forme d'aérosols. Elle est de plus en plus fréquemment associée à une contamination à partir de réservoirs environnementaux non identifiés, en dehors des cas liés à la respiration de poussières contaminées par des déjections de rongeurs infectés (manipulation de foin contaminé, tonte de pelouse, nettoyage de grange ou de greniers).

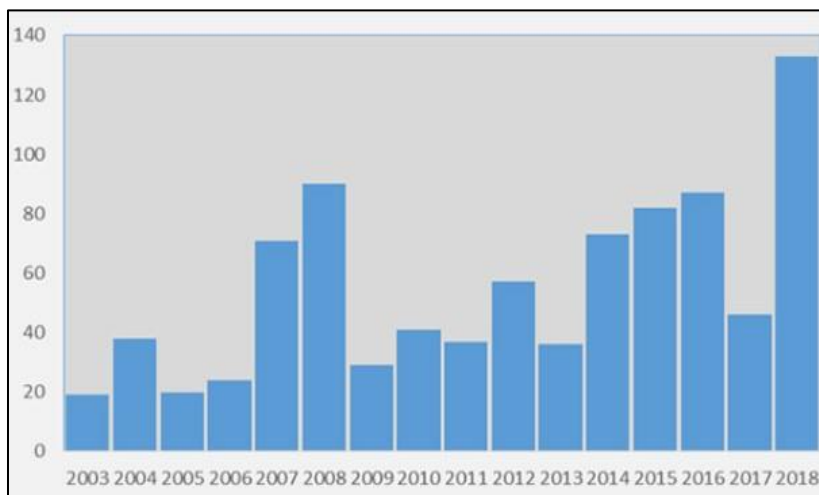


Figure 10 : Cas de tularémie déclarés en France entre 2003 et 2018. D'après Santé Publique France (104).

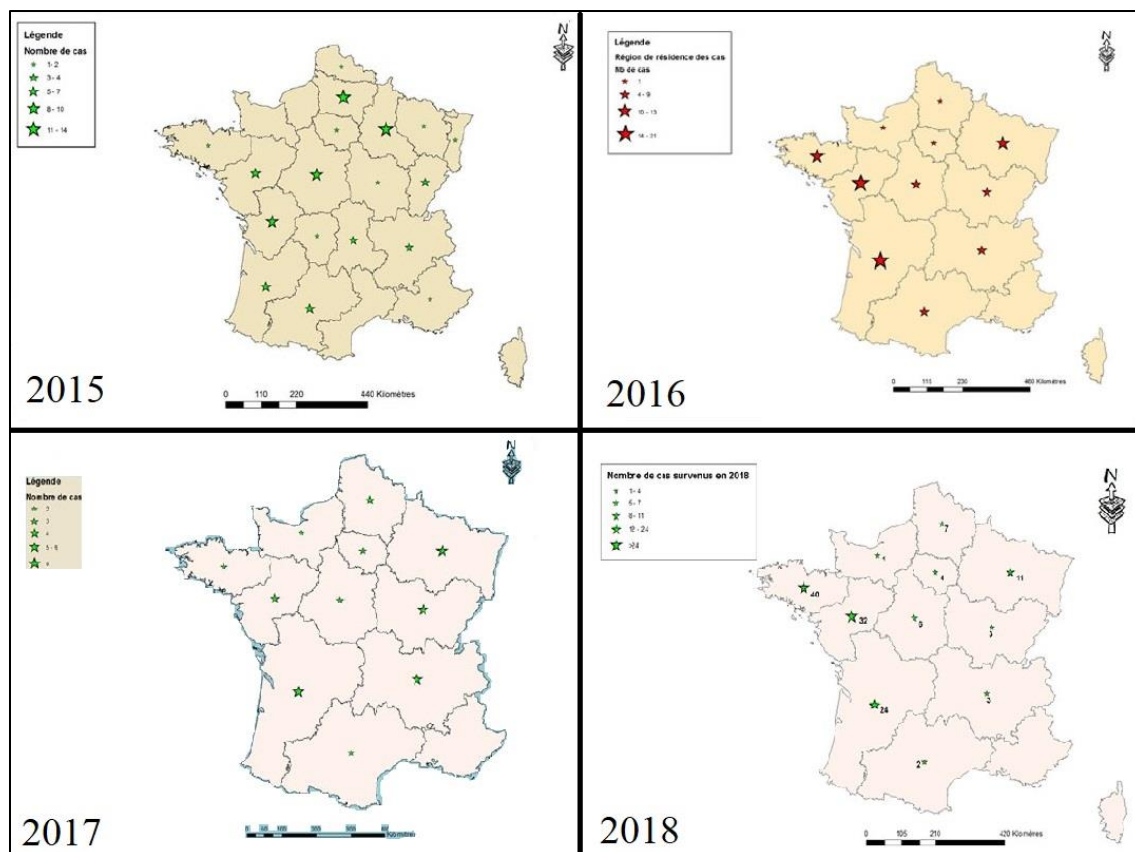


Figure 11 : Répartition géographique des cas de tularémie en France de 2015 à 2018. D'après santepubliquefrance.fr (102–104,107)

I.6 Les cycles de vie de *F. tularensis*

F. tularensis possède deux cycles de vie illustrés en Figure 12 : un cycle terrestre avec le réservoir animal et un cycle aquatique avec un réservoir aquatique. Ces deux cycles coexistent et s'alimentent l'un et l'autre. Le cycle terrestre comprend les mammifères et les tiques, les mammifères peuvent être infectés et propagateurs de *F. tularensis*. La transmission aux humains se fait par le contact avec un de ces vecteurs. A ce jour, les lièvres sont définis comme le réservoir animal de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, ils participent au maintien et à la dissémination de *F. tularensis* dans l'environnement. De nombreuses autres espèces animales sont des hôtes de cet agent pathogène, cependant leur rôle potentiel en tant que réservoir n'est pas avéré. *F. tularensis* est capable d'infecter plus de 250 espèces animales, cependant, la sensibilité à la bactérie et leurs disséminations dans l'environnement par ces espèces animales ne sont pas encore définies. Il est probable que *F. tularensis* ait un réservoir multi-systémique, alimenté par l'environnement hydro-tellurique, les arthropodes et les mammifères.

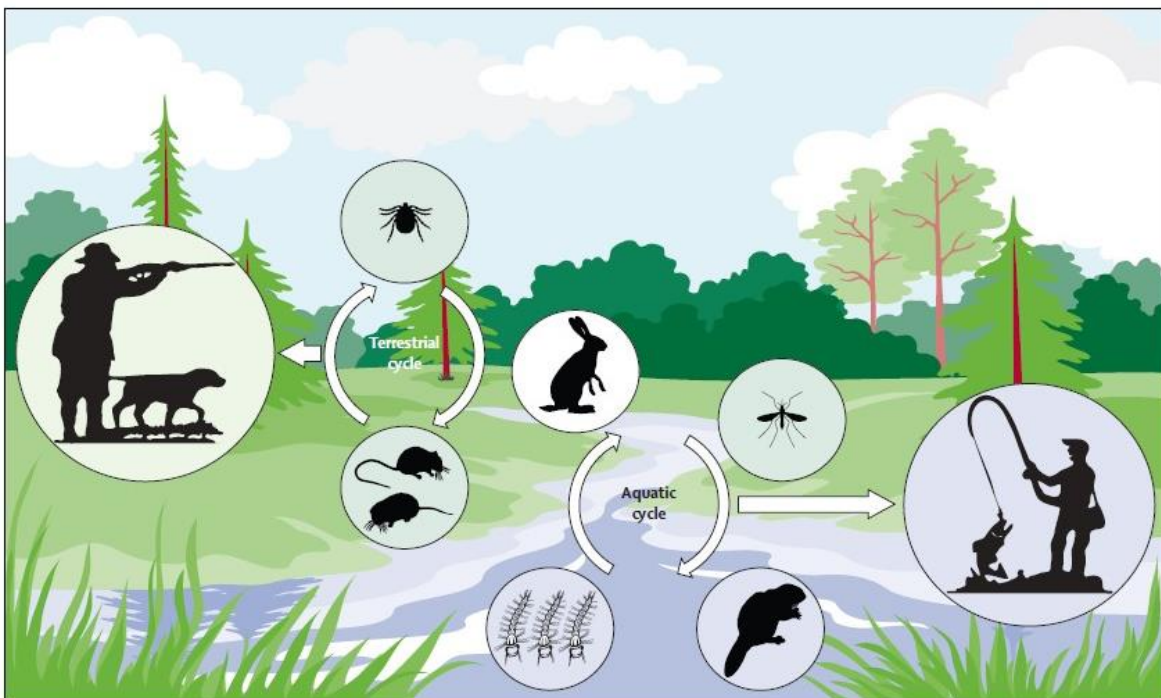


Figure 12 : Cycles terrestre et aquatique de *F. tularensis*, d'après Maurin et Gyuranecz, 2016 (1).

Les animaux contaminés souillent l'environnement aquatique, par leurs excréments et leurs carcasses. Une fois dans l'eau, les bactéries contaminent les larves de moustiques, les mammifères aquatiques et terrestres qui consomment l'eau. Les bactéries repartent ainsi dans le cycle terrestre. *F. tularensis* pourrait aussi survivre de nombreux mois dans l'eau. Les bactéries se propagent dans l'environnement par les mammifères, les piqures de moustiques et les aérosols. Les mécanismes de persistance dans l'eau ne sont pas encore élucidés, ils pourraient impliquer les protozoaires, un arrangement en biofilm des bactéries ou un état spécifique de persistance (1).

I.6.1 Les mammifères

Plus de 190 espèces mammifères (lagomorphes, petits rongeurs mais aussi ours, primates, félins...) ont été identifiées comme hôtes ou sporadiquement infectées par *F. tularensis* (108–110). Les lagomorphes et les rongeurs sont une source importante de contamination humaine. Leur sensibilité à la tularémie varie selon l'espèce de l'hôte. Ainsi, il y a des mammifères pour lesquels l'infection est rapidement fatale, et d'autres pour lesquels l'infection persiste de nombreux mois, ce qui en fait des réservoirs (109,111). En Europe, deux grandes espèces de lagomorphes sont impliquées dans la transmission et la persistance de la tularémie : *Lepus europaeus* en Europe centrale, et *Lepus timidus* en Europe du Nord (4). A ce jour, les lièvres sont reconnus comme réservoir de *F. tularensis*, ce sont également des animaux sentinelle, qui permet de déterminer les régions enzootiques. Comme la contamination humaine, la contamination des mammifères peut se faire par le contact ou l'ingestion d'un autre animal contaminé ; l'ingestion d'eau contaminée ; ou via un arthropode hématophage (1).

I.6.2 Les tiques

Les tiques sont des hôtes de *F. tularensis*, en Europe, la principale espèce de tiques portant *F. tularensis* est *Dermacentor reticulatus* (4) et une transmission transtadiale de *F. tularensis* a été observée. Cependant, le rôle des tiques dans le maintien environnementale des bactéries n'est pas encore clairement établi (1,112).

I.6.3 Les moustiques

Dans le Nord de l'Europe, les moustiques sont un hôte commun de la tularémie. Les espèces des genres *Aedes*, *Culex* et *Anophèles* peuvent transmettre la bactérie (4). En Suède et en Finlande, les piqûres de moustiques sont la principale cause de transmission de tularémie, elles provoquent des cas sporadiques et des épidémies (92,113–116). En Suède, où chaque année des épidémies de tularémie sont recensées après des piqûres de moustique, une étude a corrélié l'incidence de la maladie avec la présence de lacs et rivières, faisant l'hypothèse que les contaminations étaient dues aux moustiques qui sont contaminés au stade larvaire (92). En Allemagne, de rares cas de tularémie survenus après pique par les moustiques ont également été recensés (117). Aux Etats-Unis, de l'ADN de *F. tularensis* a été retrouvé dans des moustiques, suggérant qu'ils peuvent également transmettre la bactérie (118). Les moustiques sont donc un vecteur important de la tularémie, mais a priori limités aux pays nordiques. Ils sont probablement contaminés lors du stade larvaire dans l'eau elle-même contaminée, et participent ainsi au cycle de vie aquatique de *F. tularensis* (1,119).

I.6.4 Autres hôtes et/ou vecteurs potentiels

De nombreux autres insectes peuvent être vecteurs potentiel de *F. tularensis*, comme les taons, les acariens et les puces mais avec un impact mineur sur la transmission de la bactérie (4). Les taons sont appelés vecteurs mécaniques de la bactérie, car elle ne se multiplie pas dans cet hôte. Ils peuvent se nourrir successivement sur plusieurs individus et transmettent ainsi rapidement la bactérie, leurs pièces buccales ayant été souillées par du sang contaminé (120). C'est pourquoi on parle aussi de « seringues volantes ». Parmi les vertébrés, à ce jour, 23 espèces d'oiseaux, et quelques espèces de reptiles et d'amphibiens, ont également été identifiées comme potentiels hôtes (121,122). Cependant, ces espèces sont probablement des hôtes accidentels de la bactérie et ne peuvent pas être considérées comme des réservoirs (1,15).

I.7 Persistance dans l'environnement aquatique

Le cycle aquatique joue un rôle certain dans la persistance et la prolifération de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. L'hypothèse d'un réservoir aquatique a même émergé sans que son existence puisse être formellement démontré. Elle est notamment étayée par des études environnementales qui retrouvent l'ADN de *F. tularensis* dans des étendues d'eau en Europe et aux Etats-Unis. Cependant, ce réservoir potentiel n'est pas encore démontré, et les mécanismes de persistance environnementale aquatique de *F. tularensis* restent non élucidés. Plusieurs hypothèses sont envisagées :

- La bactérie pourrait persister en infectant des protozoaires tel que les amibes, et le cycle intra-cellulaire lui permettrait de résister aux rudes conditions de l'environnement (123,124) ;
- La bactérie pourrait persister sous forme de biofilm. Cette structure complexe souvent composée de cellules en dormance (125), permet aux bactéries qui y sont imbriquées de survivre à d'importants stress (126,127) ;
- La bactérie pourrait persister sous forme planctonique dans l'eau. Les ressources nécessaires à sa survie se trouveraient dans ces étendues d'eau et elle pourrait persister dans un état de dormance ou non (128,129).

Il est important de noter, que ces principales hypothèses sur le mécanisme de survie environnementale de *F. tularensis* ne s'excluent pas les unes des autres, et qu'il est possible que plusieurs d'entre-elles coexistent.

I.7.1 Interaction potentielle avec les protozoaires

Une des manières de survivre dans l'environnement pour les micro-organismes est l'interaction avec des protozoaires. Il existe plusieurs travaux sur *Francisella* et les amibes mais leurs résultats sont contradictoires. Des études ont montré l'intégration et la multiplication de *F. tularensis* dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (2,130). Les espèces aquatiques *F. novicida*, *F. philomiragia* et *F. noatunensis* semblent quant à elles capables de se multiplier dans plusieurs espèces d'amibes (*Veramamoeba vermiformis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Dictostelium discoideum*) (131–135). Cependant, dans notre équipe de recherche, des travaux

ont été menés sur la croissance intra-amibienne des *Francisella* et en coculture avec les amibes. Les expériences montrent que la réplication intra-amibienne serait en réalité due à une multiplication bactérienne dans le milieu de culture des amibes. Les auteurs avancent l'hypothèse que les amibes favoriseraient la croissance des bactéries par leur proximité, probablement par l'intermédiaire de molécules sécrétées. Ces hypothèses sont étayées par des modèles *in vitro* de croissances bactériennes en cocultures avec amibes, et en milieu de culture amibien déplétés en amibes avant l'inoculation des bactéries (123,136–138).

I.7.2 Formation potentielle de biofilm

Les biofilms sont des populations de bactéries structurées dans une matrice extracellulaire. Bien qu'ils puissent se former à l'interface air-liquide, de nombreux biofilms se fixent sur une surface. C'est une forme majeure de survie bactérienne. Le biofilm est d'ailleurs assimilé à un « organisme pluricellulaire bactérien ». La matrice extracellulaire comporte tous les éléments du biofilm sauf les bactéries. Ces composants sont sécrétés par les micro-organismes ou proviennent du milieu extérieur, et sont responsables de l'architecture du biofilm. Cette matrice est majoritairement composée d'eau, elle contient également des sucres, des produits de dégradation, des acides nucléiques ou encore des lipides. Pour de nombreuses espèces bactérienne, l'attachement du biofilm se fait grâce aux pili de type IV (139).

Le biofilm confère une protection aux bactéries qui le composent. Elles sont plus résistantes aux stress environnementaux, aux antibiotiques et aux désinfectants grâce à une diminution de leur activité métabolique. Le biofilm favorise également l'échange de matériel génétique, la résistance au stress oxydant et à la phagocytose des bactéries par les cellules du système immunitaire et des amibes (126).

La capacité de *F. tularensis* à former du biofilm est encore mal définie. Les espèces environnementales *F. novicida* et *F. philomiragia*, ainsi que la souche atténuée de *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS et la souche de laboratoire *F. tularensis* ssp. *tularensis* SchuS4 sont capables de former du biofilm *in vitro* (126). Cependant, ce biofilm est différent selon l'espèce bactérienne, par exemple *F. novicida* forme un biofilm plus robuste que *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS (127).

I.7.3 Détection de *F. tularensis* en milieu aquatique

Quelques études de terrain pour rechercher des *Francisella* dans l'environnement ont été réalisées en Europe et aux Etats-Unis (Tableau 2) (93,140–147). Certaines ont été réalisées au cours d'épidémies aux Pays-Bas, en Norvège et en Turquie (93,140,142). La difficulté de ces études est de rechercher spécifiquement l'espèce pathogène *F. tularensis*. Parmi la dizaine d'études publiées, la moitié ne distingue pas les espèces aquatiques (*F. novicida*, *F. philomiragia*...) de l'espèce pathogène (140,141,143,147). Il est donc difficile de conclure quant à la présence de la bactérie responsable de la tularémie dans ces échantillons. Les autres études identifient en revanche spécifiquement *F. tularensis* grâce à des outils moléculaires spécifiques (93,142,144–146). L'amplification et le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S, ne permet pas la distinction entre les espèces de *Francisella*. Cette technique peut tout de même être utilisée en première intention, en criblage des échantillons. Des combinaisons de tests PCR ont été utilisées dans les études de terrain pour détecter l'ADN de *Francisella*. Certains tests PCR sont similaires à ceux utilisés en diagnostic (§I.5.2.2). L'amplification de la séquence d'insertion *ISFTtu2* présente en multcopie est utilisée presque systématiquement pour le criblage du genre *Francisella*. Elle est très peu spécifique puisqu'elle détecte toutes les espèces de *Francisella* et les endosymbiotes *Francisella*-like. Les tests PCR ciblant les gènes *23kDa* (exprimé dans la réponse aux macrophages), *tul4* (*lnpA*), *fopA* (des protéines membranaires), *sdhA* (succinate dehydrogenase) et *purCD* (synthetase/phosphoribosylamine–glycine ligase) sont moins sensibles car il n'y a qu'une copie de ces gènes dans le génome. Les tests PCR ciblant les gènes *23kDa*, *fopA*, *sdhA* et *purCD* ne permettent que la détection des espèces *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*. Le test PCR ciblant le gène *tul4*, quant à lui, est spécifique des espèces *F. tularensis* et *F. novicida* (82). Le test PCR FtM19 et le séquençage de l'amplicon permettent de distinguer les sous espèces *tularensis* et *holarctica*.

L'isolement des souches bactériennes est en revanche très difficile du fait de la contamination des eau environnementales par de multiples micro-organismes, et parce que la culture de *F. tularensis* est lente et fastidieuse ; elle a néanmoins été rapportée quelques fois en Turquie, Ukraine et aux Etats-Unis (143,144,147).

Pays et années	Nombre et types d'échantillons	Outils de détections	Espèces retrouvées	Echantillons positifs	
Ukraine 1941-2008	non spécifiés	Culture	<i>F. tularensis</i>	393	(143)
Pays-Bas 2013-17	466 - Eau de surface	PCR IS <i>Ftu2</i> et <i>fopA</i>	<i>F. tularensis</i>	152 (33%)	(142)
Suède 2003-05	341 - Eau de surface	PCR <i>lpnA</i> et FtM19	<i>F. tularensis</i>	108 (32%)	(145)
Etat Unis 2001	Non spécifié - Sources	Culture	<i>Francisella</i> sp.	39	(147)
Norvège 2010	213 - Eau de mer et eau douce	PCR <i>sdhA</i> , <i>purCD</i>	<i>Francisella</i> sp.	38 (18%)	(140)
Turquie, 2008-09	154 - Rivières, fontaines, sources	PCR IS <i>Ftu2</i> et culture	<i>F. tularensis</i>	4 en culture (3%), 17 en PCR (11%)	(144)
Etats-Unis 2005-07	77 - Eau saumâtre et eau douce	PCR <i>sdhA</i> , <i>tul4</i> , IS <i>Ftu2</i> , <i>fopA</i>	<i>Francisella</i> sp.	19 (25%)	(141)
Allemagne 2005-06	28 - Lac et canaux	PCR <i>fopA</i>	<i>F. tularensis</i>	1 (4%)	(146)

Tableau 2 : Résumé des études de recherche environnementale aquatique de *Francisella*

I.7.4 Modèles *in vitro* de survie environnementale aquatique de *F. tularensis* en condition axénique

Depuis les années 1950, il est connu que *F. tularensis* peut survivre dans l'eau (148). Quelques études, comparées dans le Tableau 3, ont évalué la survie de *F. tularensis* dans l'eau. Lorsque la bactérie est plongée dans l'eau relativement fraîche ($\leq 20^{\circ}\text{C}$), à un inoculum relativement élevé (entre 10^7 et 10^9 UFC / mL), la population bactérienne décroît doucement mais, elle reste détectable par croissance sur milieu gélosé enrichi et numération des UFCs (unités formant colonie) pendant plusieurs semaines.

Berrada & Telford en 2011 (149), ont évalué la cultivabilité des deux sous-espèces de *F. tularensis* et de *F. novicida* dans l'eau environnementale filtrée à $0,1\mu\text{m}$, à 21°C et à différentes salinités, avec un inoculum à 10^9 UFC/mL. Après 10 jours dans l'eau douce, 10^4 UFCs/mL pouvaient encore être retrouvées en culture pour les sous-espèces *tularensis* et

holarctica. Dans l'eau salée, il a fallu 24 jours à la sous-espèce *tularensis* et 21 jours à la sous-espèce *holarctica* pour décliner à 10^4 UFCs/mL. Dans l'eau saumâtre, il a fallu 35 jours à la sous-espèce *tularensis* et 45 jours à la sous-espèce *holarctica* pour atteindre 10^4 UFCs/mL. Cette étude a obtenu des résultats similaires avec l'espèce environnementale *F. novicida*. Il est aussi important de noter que la souche utilisée pour la sous-espèce *holarctica* était la souche génétiquement modifiée LVS (149).

Gilbert & Rose en 2012 (128) ont évalué la cultivabilité de plusieurs espèces pathogènes dans l'eau courante autoclavée, à 8°C et 25°C avec un inoculum de 10^7 UFCs/mL. Concernant *Francisella*, ils ont étudié la souche virulente *F. tularensis* ssp. *holarctica* NY98 et la souche de virulence atténuée de *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS. Dans l'eau à 8°C la cultivabilité des deux souches a décliné, jusqu'à atteindre 0 UFC/mL en 21 jours pour LVS et en 30 jours pour la souche virulente. Les auteurs n'ont pas réussi à cultiver *F. tularensis* dans l'eau à 5 et 25°C. Bien qu'ils aient mentionné la possibilité d'obtenir des bactéries non-cultivables, ils n'ont pas étudié ce paramètre pour *F. tularensis*, alors qu'ils l'ont fait pour les autres espèces étudiées (128).

Golovliov et al. en 2021 (150), ont évalué la cultivabilité et la formation de biofilm dans de l'eau physiologique stérile (0,9% NaCl) d'un inoculum de 10^8 UFCs/mL. Dans l'eau à 4°C la sous-espèce *tularensis* a été retrouvée en culture après 14 semaines d'incubation dans l'eau. La souche virulente et la souche LVS de la sous-espèce *holarctica* ont été détectées pendant 24 semaines. Dans l'eau à 20°C les auteurs n'ont évalué la cultivabilité que 12 semaines après l'inoculation sans pouvoir détecter de croissance bactérienne. Les résultats ont été similaires pour *F. novicida* en terme de cultivabilité, cependant une formation de biofilm a été observée avec cette espèce (150).

Toutes ces études ont évalué la survie aquatique par la capacité de croissance bactérienne sur milieu gélosé enrichi et numération des UFCs. Ce paramètre mesure en réalité la cultivabilité des bactéries, mais pas leur viabilité. Classiquement, la cultivabilité était associée à la viabilité bactérienne, alors que nombreuses espèces bactériennes sont capables de survivre, sans croître.

Forsman et al. en 2000 (129), ont été les premiers à mentionner la possibilité de bactéries vivantes mais non cultivables pour *F. tularensis*. Leurs expériences ont été réalisées à partir d'un inoculum de 10^7 UFCs/mL dans de l'eau courante stérilisée, à 8°C. Ils ont évalué la cultivabilité de la souche LVS à 70 jours et l'activité métabolique à 140 jours. Ils ont observé

une activité métabolique après une perte de la capacité de croissance. Ces bactéries métaboliquement actives ne semblaient pas infectieuses et ne retrouvaient pas leur capacité de croissance en changeant la température du milieu, ou en les passant en milieu riche (129).

Souche	Type d'eau	Température	Salinité	Cultivabilité	Références
Type A	Stérile	4°C	9 g/L NaCl	14 semaines	(150)
Type B virulente	Stérile	4°C	9 g/L NaCl	24 semaines	(150)
Type B LVS	Stérile	4°C	9 g/L NaCl	24 semaines	(150)
Type B virulente	Courante autoclavée	8°C	Douce*	30 jours	(128)
Type B LVS	Courante autoclavée	8°C	Douce*	21 jours	(128)
Type B LVS	Courante filtrée	8°C	Douce*	70 jours	(129)
Type A	Stérile	20°C	9 g/L NaCl	< 12 semaines	(150)
Type B virulente	Stérile	20°C	9 g/L NaCl	< 12 semaines	(150)
Type B LVS	Stérile	20°C	9 g/L NaCl	< 12 semaines	(150)
Type A	Environnementale filtrée	21°C	Douce*	10 jours	(149)
Type A	Environnementale filtrée	21°C	Saumâtre*	35 jours	(149)
Type A	Environnementale filtrée	21°C	Salée*	24 jours	(149)
Type B LVS	Environnementale filtrée	21°C	Douce*	10 jours	(149)
Type B LVS	Environnementale filtrée	21°C	Saumâtre*	45 jours	(149)
Type B LVS	Environnementale filtrée	21°C	Salée*	21 jours	(149)

Tableau 3 : Résumé des études de cultivabilité de *F. tularensis* dans l'eau. * Les auteurs n'ont pas précisé la concentration en NaCl

Il est à noter que lorsque la souche LVS est utilisée dans ces expériences, elle peut ne pas être représentative de la persistance d'une souche virulente appartenant à la sous-espèce *holarctica*, puisqu'elle est génétiquement modifiée et atténuée par passages successifs. Il est possible que d'autres paramètres que la virulence soient modulés par rapport à la souche virulente.

Ces études tendent toutes vers la même conclusion, c'est-à-dire une persistance prolongée de *F. tularensis* sous sa forme cultivable pendant plusieurs semaines en milieu aquatique à faible température. Mais les types d'eau, les souches utilisées, les températures et les concentrations en NaCl étaient variables. En revanche aucune étude n'a étudié la viabilité de *F. tularensis* ssp. *holarctica* virulente, après la perte de cultivabilité.

II. L'état bactérien viable mais non cultivable (VBNC)

II.1 Définition

II.1.1 Comment définir une bactérie vivante (viable) ?

La définition de l'état cellulaire viable mais non cultivable (VBNC) pourrait relever d'une thèse philosophique sur la définition même du vivant chez les micro-organismes.

D'après le Larousse, la définition du vivant est « qui a les caractéristiques de la vie, par opposition à ce qui est inanimé, inerte ». Cette définition présente plusieurs lacunes puisqu'elle demande d'avoir défini la vie au préalable, et elle utilise une opposition pour se définir. Bien sûr, la définition du vivant ne pose pas de problème pour les organismes visibles à l'œil nu. Nous pouvons aisément constater qu'ils sont en vie, c'est-à-dire croissent, se nourrissent et se reproduisent. Mais comment appliquer cette définition pour les micro-organismes, invisibles à l'œil nu ? Au XVII^e siècle, sous les microscopes qu'il met au point, Antoni van Leeuwenhoek était d'ailleurs persuadé d'observer des organismes vivants car ils étaient motiles, il les nomma *animacula* (151). Cependant, la motilité ne peut pas définir le vivant car de nombreux micro-organismes ne sont pas motiles.

Bien que la capacité de reproduction ne définisse pas le caractère vivant d'un organisme, pour les bactéries, les microbiologistes considéraient qu'une cellule bactérienne vivante est capable de croître dans un milieu riche jusqu'à troubler le milieu liquide ou former une colonie sur un milieu solide. Lorsque la croissance de la bactérie n'est pas observable, elle était usuellement considérée comme morte. Cette définition peut être considérée comme le chat de Schrödinger des microbiologistes. De la même manière que Schrödinger ignore l'état de son chat dans la boîte, l'observateur d'une cellule sous l'objectif du microscope ignore si elle est vivante ou morte. Il serait donc impossible d'affirmer qu'une cellule est vivante mais seulement qu'elle était vivante (152). Ces paradoxes ont été discutés dans la communauté microbiologiste à la fin des années 1990 (151–154). Il a alors été défini qu'une bactérie vivante répondait aux critères suivants :

- une membrane cellulaire intacte qui assure sa fonction de barrière entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire ;

- une activité transcriptionnelle et traductionnelle ;
- l'utilisation d'énergie pour le métabolisme cellulaire, la biosynthèse de composants cellulaires comme les protéines, les acides nucléiques, des polysaccharides... ;
- éventuellement une croissance bactérienne (151).

Ce dernier point nous intéresse particulièrement ; alors qu'il était le seul critère définissant le vivant, il est maintenant optionnel. Cette définition permet de distinguer les bactéries cultivables des bactéries non-cultivables.

II.1.2 Sémantique et controverse scientifique

L'état « viable mais non cultivable » (VBNC pour Viable But Non-Culturable) désigne des bactéries qui ont perdu leur capacité de croître en milieu adapté, mais qui restent vivantes. Cependant, la définition de l'expression « viable mais non cultivable » est encore controversée dans la littérature. Plusieurs terminologies existent et plusieurs hypothèses cellulaires sont avancées.

Selon les auteurs, les notions d'état VBNC, de persisteurs et de dormance peuvent soit se confondre (154,155), soit représenter des états cellulaires différents (152,156). Les bactéries VBNC peuvent aussi être appelées « actives mais non cultivables » (ABNC pour active but non-culturable), « non-croissantes mais métaboliquement actives » (NGMA pour non-growing but metabolically active), « cellules viables selon les conditions environnementales » (CVEC pour conditionally viable environmental cells) (157), « actives physiologiquement mais non cultivables » (ANC pour physiologically active but nonculturable) (158) ...

Il y a également plusieurs hypothèses sur la définition des bactéries VBNC :

- La perte de croissance bactérienne serait due à une méconnaissance du milieu de culture adapté pour faire croître les bactéries (159,160).
- Les bactéries VBNC seraient des bactéries blessées qui vont soit mourir, soit se régénérer et donc regagner leur capacité de croissance (152).
- L'état VBNC serait l'étape précédant la sénescence programmée (161).
- Les bactéries VBNC ne pourraient pas retrouver leur capacité de croissance, donc les bactéries qui se réactivent ne seraient pas des vraies bactéries VBNC (162). Ou au

contraire, c'est la capacité à se réactiver qui définirait une bactérie non cultivable comme VBNC (154).

- Le regain de croissance serait dû à une très faible quantité de bactéries cultivables dans la population (163).

II.1.3 Définition de l'état « viable mais non cultivable »

Dans ce travail de thèse, nous considérerons les termes qui semblent fédérer le plus d'auteurs, à savoir : les bactéries VBNC sont vivantes et répondent aux critères de viabilité des bactéries. Elles ont une membrane intacte, sont métaboliquement actives et sont capables de transcription et traduction mais ne se multiplient pas. Dans certaines conditions, elles sont capables de se réactiver et de se multiplier à nouveau (155,156,164–169). Nous considérerons aussi que les bactéries en dormance sont des bactéries avec une réduction de l'activité métabolique. Les bactéries à l'état VBNC et les persisteurs sont les deux grands types de bactéries en dormance. Ce sont des stratégies différentes de résistance aux stress. Les persisteurs sont une petite population d'individus qui persistent dans la population générale et qui survivent en cas de stress ; alors que les bactéries VBNC sont un état dans lequel passe la quasi-intégralité de la population bactérienne en cas de stress (Figure 13) (156,169).

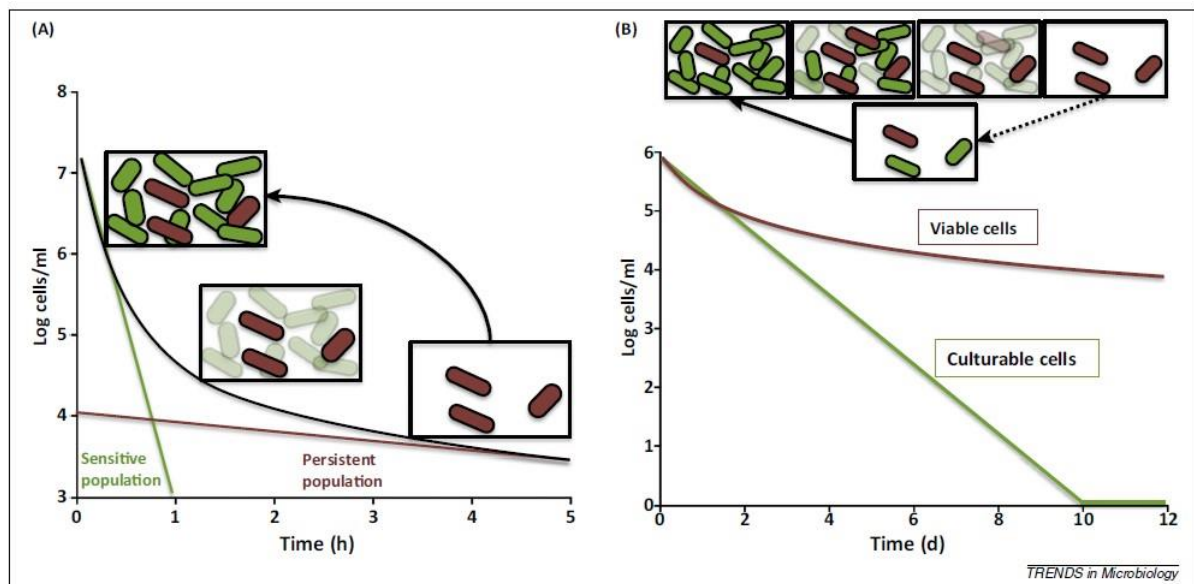


Figure 13 : Dynamique de dormance bactérienne. A : Dynamique de formation des persisteurs. B : Dynamique de formation des bactéries VBNC. D'après Ayrapetyan et al., 2015 (156).

Les bactéries passent dans un état VBNC lorsqu'elles subissent un stress (changement de température, du pH, d'osmolarité, de pression...). Cet état permet à la bactérie de survivre dans un environnement défavorable, une analogie avec les spores des bactéries sporulantes peut être faite. Cette stratégie évolutive permet de protéger le matériel génétique de l'espèce bactérienne pendant des mois sans que les bactéries se ne multiplient (155,164,170). C'est un état transitoire, puisque dans certaines conditions propres à chaque espèce bactérienne, les bactéries peuvent se réactiver c'est-à-dire retrouver leur capacité de croissance (152,154,162).

Génétiquement, les bactéries VBNC ne diffèrent pas des bactéries cultivables, le passage d'un état à un autre est donc une modification phénotypique (156). C'est une adaptation à court terme des bactéries à un environnement stressant.

Techniquement, il est possible d'obtenir des bactéries à l'état VBNC au laboratoire. L'induction se fait par une exposition à un stress ; la population cultivable va alors chuter. Le déclin peut prendre quelques jours à plusieurs mois. La population viable se stabilise très rapidement car il y a peu de mortalité cellulaire. Lorsque les bactéries ne sont plus cultivables, la viabilité reste stable au cours du temps. C'est donc le pool bactérien total qui passe à l'état VBNC et non pas quelques bactéries sporadiques, ce qui est le cas pour les persisteurs.

Cet état bactérien a été décrit pour la première fois en 1982 pour *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* (171). Cette étude a mis en évidence des bactéries vivantes dans l'eau par des techniques de fluorescence alors qu'aucune croissance n'était détectée dans les milieux de culture. L'état VBNC est maintenant connu pour plus de 70 espèces à Gram-positif et à Gram-négatif (Tableau 4) (155,164,167). Il est intéressant de noter que c'est une capacité qui est retrouvée chez de nombreuses espèces aquatiques (153). Des agents pathogènes pour les humains, les animaux et les végétaux sont connus pour survivre à l'état VBNC, ce qui justifie leur étude à des fins de santé publique (164,172).

Pour résumer, les bactéries à l'état VBNC sont donc dans un état de dormance qui se différencie des persisteurs. Il permet à l'espèce bactérienne de conserver son matériel génétique. Lennon et Jones, en 2011 ont fait l'analogie entre les graines des végétaux et l'état VBNC des bactéries (170). Cet état est une manière de survivre dans un environnement stressant, probablement enchâssé dans un biofilm. Flemming et al. en 2016 ont défini le biofilm comme un réservoir à bactéries VBNC (125).

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Salmonella agona</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Vibrio shiloi</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Citobacter freundii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Tableau 4 : Liste non-exhaustive de bactéries connues pour entrer en état VBNC, d'après Oliver, 2010 (164), Li et al., 2014 (155), Zhao et al., 2017 (167)

II.2 Détection

Par définition, les bactéries à l'état VBNC ne sont pas détectables par les méthodes de cultures bactériologiques. Pour identifier ces bactéries, il faut utiliser des techniques qui explorent les autres paramètres de la viabilité : l'intégrité cellulaire, l'activité métabolique, la transcription ou la traduction. Plusieurs techniques ont été développées, les plus courantes sont exposées dans les prochains paragraphes.

II.2.1 Techniques basées sur l'intégrité cellulaire

Une des principales différences entre une bactérie morte et une bactérie vivante est l'état de la paroi cellulaire. En effet, une bactérie vivante possède une paroi intègre qui la délimite du milieu extracellulaire. A l'inverse, une bactérie morte possède une paroi perméable aux composés extracellulaires. Plusieurs techniques de détection des bactéries VBNC sont basées sur ce principe :

II.2.1.1 Les marqueurs fluorescents

Pour les techniques utilisant ces composés, il faut au minimum deux marqueurs fluorescents émettant à des longueurs d'ondes différentes. Plusieurs types de molécules fluorescentes sont capables de fixer des composants cellulaires. Un des marqueurs entre dans toutes les cellules quelle que soit l'intégrité des membranes, et se fixe à un composé cellulaire, comme les acides nucléiques (par exemple : le Syto9 ou l'acridine orange). L'autre marqueur pénètre uniquement les bactéries avec une membrane lésée, et se fixe à un composé cellulaire (par exemple : l'iodure de propidium). La membrane cellulaire peut également être marquée, en utilisant le potentiel de membrane. En effet, les membranes intactes ont un potentiel négatif, les colorants cationiques lipophiles peuvent donc se fixer, alors que les membranes lésées n'ont pas de différence de potentiel, fixant alors les colorants anioniques lipophiles (168). Ainsi, les bactéries mortes peuvent être distinguées des bactéries vivantes en microscopie à fluorescence ou en cytométrie en flux. Il est important de noter que pour obtenir des données fiables sur la viabilité avec cette technique, il est préférable d'utiliser un cytomètre en flux. Le compte des

bactéries avec un microscope à fluorescence est possible mais nécessite que les champs analysés soient choisis par l'expérimentateur, ce qui peut induire un biais.

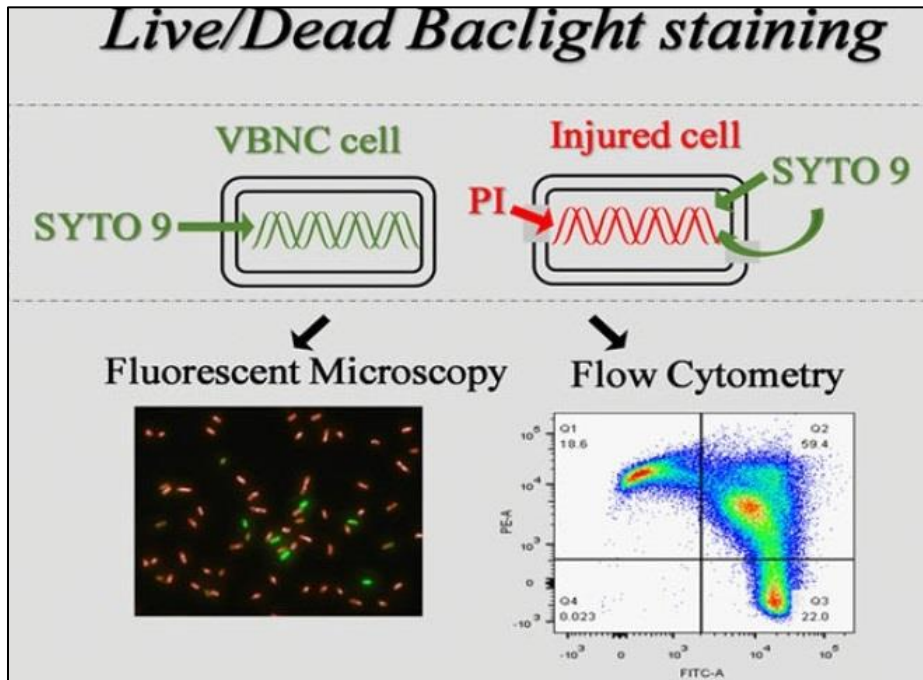


Figure 14 : Evaluation de la viabilité bactérienne par marqueurs fluorescents Live/dead BacLight. L'ADN des bactéries vivantes est marqué au Syto9 alors que l'ADN des bactéries avec une paroi lésée est marqué à l'IP et au Syto9. Des analyses microscopiques et en cytométrie en flux permettent de distinguer les bactéries vivantes des bactéries mortes.

II.2.1.2 PCR de viabilité (vPCR)

L'ADN étant très stable, même dans un environnement extrême, il n'est pas possible de l'utiliser directement pour mesurer la viabilité cellulaire. Cependant, il existe des intercalants de l'ADN avec lesquels l'échantillon d'intérêt peut être traité. L'intercalant ne peut entrer que dans les cellules lésées, à l'intérieur desquelles il se fixe de manière covalente à l'ADN. Après une étape d'extraction de l'ADN, une PCR quantitative (qPCR) est réalisée au cours de laquelle l'ADN polymérase ne peut pas amplifier d'ADN lié à l'intercalant. Ainsi, le produit de PCR ne sera que l'amplification d'ADN de bactéries vivantes (Figure 15). Plusieurs intercalants d'ADN sont disponibles sur le marché, comme le monoazide d'ethidium (EMA) ou le monoazide de propidium (PMA). Cette technique est très dépendante de la qualité de l'intercalant de l'ADN, et il peut toujours avoir des molécules d'ADN non liées à l'agent intercalant. Pour cela, des

fournisseurs ont amélioré leurs composés comme le PMAxx™ qui est un PMA modifié pour une meilleure affinité à l'ADN, mais il est important de toujours vérifier l'amplification basale d'une population de bactéries mortes traitées avec l'intercalant. De plus, le PMA et l'EMA peuvent avoir une activité cytotoxique selon l'espèce bactérienne et la concentration, induisant des faux négatifs (173).

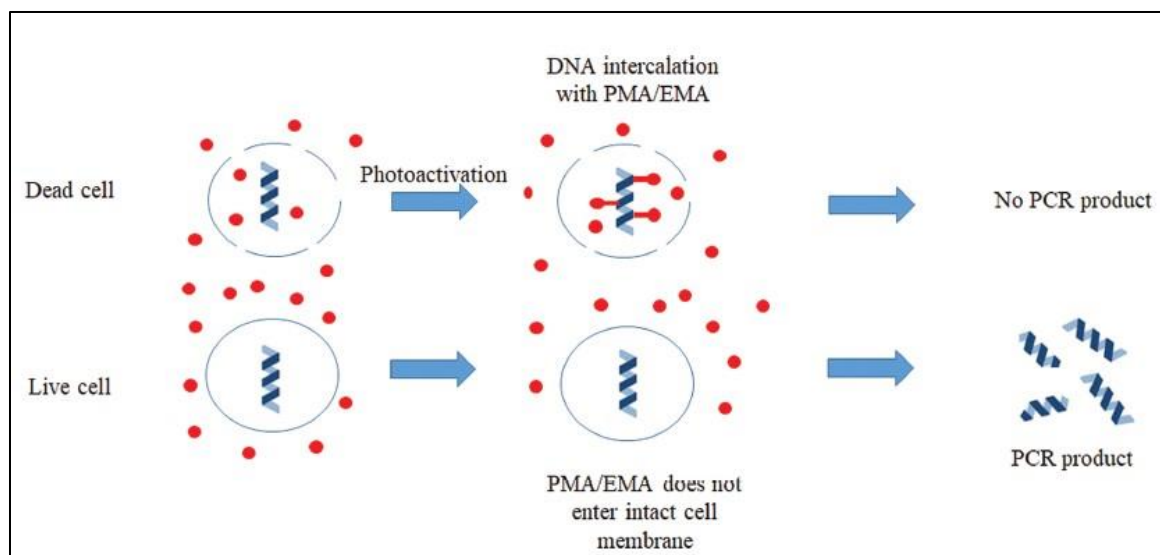


Figure 15 : Principe de la PCR viabilité (vPCR). Les bactéries sont incubées avec l'intercalant de l'ADN (représenté en points rouges). Ce dernier entre dans les bactéries mortes (membranes lésées) et se fixe à l'ADN. Lors de la PCR, l'ADN des bactéries mortes ne peut pas être amplifié car l'ADN polymérase est bloquée par l'intercalant. D'après Kumar et Ghosh, 2019 (168)

II.2.2 Techniques basées sur le métabolisme et la transcription

II.2.2.1 La reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

La transcription de l'ADN en ARN est l'un des signes de viabilité d'une bactérie. L'extraction d'ARN suivie d'une étape de PCR reverse transcriptase, peuvent donc permettre d'identifier une population de bactéries vivantes par la détection d'ARN transcrits par la bactérie. L'ARN étant très peu stable dans l'environnement, sa présence est corrélée à la viabilité. L'amplification doit bien sûr concerner un gène exprimé dans l'état VBNC. Cette technique est dépendante de la qualité de l'extraction d'ARN, très fragile, et de la transcription

du gène amplifié dont il faut au préalable vérifier qu'il n'est pas modulé à l'état VBNC. Quelques études ont été réalisées sur l'expression génique des VBNC (174,175). Comme il est difficile de quantifier les bactéries à l'état VBNC, il faut pouvoir s'assurer que les modulations génétiques potentiellement observées ne sont pas simplement dues à une quantité différente de bactéries entre les deux populations.

II.2.2.2 Les substrats réagissant avec des composés cellulaires

Certains substrats réagissent avec des enzymes cellulaires quand les cellules sont métaboliquement actives. Les enzymes hydrolysent le substrat, donnant un composé fluorescent uniquement dans les cellules vivantes. Une autre possibilité est l'utilisation de la résazurine qui est réduite par des oxydoréductases de la cellule en résorufine. La résazurine et la résorufine sont des molécules qui absorbent la lumière à des longueurs d'onde différentes, il est possible d'identifier laquelle est présente dans le milieu cellulaire par mesure d'absorbance (Figure 16). Cependant, dans le cas des bactéries à l'état VBNC, il faut s'assurer au préalable que les composés d'intérêt métaboliquement actifs sont bien produits par la cellule malgré l'état de dormance.

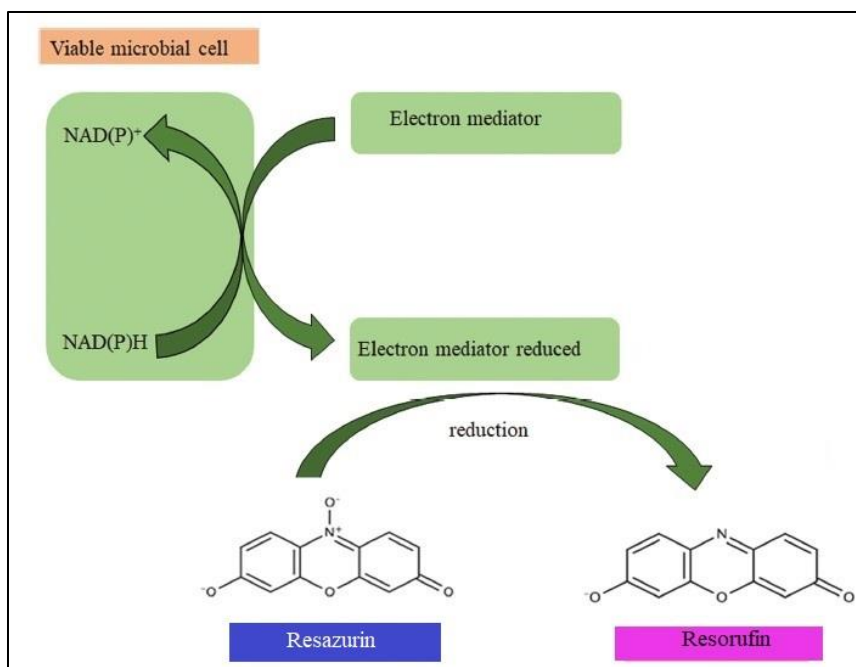


Figure 16 : Mesure de la respiration cellulaire des bactéries vivantes. Lorsque le composé bleu (résazurine) est ajouté dans une suspension bactérienne vivante, il est réduit en résorufine rose. La viabilité peut être évaluée par mesure colorimétrique. Modifié d'après Kumar et Ghosh, 2019 (168)

II.3 Mécanismes d'induction des VBNC

La mécanistique cellulaire à l'origine de l'induction de l'état VBNC d'une population bactérienne est encore loin d'être résolue. A ce jour, il n'y a pas de donnée sur l'état VBNC des bactéries du genre *Francisella*. Plusieurs auteurs ont fait l'hypothèse d'un passage à l'état VBNC en cas de stress pour *F. tularensis* ssp. *holarctica*, mais ce mécanisme et les facteurs impliqués n'ont pas encore été étudiés. Les paragraphes suivants sur les caractéristiques des bactéries à l'état VBNC, détaillent les données d'autres espèces bactériennes. Nous ne pouvons pas affirmer que ces résultats soient transférables à *Francisella*, cependant nous pouvons les considérer comme des hypothèses qui devront être étudiées.

Plusieurs études transcriptomiques et protéomiques ont recherché les différents mécanismes d'induction de l'état VBNC. Les résultats sont souvent contradictoires et les voies avancées diffèrent entre les bactéries. Le signal initial semble être un stress mais de nombreux types de stress chimiques et environnementaux sont connus et diffèrent selon les espèces bactériennes. Il y a, entre autres, le changement de température par rapport à la température optimale de croissance, la privation de nutriments, les changements osmotiques, l'exposition aux UVs, les changements de pH, les fluctuations d'oxygène, l'exposition aux métaux lourds (155,164,165,167). Les processus impliqués dépendent évidemment de l'espèce bactérienne, mais aussi du type de stress induisant l'état VBNC. Dong et al. ont récemment rassemblé un grand nombre de travaux sur les VBNC et proposé plusieurs voies d'induction possibles, résumées dans la Figure 17 (176). Les paragraphes suivants détailleront celles qui sont les mieux caractérisées.

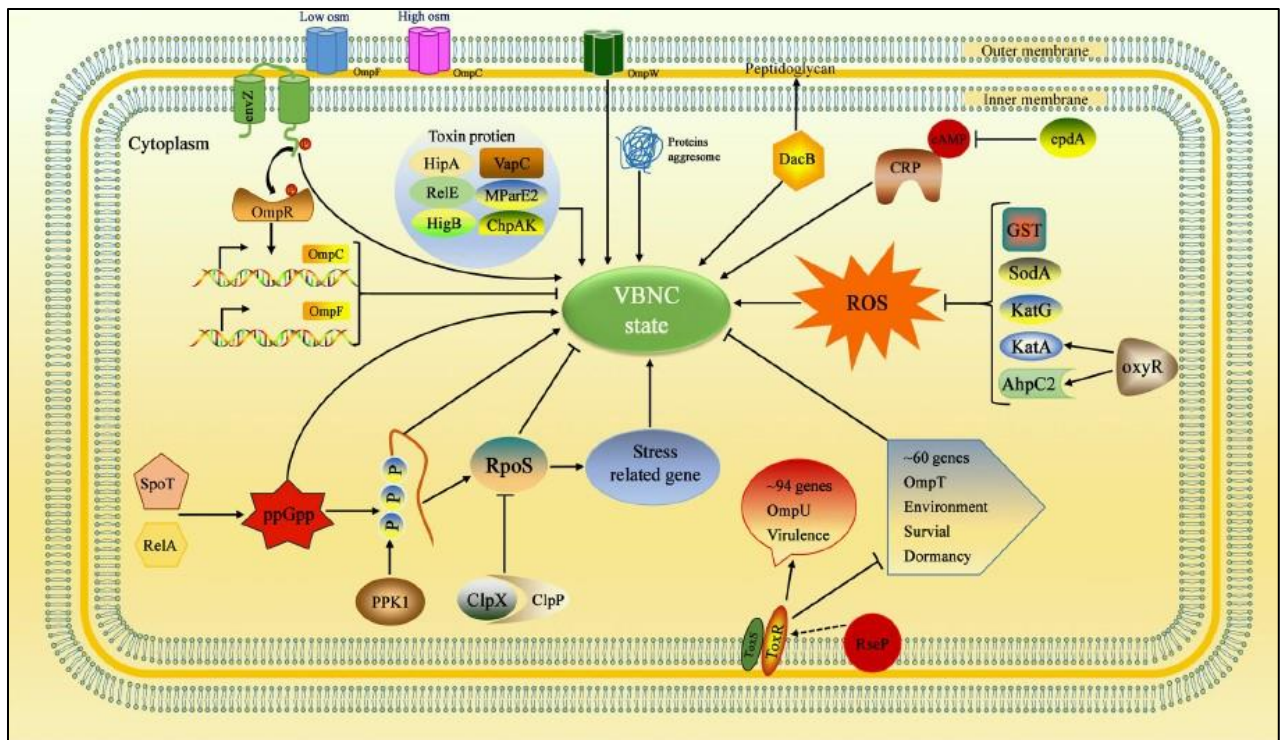


Figure 17 : Voies d'induction de l'état VBNC, Dong et al., 2020 (176).

II.3.1 Induction par régulation transcriptionnelle de RpoS

RpoS est la sous-unité sigma38 de l'ARN polymérase. Elle régule la transcription bactérienne en cas de stress. Il n'est donc pas surprenant de la trouver impliquée dans la transition vers l'état VBNC. Chez *Escherichia coli* et *Vibrio vulnificus*, lors d'un stress environnemental, l'expression de RpoS permet à la bactérie de persister plus longtemps dans une forme cultivable. Cette sous-unité de l'ARN polymérase empêcherait donc le passage à l'état VBNC. Néanmoins, l'extinction du gène *rpoS* entraîne la mort bactérienne sans passage par l'état VBNC. Les auteurs font l'hypothèse que l'expression de RpoS doit diminuer lentement pour induire l'état VBNC chez *E. coli* et *V. vulnificus* (176,177). Cependant, chez *Vibrio cholerae*, ce serait l'accumulation de RpoS qui induit l'état VBNC suite à un stress environnemental. Ce stress serait perçu par les enzymes RelA et SpoT, qui induiraient la production de (p)ppGpp. L'accumulation de cette molécule est corrélée avec l'entrée en état VBNC chez *V. cholerae*, pourtant elle entraîne aussi une accumulation de RpoS (178). Cependant, ces études présentent des divergences expérimentales, notamment dans le stress

appliqué aux bactéries. Globalement, il semblerait que le rôle de RpoS dépende de l'espèce bactérienne et du stress à l'origine de l'induction en état VBNC (176).

II.3.2 Induction par certains systèmes toxine-antitoxine

Les systèmes toxine-antitoxine sont des mécanismes bactériens constitués d'une toxine intracellulaire stable et de son antitoxine. Lors d'un stress, l'antitoxine, instable, n'est plus capable de se lier à la toxine et de l'inhiber ; la toxine entraîne ainsi un état de dormance ou la mort cellulaire. La toxine et l'antitoxine sont souvent codées sur le même opéron, assurant leur traduction simultanée (179). Les toxines de type II restreignent la croissance cellulaire par inhibition de la réplication et de la traduction. Pour induire l'état VBNC, l'antitoxine est ciblée par une protéase (Clp), qui déséquilibre le système toxine-antitoxine, induisant une augmentation de la toxine intracellulaire, qui entraîne l'état VBNC et la persistance. Par exemple, chez *E. coli*, la surexpression des toxines HipA et RelE induit un déséquilibre des systèmes HipA/HipB et RelE/RelB, et l'accumulation des toxines est à l'origine de l'induction de l'état VBNC. Ainsi, ce système est impliqué dans les mécanismes de survie par dormance (176,178).

II.3.3 Induction par le stress oxydant

L'état VBNC est induit lorsque les protéines antioxydantes (AhpC, GST, KatA, KatG...) sont inhibées (176). Par exemple, la répression de l'activité des catalases KatG et KatA entraîne un passage à l'état VBNC chez *V. vulnificus* et la restauration de l'activité de ces catalases entraîne la réactivation des bactéries. KatA et KatG permettent la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) du milieu et le maintien de la cultivabilité. Les auteurs de cette étude suggèrent que la baisse d'expression de KatG et KatA qui est à l'origine de l'induction VBNC est médiée par une augmentation de H₂O₂ qui n'est plus régulée par les enzymes antioxydantes (164). En amont, le régulateur de transcription des gènes luttant contre le stress oxydant est OxyR, son inhibition serait donc le déclencheur de l'état VBNC par la voie ROS (176,180).

II.3.4 Induction par des protéines senseurs sur la membrane externe

Les premiers senseurs de modifications environnementales sont les protéines associées à la membrane externe (Omp) et la protéine senseur EnvZ. Chez *E. coli*, la surexpression des Omp senseurs du stress oxydatif et des changements osmotiques (OmpF, OmpW, EnvZ...) induit l'état VBNC. A l'inverse, dans cette même bactérie, l'activation simultanée de OmpC et OmpF par phosphorylation inhibe l'état VBNC. Chez *S. typhimurium*, la répression des gènes *ompC* et *ompF* induit également l'état VBNC (176). Les résultats contradictoires, notamment sur le rôle d'OmpF, suggèrent une régulation fine de l'état VBNC, induite par l'équilibre de plusieurs régulateurs.

II.4 Caractéristiques protéomiques de l'état VBNC

Plusieurs études omiques ont essayé d'identifier les différences mécanistiques entre des bactéries cultivables et VBNC. Comme pour l'induction, à ce jour, aucune signature protéomique spécifique de l'état VBNC n'a été identifiée. Le protéome des bactéries VBNC dépend lui aussi des mécanismes conduisant à l'induction et de l'espèce bactérienne observée (176). De plus, le protéome des bactéries VBNC semble varier dans le temps, avec des différences entre des échantillons contenant encore des bactéries cultivables et des échantillons ne contenant que des bactéries VBNC (181). Il faut aussi noter que les analyses omiques sont dépendantes de la qualité d'extraction des protéines ou des ARN pouvant engendrer des biais à l'origine des désaccords observés dans la littérature.

Zhao et al. ont résumé l'état VBNC d'*E. coli* de la manière suivante : l'intégrité membranaire des bactéries à l'état VBNC est maintenue, ce qui permet de l'isoler de l'environnement stressant. Des activités du métabolisme central ainsi que l'expression génétique sont réprimées, tandis que la réplication et la division cellulaire déclinent (182).

II.4.1 Modification du peptidoglycane

En passant à l'état VBNC, de nombreuses bactéries changent de forme et deviennent plus coccoïdes, ce qui cause des modulations de leurs membranes. Ces modulations sont médiées par la carboxypeptidase DacB qui est impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane (176). Ce dernier est modifié à l'état VBNC, ce qui pourrait être à l'origine des changements morphologiques des bactéries (183). Une étude a montré que le peptidoglycane d'*E. coli* à l'état VBNC présentait une augmentation de sa réticulation, une augmentation des peptides liés aux lipoprotéines ainsi qu'un raccourcissement des brins de glycanes (184). Quant à *Enterococcus faecalis*, une augmentation des O-acétylation du peptidoglycane a été observée (185).

De plus, pour lutter contre le stress environnemental, la membrane cellulaire doit être plus hermétique au milieu extracellulaire. Les protéines transmembranaires qui forment des canaux à travers la membrane cellulaire sont sous-exprimées en état VBNC. (155).

II.4.2 Modification de certains systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont des mécanismes de régulation très fins des bactéries qui leur permettent de détecter et de s'adapter aux changements environnementaux. Ils se composent d'une protéine histidine kinase (senseur) qui s'autophosphoryle en réponse aux stimuli environnementaux. Le senseur transfère ensuite son groupement phosphate au deuxième composant qui régule la réponse. Le deuxième composant est souvent un élément transcriptionnel qui permet de moduler la synthèse protéique (186).

La surexpression du système DosR/DosS est l'une des réponses à l'état de dormance induite par l'hypoxie de *M. tuberculosis*. Pour lutter contre ce stress et produire de l'énergie à partir d'azote, DosR induit la transcription de gènes impliqués dans le transport de nitrate, facilitant l'accumulation de nitrite dans la condition d'hypoxie (181).

II.4.3 Modification du métabolisme de l'énergie

La respiration est un processus qui permet de procurer de l'énergie aux bactéries. Elle implique des protéines de la membrane plasmique interne qui forment la chaîne de transfert des électrons. L'énergie est produite par la phosphorylation oxydative des coenzymes membranaires réduites, aussi appelées donneurs d'électrons. Leur oxydation se fait par la dégradation de composés organiques issus du cycle de Krebs.

De manière générale, dans les bactéries à l'état VBNC, les enzymes ayant un rôle dans l'apport d'énergie pour la cellule sont sous-exprimées (187). Les enzymes participant à la phosphorylation oxydative ont été identifiées comme réprimées dans plusieurs études, particulièrement les enzymes du complexe NADH déshydrogénase et les processus d'oxydoréduction (181,188). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, des analyses transcriptomiques ont montré une sous-expression des gènes codant pour le complexe NADH déshydrogénase (*nuoA-N*, *nadA*), de la synthèse d'ATP (*atpA-H*) et du cycle de Krebs (176,181). Les analyses protéomiques ont confirmé une diminution des protéines codées par ces gènes dans les bactéries à l'état VBNC (189,190).

II.4.4 Modification des activités transcriptionnelle et traductionnelle

De nombreuses étapes de la synthèse protéique sont inhibées à l'état VBNC. Les protéines impliquées dans la synthèse des ARN ribosomiques, de l'ARN polymérase, des protéines ribosomales et des ARN de transfert sont réprimées (176,181,182,189,191). Les facteurs sigma de l'ARN polymérase sont pour la plupart réprimés mais certains peuvent être sur-exprimés selon le type de stress qui induit l'état VBNC. En cas de stress par manque de nutriments, le facteur sigma 70 (*sigF*) est sur-exprimé chez *M. tuberculosis* en dormance (181,189). Ici encore l'expression protéique dépend de l'espèce bactérienne, par exemple le facteur d'élongation de la transcription GreA est sous-exprimé chez *M. tuberculosis* (181) en état de dormance, mais sur-exprimé chez *E. coli* à l'état VBNC (182).

Les protéines ribosomales sont quant à elles modulées, ce qui leur permet de participer aux changements protéiques de la bactérie. Par exemple les gènes *rpsR2*, *rpsN2* et *rpmG1* sont sur-exprimés et *rpsL*, *rpsJ*, *rplC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rpmE* et *rpmB2* sont sous-exprimés lors de la dormance induite par l'hypoxie chez *M. tuberculosis* (181).

II.5 Impact de l'état VBNC sur la virulence des bactéries

La virulence des bactéries à l'état de VBNC est encore incertaine. Selon certains auteurs, la virulence décroît pour limiter la consommation d'énergie de la cellule (182). Ici encore, la littérature est relativement pauvre et diverge. Il est très probable que la virulence dépende de l'espèce bactérienne et du stress induisant l'état VBNC. Il est pour l'instant impossible d'affirmer que l'absence de virulence est due à l'état VBNC. En effet, lors d'une infection humaine d'origine environnementale, il est compliqué voire impossible de savoir dans quel état était la bactérie au moment de l'infection, d'où la nécessité d'avoir recours à des modèles expérimentaux.

Pour plusieurs espèces bactériennes, il semblerait que des facteurs de virulence soient exprimés à l'état VBNC, alors que les études d'infection réalisées n'ont pas permis d'observer de virulence *in vitro* ni *in vivo*.

C'est le cas de *Shigella dysenteriae*, qui semble exprimer la shigatoxine (stx), protéine de virulence majeure, dans sa forme active, à l'état VBNC. Les bactéries du genre *Vibrio* à l'état VBNC exprimeraient également leurs toxines de virulence, alors qu'elles ne semblent pas infectieuses pour les souris (165). Une étude transcriptomique a également observé la régulation à la hausse de trois gènes codant pour des toxines chez *E. coli* à l'état VBNC (192).

Certaines bactéries comme *Aeromonas* perdraient leur capacité à infecter les cellules eucaryotes (165). A l'inverse, dans une étude sur des modèles d'infection par *Legionella pneumophila*, des bactéries à l'état VBNC depuis plus d'un an ont pu infecter des amibes et des macrophages humains (193). Alleron et al. ont montré, par une étude protéomique, que *Legionella pneumophila* synthétise des protéines de virulence à l'état VBNC. Il semblerait que les protéines impliquées dans l'infection des macrophages soient en plus grande abondance dans l'état VBNC par rapport à l'état cultivable (194).

Les bactéries *Listeria monocytogenes* à l'état VBNC expriment le gène de l'hémolysine *hly*, qui code pour un facteur de virulence important pour cette bactérie (la listeriolysine O). Cependant, ces bactéries semblent être moins virulentes que des bactéries cultivables, puisque leur injection à des souris n'a pas entraîné de colonisation de la rate ni de mortalité. Des expériences dans des lignées cellulaires humaines ont aussi suggéré que *L. monocytogenes* à l'état VBNC n'adhère pas aux cellules (195).

II.6 Impact de l'état VBNC sur la résistance aux antibiotiques des bactéries

Malheureusement les données sur la sensibilité aux antibiotiques des bactéries à l'état VBNC sont encore peu nombreuses. Cet état permet à l'espèce bactérienne de persister lors de stress environnementaux. Il est tout à fait possible que les bactéries à l'état VBNC soient moins sensibles aux molécules antibiotiques, notamment aux classes d'antibiotiques agissant sur leur réplication ou sur la traduction protéique.

E. faecalis à l'état VBNC semble plus résistant aux antibiotiques, puisqu'il a fallu une concentration de vancomycine 500 fois supérieure à la CMI pour que l'antibiotique soit efficace sur ces bactéries *in vitro* (164). Une étude transcriptomique chez *E. coli* a observé l'expression transcriptionnelle des gènes de résistances aux antibiotiques à l'état VBNC (192).

Il faut également noter que les bactéries sous la forme VBNC sont aussi probablement enchâssées dans un biofilm qui oppose un mécanisme de résistance physique à la pénétration des antibiotiques, protégeant ainsi les bactéries présentes dans le biofilm. La résistance aux antibiotiques des bactéries à l'état VBNC pourrait être la résultante du biofilm, un effet additionnel ou encore un effet synergique de l'état VBNC et du biofilm. Cela reste encore à démontrer. Les antibiotiques peuvent aussi empêcher la réactivation des bactéries à l'état VBNC, et ainsi faire pression pour maintenir la bactérie sous cet état de résistance (165).

II.7 Réactivation des bactéries à l'état VBNC

Il est possible de réactiver certaines bactéries à l'état VBNC, c'est-à-dire qu'elles retrouvent leurs capacités de croissance. Les mécanismes de réactivation sont encore mal connus, et suscitent aussi des débats. Les paramètres qui induisent la réactivation semblent très divers et dépendent de l'espèce bactérienne. Ils pourraient également dépendre du mode d'induction de l'état VBNC. Les changements qui ont permis la réactivation de certaines espèces sous forme VBNC sont, entre autres :

- un changement de température ;
- un changement de milieu sans changement de température ;
- un passage en milieu riche liquide ;
- une coculture avec des amibes ;
- l'ajout d'enzymes luttant contre le stress oxydant ;
- la mise en contact avec des macrophages (155).

Pour initier le switch des VBNC vers des bactéries cultivables, l'hydrolyse du peptidoglycane par les protéines Rpf (pour resuscitation promoting factor) semble essentielle (196). Initialement décrits chez *Micrococcus luteus*, plusieurs gènes codants des Rpf sont connus chez les bactéries à Gram-positif (197), alors que chez les bactéries à Gram-négatif seul l'hydrolase YeaZ est décrite (198). Chez *M. tuberculosis*, cinq gènes codent pour des protéines Rpf, ils sont activés aux différentes étapes de la réactivation (181,197).

II.8 Impact potentiel de l'état VBNC des bactéries sur la santé publique

Comme nous venons de le détailler, l'état VBNC est une stratégie bactérienne qui semble avoir été mise en place au cours de l'évolution pour résister aux stress et ainsi préserver le patrimoine génétique de l'espèce. Malgré le manque de connaissances concernant le maintien de la virulence de cet état bactérien, l'état VBNC de bactéries habituellement pathogènes pour les humains est un enjeu de santé publique pour plusieurs raisons.

Dans l'industrie agro-alimentaire, les agents pathogènes à l'état VBNC peuvent passer inaperçus aux outils de dépistage classiques utilisant la culture. Sur les surfaces, les bactéries à l'état VBNC, souvent enchâssées dans un biofilm, peuvent résister davantage aux désinfections et échapper également aux outils de détections.

C'est aussi dans l'eau que se pose actuellement le problème des bactéries à l'état VBNC. Elles peuvent persister de longs mois sans être détectées par des techniques de culture et coloniser les réseaux sous forme de biofilms. De cette manière, les agents pathogènes peuvent persister dans l'eau environnementale mais aussi dans les réseaux d'eau destinées à la consommation et aux soins. La résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et la formation de biofilm pourrait rendre la colonisation (presque) pérenne dans certaines situations. Les bactéries à l'état VBNC pourraient ainsi être à l'origine de cas sporadiques ou d'épidémies. Par exemples, *Enterococcus faecalis* a été retrouvé à l'état VBNC dans des espaces aquatiques récréatifs, suite à des pollutions fécales. *Legionella pneumophila* a été retrouvée dans des sources aquatiques à l'état VBNC après des cas de légionellose. Lors d'épidémies de choléra, *Vibrio cholerae* a également été retrouvé à l'état VBNC dans de l'eau contaminée, sans qu'il puisse être déterminé si ces bactéries étaient infectieuses (165). Il paraît évident que les bactéries à l'état VBNC contaminent l'environnement comme les bactéries planctoniques, mais elles sont plus résistantes et passent inaperçues aux outils de détection classiques basés sur la culture, ce qui est un problème majeur de santé publique.

PROBLEMATIQUES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet Tulamibe du laboratoire, financé par un ANR ASTRID [ANR-17-ASTR-0024.]. Ce projet avait pour but de caractériser le cycle de survie aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. L'existence de ce cycle est suggérée depuis les années 1950 (3). Des études *in vitro* et de terrain ont démontré la survie aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Cependant, la durée de cette survie est encore incertaine, et les mécanismes impliqués inconnus. L'hypothèse principale de ce travail est que l'environnement aquatique peut être un réservoir de la bactérie *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Dans ce réservoir, différents facteurs ou acteurs peuvent influencer sur la survie bactérienne, comme l'interaction avec d'autres organismes unicellulaires (amibes), la formation d'un biofilm ou l'état VBNC (2). A ce jour, les études qui ont évalué la survie de *F. tularensis* ssp. *holarctica* en milieu aquatique sans ajout de nutriments ne sont pas satisfaisantes car la survie bactérienne y a été évaluée par la cultivabilité des bactéries. Deux études font exceptions, elles ont suggéré la capacité de *F. tularensis* à passer à l'état VBNC, mais elles ont été réalisées avec des souches modifiées génétiquement (129,137). Les études évaluant la capacité des *Francisella* à former des biofilms ont également été menées uniquement sur la souche atténuée LVS ou sur des espèces environnementales (126).

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de définir précisément les conditions optimales de survie prolongée de l'espèce virulente *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'environnements aquatique, et de mieux caractériser les mécanismes de persistance aquatique. Nous souhaitions également tester notre capacité à détecter *F. tularensis* et les autres espèces de *Francisella* dans un environnement hydrotellurique naturel. Cette partie expérimentale du travail de thèse présente trois parties :

Premièrement, nous avons exploré la présence de *F. tularensis* ssp. *holarctica* en France dans des environnements aquatiques naturels. Nous avons mené deux études de terrain dans l'Ouest de la France pour prélever des échantillons d'eau environnementaux. Nous avons ensuite recherché l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et des autres *Francisella* dans ces prélèvements grâce à des outils de détection moléculaire.

Deuxièmement, j'ai construit des modèles de survie *in vitro* afin d'évaluer la cultivabilité et la viabilité à long-terme de cette bactérie dans l'eau. L'objectif de ce travail était d'évaluer la durée de survie de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'eau sans ajout de nutriments, à différentes températures et concentrations en NaCl. L'état de dormance VBNC a ainsi été identifié comme l'un des mécanismes de persistance aquatique de la bactérie.

Troisièmement, nous avons réalisé une analyse protéomique des bactéries à l'état VBNC. Cette analyse a été réalisée sur des bactéries à l'état VBNC obtenues dans un modèle de survie dans l'eau sans ajout de nutriments. Elle avait pour but d'identifier les modifications protéiques spécifiques de cet état de persistance.

RESULTATS

I. Etudes de terrain : Recherche d'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'environnement en France

I.1 Introduction

En 2018, l'année où a commencé ce travail de thèse, une hausse du nombre de cas de tularémie a été observée en France (107). Grâce à Santé Publique France et à l'activité du CNR des *Francisella* du CHU Grenoble Alpes, nous avons eu accès aux données concernant les cas de tularémie en France. Ainsi, cette année-là, l'Ouest du pays a été particulièrement touché, sans identification d'un facteur de risque d'exposition particulier. Alors que des travaux sur la survie aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* commençaient au laboratoire, nous nous sommes demandé si ces cas de tularémie pouvaient être reliés à des contaminations hydriques. De plus, une augmentation des formes pulmonaires a été recensée. Elles représentaient 21% des cas de tularémie contre environ 10% habituellement et leur nombre a été multiplié par 4 dans l'Ouest (107). Sachant que la forme de tularémie dépend du point d'entrée des bactéries, les formes pulmonaires sont majoritairement provoquées par l'inhalation d'aérosols. Comme ces derniers peuvent se former dans l'environnement aquatique, une origine environnementale des cas de tularémie était suspectée.

Quelques études de terrain pour rechercher des *Francisella* dans l'environnement ont déjà été réalisées en Europe (détaillées au paragraphe I.7.3) notamment lors d'épidémies de tularémie, mais jamais en France. Sur le modèle de ces études, nous avons réalisé deux campagnes de prélèvements en juillet 2019 et en janvier 2020 dans la région Pays de la Loire en France. Nous avons prélevé entre 2 et 4 litres d'eau dans divers lieux aquatiques (lacs, rivières, étangs, barrages, océans, marais), proches des communes de résidence des patients ayant contracté la tularémie dans l'Ouest de la France, en 2018. Cela nous a permis de prélever de l'eau de mer, de l'eau saumâtre et de l'eau douce. La présence de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et plus généralement des espèces du genre *Francisella*, a été recherchée, dans ces échantillons d'eau environnementaux, de retour au laboratoire grâce aux outils moléculaires.

Sur l'ensemble des 87 prélèvements réalisés, nous avons identifié huit fois (9,2%) l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'environnement. Ces résultats corréleront avec les études menées en Europe ces dernières années. Bien que la détection d'ADN de l'agent de la

tularémie dans un même lieu à deux moments distincts de l'année ne soit pas une preuve de présence des bactéries vivantes, ces résultats sont en adéquation avec notre hypothèse de persistance environnementale de *F. tularensis* ssp. *holarctica*.

I.2 Publication

I.2.1 Manuscrit

Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the Aquatic Environment in France.

Camille D. Brunet*, Aurélie Hennebique*, Julien Peyroux, Isabelle Pelloux, Yvan Caspar, Max Maurin

Publiée dans la revue Microorganisms, en 2021



Article

Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the Aquatic Environment in France

Camille D. Brunet ^{1,†}, Aurélie Hennebique ^{1,2,†}, Julien Peyroux ¹, Isabelle Pelloux ², Yvan Caspar ^{1,2} and Max Maurin ^{1,2,*}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, Université Grenoble Alpes, TIMC, UMR5525, 38000 Grenoble, France; camille.brunet@univ-grenoble-alpes.fr (C.D.B.); ahennebique@chu-grenoble.fr (A.H.); julien.peyroux@univ-grenoble-alpes.fr (J.P.); YCaspar@chu-grenoble.fr (Y.C.)

² Centre National de Référence des Francisella, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; ipelloux@chu-grenoble.fr

* Correspondence: mmaurin@chu-grenoble.fr

† Contributed equally to this work. Author order was determined alphabetically.

Abstract: In 2018, the incidence of tularemia increased twofold in the west of France, with many pneumonic forms, suggesting environmental sources of infection. We investigated the presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* and other *Francisella* species DNA in the natural aquatic environment of this geographic area. Two sampling campaigns, in July 2019 and January 2020, allowed the collection of 87 water samples. Using a combination of real-time PCR assays, we tested the presence of either *Francisella* sp., *F. tularensis*/F. *novicida*, and *F. tularensis* subsp. *holarctica*, the latter being the only tularemia agent in Europe. Among 57 water samples of the first campaign, 15 (26.3%) were positive for *Francisella* sp., nine (15.8%) for *F. tularensis* and/or *F. novicida*, and four (7.0%) for *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Ratios were 25/30 (83.3%), 24/30 (80.0%), and 4/30 (13.3%) for the second campaign. Among the thirty sites sampled during the two campaigns, nine were positive both times for *Francisella* sp., seven for *F. tularensis* and/or *F. novicida*, and one for *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Altogether, our study reveals a high prevalence of *Francisella* sp. DNA (including the tularemia agent) in the studied aquatic environment. This aquatic environment could therefore participate in the endemicity of tularemia in the west of France.

Citation: Brunet, C.D.; Hennebique, A.; Peyroux, J.; Pelloux, I.; Caspar, Y.; Maurin, M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the Aquatic Environment in France. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1398. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071398>

Academic Editor: Ulrich (Uli) Stingl

Received: 8 June 2021

Accepted: 25 June 2021

Published: 28 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Tularemia; *Francisella tularensis*; zoonosis; water; France; environment and public health

1. Introduction

Francisella tularensis is a Gram-negative bacterium that causes the zoonosis tularemia. It is a highly virulent human pathogen classified in category A of potential agents of biological threat by the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [1]. Classically, four subspecies of *F. tularensis* are recognized. Only two are associated with human tularemia: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) is the most virulent, only present in North America; and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) is less virulent, and located in all the northern hemisphere and Australia [2,3]. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* is restricted to central Asia and Russia, and has never been associated with human infections [4]. *F. tularensis* subsp. *novicida*, is an aquatic bacterium with low virulence in humans [5] and can also be considered a different species, *F. novicida* [6,7]. Based on the most recent phylogenetic studies, we choose in the article to consider *F. novicida* as a species [8]. Other *Francisella* species are occasionally associated with human infections, like the aquatic bacterium *F. philomiragia* [5]. In the past twenty years, multiple new environmental *Francisella* species were described, all of them isolated from water or from aquatic fauna [8].

Six major clinical forms of tularemia are recognized depending on the mode of contamination. The most frequent are the ulceroglandular and glandular forms, corresponding to a regional lymphadenopathy, with or without a skin inoculation lesion. The oculoglandular and oropharyngeal forms correspond to regional lymphadenopathy with conjunctivitis or pharyngitis, respectively. Two systemic forms, which may be associated with fatality rates up to 30%, are recognized: the pneumonic form and the typhoidal form, with severe sepsis resembling typhoid [9]. The primary sources of human infections are wild-life animals (especially lagomorphs and small rodents) and arthropods (ticks, mosquitoes, and rarely biting flies) [9]. Infections through contact with a contaminated hydro-telluric environment are still poorly defined [9]. However, tularemia can also be a waterborne infection occurring after aquatic activities (e.g., fishing, swimming, and canyoning) or through drinking *F. tularensis*-contaminated water [5]. Several modes of *Francisella* survival in water are presumed: survival in a planktonic form; through interactions with amoebae; in mosquito larvae; or in biofilms [5].

Several studies have reported the detection of *Francisella* sp. in environmental water samples, including in Turkey [10,11], the Netherlands [12], Germany [13], Ukraine [14], Sweden [15], Norway [16], and the USA [17–20]. To our knowledge, no similar study has been previously conducted in France.

In 2018, tularemia incidence increased twofold in France, with 21% of pneumonic cases, while this clinical form usually represents less than 10% of reported tularemia cases (data from santepubliquefrance.fr). Seventy-nine out of 113 patients with a known address lived in the west of France, especially in Pays de la Loire, Bretagne, and the north of Nouvelle Aquitaine. These infections were sporadic and spread over 65,000 km² areas. Although most of the patients were farmers, their modes of infection were not identified (data from santepubliquefrance.fr). In 2019 and 2020, we carried out a study on the presence of *F. tularensis* DNA in natural aquatic environments located in the Pays de la Loire region. Our goal was to demonstrate that surface waters could represent a reservoir of this bacterium in France and a potential source of human infections.

1. Materials and Methods

1.1. Sample Collection and DNA Extraction

Environmental water samples (2 to 4 L) were collected in the Pays de la Loire region in natural aquatic sites in the areas where most tularemia cases had occurred. Fifty-seven water samples were collected in July 2019 (Figure S1). A second field study was carried out in the same geographic areas in January 2020, during which 30 water samples were collected, including 12 from previously *Francisella* PCR-positive sites, and 18 from negative sites (Figure S2). A wide diversity of water sites was sampled: ocean, rivulets, rivers, canals, ponds, lakes, and dams (see results for more details). For each sampling site, the GPS coordinates, temperature, and salinity of the collected water samples were recorded. These samples were transferred to our laboratory within two days and stored at 4 °C before testing. For PCR experiments, filtration of one liter of each water sample was performed using 0.22 µm or 0.45 µm pore size filters (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) depending on turbidity. Total DNA was then extracted from the filters using the Nuclomag DNA/RNA water kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

1.2. *Francisella* Species Detection

To identify *Francisella*-positive samples and characterize the species or subspecies present, we used three real-time PCR (qPCR) assays, employed for *Francisella* identification or tularemia diagnosis. These assays allowed detection of respectively *Francisella* sp. (ISFtu2-qPCR); *F. tularensis* (i.e., *F. tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *holarctica*, and subsp. *mediasiatica*) and *F. novicida* (Tul4-qPCR); and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B-qPCR) (Table 1). Each PCR mixture (20 µL) contained 10 µL of TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.4 µL of each 10 µM primers,

0.4 µL of 2µM probe, 3.8 µL of water, and 5 µL of 10 ng/µL diluted DNA. The thermocycling program was the same for the three qPCR tests: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min, 45 cycles at 95 °C for 3 sec, and 60 °C for 30 sec, using the Ligthcycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). All qPCR tests were performed in duplicate. The qPCRs were considered positive for a specific sample if the two duplicate tests were positive, with a cycle threshold (C_t) value ≤ 36 for ISFtu2-qPCR, and < 40 for Tul4- and Type B-qPCR tests. In the case of inconsistent results within the duplicate for a sample, this sample was tested a third time to conclude Controls were carried out using DNA extracts from strains (*Serratia marcescens* CIP 103551, *Streptococcus equi* ATCC 43079, *F. philomiragia* ATCC 25015, *F. noatunensis* LMG 23800, *F. novicida* U112, clinical strain Ft92 of *F. tularensis* subsp. *holarctica*), and with DNA extracts from *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS NCTC 10857-spiked water samples at concentrations ranging from 0.1 to 10,000 CFU/l (Table 2). Our *F. tularensis* collection has been approved by the Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de santé (France) (ANSM, authorization number ADE-103892019-7).

Table 1. Primers and probes used for *Francisella* sp. and *Acanthamoeba* sp. detection.

qPCR (Target)	Primers/Probes	5' to 3' DNA Sequence	Amplicon Size	Species Detected	Reference
ISFtu2-qPCR (ISFtu2 insertion sequence element)	Forward	ttggtagatcagttggtgggataac	97 bp	<i>Francisella</i> sp.	[22]
	Reverse	tgagttttaccttctgacaacaatatttc			
	Probe	FAM-aaatccatgctatgactgatgcttttaggtaatcca-BHQ1			
	Forward	attacaatggcaggctccaga			
Tul4-qPCR (tul4 gene)	Reverse	tgcccaagttttatcgttcttct	91 bp	<i>F. tularensis</i> and <i>F. novicida</i>	[22]
	Probe	FAM-ttctaagtgccatgatacaagctccaattactaag-BHQ1			
Type B-qPCR (junction between ISFtu2 and a specific flanking 3' region)	Forward	ctgtacttttatttggtactgagaaact	144 bp	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	[23]
	Reverse	cttgcttggttgtaaatatagtggaa			
		FAM-acctagttcaacc*t*caagacttttagtaatgggaatgtca-			
	Probe	BHQ1 Internal quencher			
Acanth-qPCR (<i>Acanthamoeba</i> sp. 18 S rDNA)	Forward	cccagatcggtttaccgtgaa	180 bp	<i>Acanthamoeba</i> sp.	[21]
	Reverse	taaatattaatgcccccaactatcc			
	Probe	FAM-ctgccaccgaatacattagcatgg-BHQ1			

Table 2. The qPCR control results.

DNA Extracts	ISFtu2-qPCR (C _t)	Tul4-qPCR (C _t)	Type B-qPCR (C _t)
<i>Serratia marcescens</i> CIP 103551 *	37	Negative	Negative
<i>Streptococcus equi</i> ATCC 43079 *	37	Negative	Negative
<i>F. noatunensis</i> LMG 23800 *	36	Negative	Negative
<i>F. philomiragia</i> ATCC 25015 *	36	Negative	Negative
<i>F. novicida</i> U112 *	12	16	Negative
Clinical strain Ft92 of <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> *	12	15	16
LVS-spiked water 0.1 CFU/l	38	Negative	Negative
LVS-spiked water 1 CFU/l	36	Negative	Negative
LVS-spiked water 10 CFU/l	36	37	Negative
LVS-spiked water 100 CFU/l	34	38	38
LVS-spiked water 1000 CFU/l	27	33	33
LVS-spiked water 10,000 CFU/l	25	30	30

* 50 ng of DNA introduced in the PCR mix.

1.1. Amebae Detection

Acanthamoeba sp. DNA was detected using a qPCR (Acanth-qPCR) targeting a 180 bp fragment of the 18 S rDNA, as previously described [21] (Table 1). Each PCR mixture (20

μL) contained 10 μL of TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.4 μL of each 10 μM primers, 0.4 μL of 2 μM probe, 3.8 μL of water, and 5 μL of 10 ng/μL diluted DNA. The qPCR settings were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 sec, 55 °C for 30 sec, and 60 °C for 30 sec, on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Each water sample was tested in duplicate or triplicate for inconsistent results. Water samples were considered positive for *Acanthamoeba* sp. if the two duplicate tests were positive with a C_t value < 40.

1.1. Statistical Analysis

Mann–Whitney and Khi2 tests were used to compare the influence of temperature and the presence of *Acanthamoeba* sp. on *Francisella* sp. detection, using a significance level of 0.05. Statistical analyses were not carried out on the second campaign because the sampling sites were chosen according to the first campaign results, introducing a bias.

2. Results

2.1. qPCR Controls

Regarding the bacterial strains' controls, the ISFtu2-qPCR gave a strongly positive signal for *F. tularensis* subsp. *holarctica* and *F. novicida*. A weaker signal (C_t of 36) was obtained for *F. noatunensis* and *F. philomiragia*. However, non-*Francisella* strains tested also gave a weak amplification signal ($C_t > 36$) that was abolished when testing lower DNA concentrations (data not shown). Indeed, we choose to consider ISFtu2-qPCR as positive when C_t was inferior or equal to 36. Tul4-qPCR gave a strong positive signal for *F. tularensis* subsp. *holarctica* and *F. novicida* and was negative for all the other strains tested. Finally, Type B-qPCR was only positive for *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Regarding the *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS NCTC 10857-spiked water samples, when applying our defined thresholds, the sensitivity of our qPCR-assay was of 1 CFU/l for ISFtu2-qPCR, 10 CFU/l for Tul4-qPCR and 100 CFU/l for Type B-qPCR. The qPCR controls results are presented in Table 2.

2.2. First Field Study

Regarding the first field study, 57 water samples were collected: one from the ocean, two from canals near the ocean, one from a river near the ocean, one from a pond near the ocean, 30 from ponds, 12 from rivers (some of them were sampled at several points), two from rivulets, three from lakes, three from dams, and two from canals. Fifteen (26.3%) out of 57 collected water samples were positive for ISFtu2-qPCR, indicating the presence of *Francisella* sp. at the corresponding sampling sites. Among the 15 samples positive for ISFtu2-qPCR, nine were also positive for Tul4-qPCR, indicating the presence of *F. tularensis*, or *F. novicida*, or both. Four samples were positive for the three qPCR tests, including Type B-qPCR, confirming the presence of *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Figure 1 and Figure S1). One river was found contaminated at two sampling sites. Characteristics of the positive water samples are presented in Table S1. None of the ISFtu2-qPCR negative samples gave an amplification signal with the Tul4- or Type B-qPCR tests.

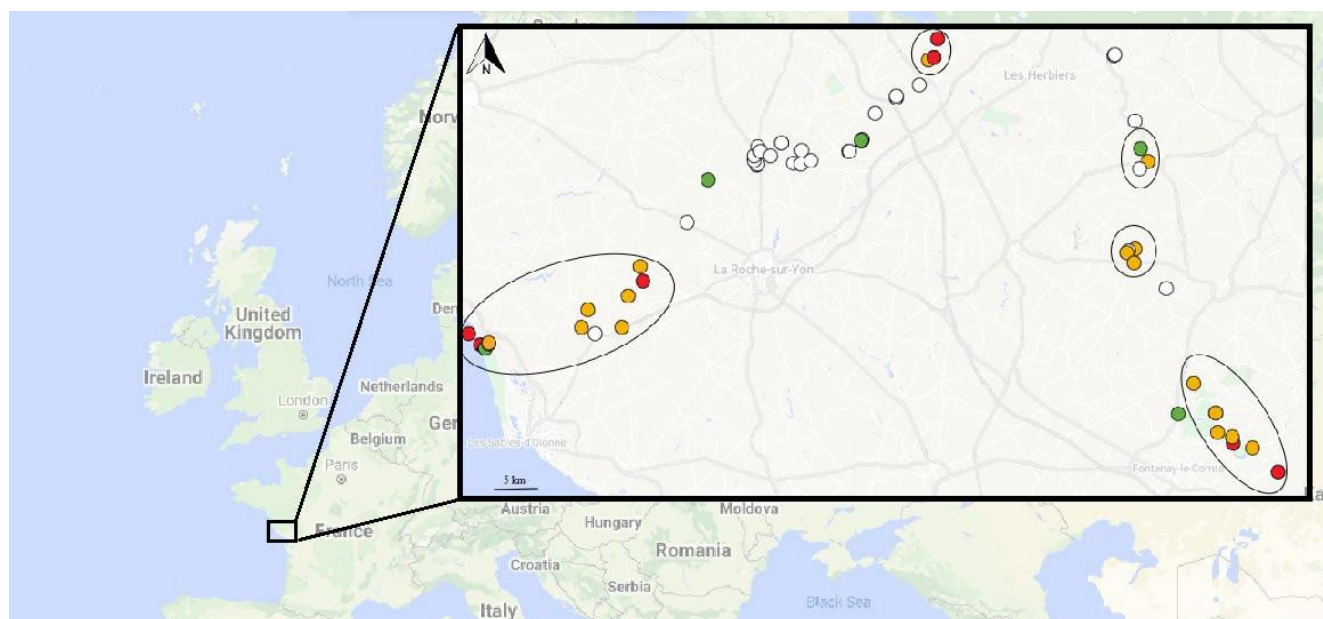


Figure 1. *Francisella* sp. detection in surface water samples collected during both campaigns. For each site, DNA was extracted from water, and three q-PCR tests were performed: ISFtu2-qPCR for *Francisella* sp., Tul4-qPCR for *F. tularensis*/*F. novicida*, and Type B-qPCR for *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Circle: water sampling site. White circle: sample with no positive qPCR. Green circle: sample with positive ISFtu2-qPCR in the first campaign, or the second campaign, or both, and negative Tul4 and Type B-qPCR. Orange circle: sample with positive ISFtu2 and Tul4-qPCR in the first campaign, or the second campaign, or both, and negative Type B-qPCR. Red circle: sample with positive ISFtu2, Tul4, and Type B-qPCR in the first campaign, or the second campaign, or both. Disks indicate sites where water samples were collected during the two campaigns.

Salinity was evaluated for 12 of the 15 ISFtu2-qPCR-positive samples and ranged from 1 g/L to 38 g/L. Indeed, the ISFtu2-qPCR-positive samples corresponded either to saltwater (three samples), brackish water (one sample), or freshwater (eight samples). Salinity was evaluated for 19 of the 42 ISFtu2-qPCR-negative samples and ranged from 1 g/L to 46 g/L. The impact of salinity on *Francisella* sp. detection could not be evaluated due to too few salt- and brackish water samples. The water temperature of the 15 ISFtu2-qPCR-positive samples ranged from 18.2 °C to 27.8 °C, and that of the 42 ISFtu2-qPCR-negative samples from 16.2 °C to 29.9 °C. There was no significant difference between the average temperature of ISFtu2-qPCR-positive and -negative samples ($p = 0.809$). *Acanthamoeba* sp. DNA was detected in 38 (67.9%) of the 56 tested surface water samples. For these samples, seven (18.4%) were positive for ISFtu2-qPCR, and 31 (81.6%) were negative. For the 18 *Acanthamoeba*-negative samples, seven (38.9%) were positive for ISFtu2-qPCR, and 11 (61.1%) were negative. There was no significant correlation between the distribution of positive or negative samples for ISFtu2-qPCR and *Acanthamoeba*'s presence or absence ($p = 0.063$).

1.1. Second Field Study

Regarding the second field study that was conducted mainly around the locations that were positives during the first field study, the ISFtu2-qPCR was positive for 25/30 (83.3%) samples, the Tul4-qPCR for 24/30 (80.0%), and the Type B-qPCR for 4/30 (13.3%) (Figure 1 and Figure S2). Two rivers were found contaminated at three or more sampling sites. Here again, none of the ISFtu2-qPCR negative samples gave an amplification signal with the Tul4- or Type B-qPCR tests. The salinity ranged from 1 g/L to 12 g/L for the 25 ISFtu2-qPCR-positive samples, and 1 g/L to 31 g/L for the five ISFtu2-qPCR-negative samples. The temperature ranged from 7.0 °C to 13.6 °C for the 25 ISFtu2-qPCR-positive samples and 6.6 °C to 13.2 °C for the five ISFtu2-qPCR-negative samples. Finally, 29/30 (96.7%)

water samples collected during this second campaign were positive for *Acanthamoeba* sp. PCR.

Of the 12 sites that were ISFtu2-qPCR positive during the first water sampling campaign, and re-sampled during the second campaign, nine were still positive for this qPCR test, suggesting the persistence of *Francisella* sp. DNA over time, or a regular recontamination of the environment, or both. For the Tul4-qPCR, seven of the nine previously positive sites were still positive during the second campaign. Finally, of the four sites determined as Type B-qPCR positive during the first water sampling campaign, one remained positive.

Furthermore, among the 18 water samples that were negative for the ISFtu2-qPCR test during the first campaign, 16 tested positive for this PCR during the second campaign. Of these 16 samples, 15 also tested positive for Tul4-qPCR, and two for both Tul4- and Type B-qPCRs. Characteristics of the positive water samples are presented in Table S1.

1. Discussion

A significant increase in tularemia cases was experienced in 2018 in France. A doubling of the disease incidence was observed in the western part of the country compared to previous years. Because of the rise in the pneumonic forms of the disease (21% of cases in 2018 vs. 10% in previous years), inhalation of *F. tularensis*-contaminated aerosols could be suspected as one of the significant sources of human infections. As these pneumonic tularemia cases occurred throughout the whole year, the long-term environmental reservoir of this bacterium was hypothesized.

This study aimed to assess the prevalence and the spatial and temporal distribution of *F. tularensis* in surface waters. For this purpose, two sampling campaigns were performed six months apart, in July 2019 and January 2020, to collect natural environmental water sources in the geographic area where most tularemia cases occurred.

A dozen studies have evaluated the presence of *Francisella* sp. in aquatic environments [10–20]. The previous studies on environmental water samples mainly detected *F. philomiragia* or *F. novicida* [16–20], which are well-known aquatic bacteria [5]. Few environmental studies identified *F. tularensis* in water samples [10–15]. Most of these previous studies performed on environmental water samples relied on PCR assays [10–13,15–17,19], while few studies used culture methods [10,14,18–20]. Isolation of *F. tularensis* from environmental water samples has been only rarely reported [10,14]. Environmental surface water samples are contaminated by a wide diversity of bacteria that grow faster than the fastidious *Francisella*, thus preventing the latter's isolation. Consequently, we did not try to culture our water samples, although it would have been interesting to correlate the PCR and culture results. PCR-based methods seem more suitable for detecting *Francisella* in environmental samples. However, a wide diversity of *Francisella* species is present in the environment, including many water species (e.g., *F. ulginis*, *F. salminarina*, *F. salina*), fish- and mollusc-associated species (e.g., *F. noatunensis*, *F. orientalis*, *F. haliotida*, *F. marina*), and endocytobionts of marine ciliates (e.g., *F. endociliophora* and *F. adeliensis*) [8]. Consequently, the choice of PCR targets is critical for the nature of *Francisella* species identified. Thus, we performed a set of three real-time PCR tests allowing us to discriminate between *Francisella* species and subspecies. The ISFtu2-qPCR assay targets the insertion element-like sequence ISFtu2, which is present in multiple copies in the *F. tularensis* (i.e., *F. tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *holarctica* and subsp. *mediastitica*) and the *F. novicida* genome (i.e., there are 12–17 copies for subsp. *tularensis*, 26–30 copies for subsp. *holarctica*, and 6–18 copies for *F. novicida*) and thus improves the sensibility of the qPCR. This DNA target is present in other *Francisella* species (i.e., there are 1–2 copies of ISFtu2 in the *F. philomiragia* genome) [8,22]. Consequently, qPCR results from the PCR targeting the ISFtu2 sequence should be interpreted cautiously because it could detect a wide diversity of *Francisella* species. This was observed with our ISFtu2-qPCR controls, which demonstrated both detection of *F. philomiragia* and *F. noatunensis*. Öhrman *et al.*, by in silico approaches, demonstrated that ISFtu2-qPCR can detect *F. novicida* and *F. philomiragia* but

does not detect other *Francisella* species such as *F. opportunistica* and *Francisella* endocytobionts [8]. Consequently, the ISFtu2-qPCR is a *Francisella* sp. PCR with the limitation that not all the described *Francisella* species are detected. The Tul4-qPCR assay targets a simple copy gene, which can be found in *F. tularensis* and in *F. novicida* [22]. Although our Tul4-qPCR controls and those of Versage et al. [22] concluded that *F. philomiragia* and other *Francisella* near neighbors were not amplified by this assay, Öhrman et al., by in silico approaches found that *F. philomiragia* can occasionally be amplified by the Tul4-qPCR [8]. Finally, the Type B-qPCR test targets a specific junction between ISFtu2 and a flanking 3' region, which is only found in *F. tularensis* subsp. *holarctica* [23], the only tularemia agent found in Europe [9]. Thus, our multi-step PCR approach, using ISFtu2-, Tul4- and Type B-qPCR, allowed reliable detection of respectively *Francisella* sp., *F. tularensis*/*F. novicida*, and *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Regarding the first collection campaign, 26.3% of samples were positive only for ISFtu2-qPCR, 15.8% for ISFtu2- and Tul4-qPCR, and 7.0% for ISFtu2-, Tul4-, and Type B-qPCR. To be as stringent as possible, these samples were classified as containing *Francisella* sp., *F. tularensis* and/or *F. novicida*, or *F. tularensis* subsp. *holarctica*, respectively. Because the qPCR targeting the multi-copy ISFtu2 sequence is more sensitive than the two other qPCR tests, samples with only a positive ISFtu2-qPCR could also correspond to *F. tularensis* or even *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Therefore, a 7% prevalence of water samples contaminated with *F. tularensis* subsp. *holarctica* should be considered a minimum in this study. The effect of salinity on *Francisella* sp. detection could not be evaluated because of too few salt- and brackish water samples being included. However, *Francisella* sp. were detected in fresh-, brackish-, and saltwater, indicating that these bacteria could contaminate a wide water-type diversity. Similarly, in the Netherlands, Janse et al. identified *Francisella* sp. in fresh-, brackish- and saltwater samples [12]. Interestingly, in Norway, Duodu et al. found *Francisella* sp. in 44 seawater samples, while all 128 freshwater samples were free of *Francisella* sp. [16]. In our study, no significant difference in water temperature was observed between *Francisella* sp.-positive and -negative samples. In Norway, Duodu et al. also observed that water temperature had no effect on *Francisella* sp. presence in water, but they only found *Francisella* sp.-positive samples south of the Arctic Circle, suggesting that climate could have an impact on *Francisella* sp. presence in the aquatic environment [16].

The second collection campaign aimed to assess the possible persistence of *Francisella* sp. in previously investigated aquatic sites. Therefore, 30 of the previously collected sites were resampled, including 12 that were positive for *Francisella* sp. and 18 that were negative but located close to positive sampling points. Among the 12 samples positive for ISFtu2-qPCR during the first campaign, nine (75.0%) were still positive during the second campaign. As for the Tul4- and Type B-qPCR, 7/9 and 1/4 of the previously positive sites were still positive during the second campaign. Thus, one water sample was positive for the tularemia agent *F. tularensis* subsp. *holarctica* both in July 2019 and in January 2020. These results indicate either the persistence of *Francisella* sp. in the corresponding surface-water sites for several months, or repeated contamination over time of these aquatic environments, or both. Each of these situations corresponds to a high risk of occurrence of human contamination from these aquatic reservoirs. Interestingly, 16/18 (88.9%) of the previously *Francisella* sp.-negative sites were ISFtu2-qPCR-positive during the second campaign, arguing that *Francisella* sp. contamination of the aquatic environment can be variable in time and space, and might spread over time. These observed variations impel that repeated sampling is required for *Francisella* environmental monitoring. Overall, these results highlight that *Francisella* sp. contamination of the water environment is recurrent whatever the season.

In total, there was respectively 26.3% and 83.3% of ISFtu2-qPCR-positive samples in the first collection campaign and the second collection campaign. These percentages of ISFtu2-qPCR-positive samples are high and indicate that *Francisella* sp. contamination of the environment is widespread. Janse et al. previously described in the Netherlands that

88% of water samples were positive for *Francisella* sp. in areas with reported tularemia cases, and 10% in randomly collected sites [12]. Broman *et al.*, in Sweden, collected 341 fresh surface water samples during three years and found 108 (32%) samples positives for *F. tularensis* [15]. In contrast, other studies reported a lower prevalence of *Francisella* sp. in the environment. Kaysser *et al.* in Germany sampled 28 freshwater sites and found one (4%) PCR-positive sample [13]. Simşek *et al.* collected 154 water samples from rivers, spring water, and village fountains after tularemia outbreaks in Turkey, and detected *F. tularensis* subsp. *holarctica* by culture in four samples and by PCR in 17 (11%) samples [10]. However, it would have been interesting to include in this study samples from a control location with lower tularemia incidence in order to compare frequency of contamination by *F. tularensis* DNA.

Altogether, our study in the West of France demonstrates that the presence of *F. tularensis* subsp. *holarctica* DNA in surface waters is frequent and may be recurrent in areas close to human tularemia cases. Although the presence of *F. tularensis* DNA in surface water samples is not evidence of human contamination, the presence of this bacterium over a wide range of time and space could favour the occurrence of human infections in the corresponding geographic area. Indeed, the high number of pneumonic tularemia cases in 2018 suggested an environmental mode of contamination. Although aerosol inhalation from contaminated soil is considered the primary source of pneumonic tularemia [24,25], we hypothesize that the persistence of *F. tularensis* in the aquatic environment could explain some of these tularemia cases [5]. Waterborne tularemia cases classically occur through drinking contaminated water or direct contact with contaminated water sources, especially during recreational activities such as fishing and swimming [5]. However, contact or consumption of contaminated water usually leads to skin or oropharyngeal inoculation of *F. tularensis*; thus, ulceroglandular or oropharyngeal forms of tularemia emerge. We hypothesize another water-related human contamination leading to the disease's pulmonary form through aerosols formed from contaminated surface water. Indeed, the 2018 tularemia cases occurred in areas with extensive agricultural activities, and most patients were farmers. We noted that most of the crop fields of the studied areas were irrigated by sprinklers using surface waters, which could generate large aerosols.

The widespread detection of the tularemia agent *F. tularensis* subsp. *holarctica* in surface water raises the question of how this bacterium can survive and persist in such aquatic environments and why it does not infect thousands of people, according to the high virulence of this bacterium. Experimental studies have shown that *F. tularensis* can survive in water microcosms for months [26–29], firstly in a culturable form and then in a potentially viable but nonculturable form (VBNC) [26,28]. Long-term planktonic forms of *F. tularensis* subsp. *holarctica* have been found to be still virulent in mice, whereas similar forms of *F. tularensis* subsp. *tularensis* did not [29]. VBNC forms of *F. tularensis* subsp. *holarctica* appeared to be no longer virulent in mice [28]. This possible loss of virulence over time in aquatic environments could explain the relatively low number of tularemia cases related to aquatic habitats in endemic areas compared to the virulence of the bacteria in its virulent state. In our study, the DNA detection of the tularemia agent does not allow us to determine the detected bacteria's infectivity. Several in vitro experimental studies have shown that *F. tularensis* can survive in water through interaction with amoebae [30–33]. *Acanthamoeba* species were especially shown to promote *Francisella* sp. survival in water and are ubiquitous environmental amoebae [34] that is why we researched DNA from *Acanthamoeba* in our water samples. We detected DNA from *Acanthamoeba* sp. in 38/56 (67.9%) of the water samples of the first collection campaign, and 29/30 (96.7%) of the water samples of the second collection campaign. However, no correlation was found between the presence of *Acanthamoeba* and *Francisella* DNA in water samples. There are conflicting studies about the capacity of *F. tularensis* to produce biofilms to survive in water [29,35]. Finally, this bacterium was shown to be able to survive within mosquito larvae [36]. While the tularemia agent aquatic cycle is not yet fully characterized, our work

demonstrates that *F. tularensis* subsp. *holarctica* DNA can be found in the aquatic environment.

In conclusion, our study demonstrates, for the first time, the presence of *F. tularensis* subsp. *holarctica* DNA in surface water in France. Although contaminated water as a source of pneumonic forms of human tularemia remains to be firmly established, the monitoring of *F. tularensis* contamination of surface water should be considered for public health surveillance of tularemia.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9071398/s1, Figure S1: *Francisella* sp. detection in surface water samples collected during July 2019; Figure S2: *Francisella* sp. detection in surface water samples collected during January 2020; Table S1: Characteristics of *Francisella* sp.-positive water samples.

Author Contributions: C.D.B. and A.H. conceived the idea, collected samples, realized experiences and wrote the manuscript. J.P. collected samples. I.P. collected tularemia cases data. Y.C. collected tularemia cases data and revised the manuscript. M.M. obtained funding, conceived the idea, collected samples, and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the the Direction Générale de l’Armement of France, grant number ANR-17-ASTR-0024.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

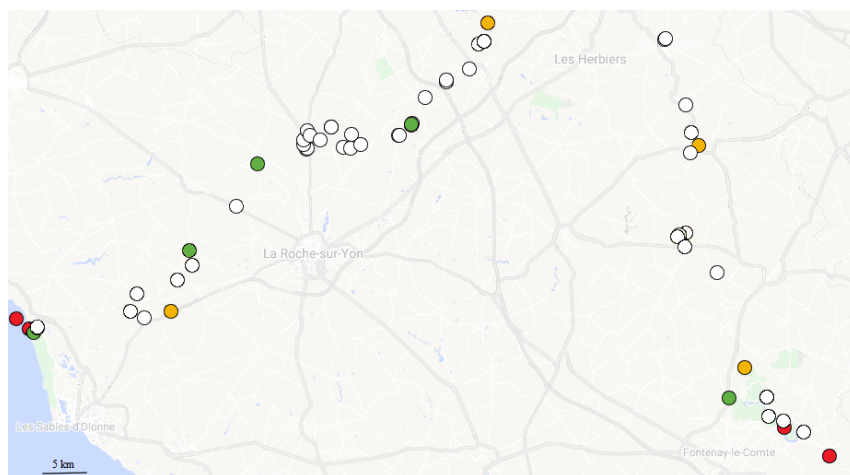
References

- Oyston, P.C.F.; Sjöstedt, A.; Titball, R.W. Tularemia: Bioterrorism Defence Renews Interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 967–978, doi:10.1038/nrmicro1045.
- Sjöstedt, A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1105*, 1–29, doi:10.1196/annals.1409.009.
- Jackson, J.; McGregor, A.; Cooley, L.; Ng, J.; Brown, M.; Ong, C.W.; Darcy, C.; Sintchenko, V. *Francisella tularensis* Subspecies *Holarctica*, Tasmania, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1484–1486, doi:10.3201/eid1809.111856.
- Kuibagarov, M.; Kairzhanova, A.; Vergnaud, G.; Amirgazin, A.; Lukhnova, L.; Izbanova, U.; Ramankulov, Y.; Shevtsov, A. Draft Genome Sequence of the Strain *Francisella tularensis* Subsp. *Mediasiatica* 240, Isolated in Kazakhstan. *Microbiol. Resour. Announc.* **2020**, *9*, doi:10.1128/MRA.00766-20.
- Hennebique, A.; Boisset, S.; Maurin, M. Tularemia as a Waterborne Disease: A Review. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1027–1042, doi:10.1080/22221751.2019.1638734.
- Johansson, A.; Celli, J.; Conlan, W.; Elkins, K.L.; Forsman, M.; Keim, P.S.; Larsson, P.; Manoil, C.; Nano, F.E.; Petersen, J.M.; et al. Objections to the Transfer of *Francisella Novicida* to the Subspecies Rank of *Francisella tularensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 1717–1718; author reply 1718–1720, doi:10.1099/ijs.0.022830-0.
- Busse, H.-J.; Huber, B.; Anda, P.; Escudero, R.; Scholz, H.C.; Seibold, E.; Splettstoesser, W.D.; Kämpfer, P. Objections to the Transfer of *Francisella Novicida* to the Subspecies Rank of *Francisella tularensis*—Response to Johansson et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 1718–1720, doi:10.1099/00207713-60-8-1718.
- Öhrman, C.; Sahl, J.W.; Sjödin, A.; Uneklint, I.; Ballard, R.; Karlsson, L.; McDonough, R.F.; Sundell, D.; Soria, K.; Bäckman, S.; et al. Reorganized Genomic Taxonomy of *Francisellaceae* Enables Design of Robust Environmental PCR Assays for Detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9010146.
- Maurin, M.; Gyuranecz, M. Tularemia: Clinical Aspects in Europe. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 113–124, doi:10.1016/S1473-3099(15)00355-2.
- Simşek, H.; Taner, M.; Karadenizli, A.; Ertek, M.; Vahaboğlu, H. Identification of *Francisella tularensis* by Both Culture and Real-Time TaqMan PCR Methods from Environmental Water Specimens in Outbreak Areas Where Tularemia Cases Were Not Previously Reported. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2012**, *31*, 2353–2357, doi:10.1007/s10096-012-1576-z.
- Kilic, S.; Birdsell, D.N.; Karagöz, A.; Çelebi, B.; Bakkaloglu, Z.; Arikan, M.; Sahl, J.W.; Mitchell, C.; Rivera, A.; Maltinsky, S.; et al. Water as Source of *Francisella tularensis* Infection in Humans, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2213–2216, doi:10.3201/eid2112.150634.
- Janse, I.; van der Plaats, R.Q.J.; de Roda Husman, A.M.; van Passel, M.W.J. Environmental Surveillance of Zoonotic *Francisella tularensis* in the Netherlands. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 140, doi:10.3389/fcimb.2018.00140.
- Kayser, P.; Seibold, E.; Mätz-Rensing, K.; Pfeffer, M.; Essbauer, S.; Splettstoesser, W.D. Re-Emergence of Tularemia in Germany: Presence of *Francisella tularensis* in Different Rodent Species in Endemic Areas. *BMC Infect. Dis.* **2008**, *8*, 157, doi:10.1186/1471-2334-8-157.

- 14 Hightower, J.; Kracalik, I.T.; Vydayko, N.; Goodin, D.; Glass, G.; Blackburn, J.K. Historical Distribution and Host-Vector Diversity of *Francisella tularensis*, the Causative Agent of Tularemia, in Ukraine. *Parasit. Vectors* **2014**, *7*, doi:10.1186/s13071-014-0453-2.
- 15 Broman, T.; Thelaus, J.; Andersson, A.-C.; Bäckman, S.; Wikström, P.; Larsson, E.; Granberg, M.; Karlsson, L.; Bäck, E.; Eliasson, H.; et al. Molecular Detection of Persistent *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Natural Waters. *Int. J. Microbiol.* **2011**, *2011*, doi:10.1155/2011/851946.
- 16 Duodu, S.; Larsson, P.; Sjödin, A.; Forsman, M.; Colquhoun, D.J. The Distribution of *Francisella*-like Bacteria Associated with Coastal Waters in Norway. *Microb. Ecol.* **2012**, *64*, 370–377, doi:10.1007/s00248-012-0023-0.
- 17 Barns, S.M.; Grow, C.C.; Okinaka, R.T.; Keim, P.; Kuske, C.R. Detection of Diverse New *Francisella*-like Bacteria in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5494–5500, doi:10.1128/AEM.71.9.5494-5500.2005.
- 18 Petersen, J.M.; Carlson, J.; Yockey, B.; Pillai, S.; Kuske, C.; Garbalena, G.; Pottumarthy, S.; Chalcraft, L. Direct Isolation of *Francisella* Spp. from Environmental Samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 663–667, doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02589.x.
- 19 Berrada, Z.L.; Telford, S.R. Diversity of *Francisella* Species in Environmental Samples from Martha's Vineyard, Massachusetts. *Microb. Ecol.* **2010**, *59*, 277–283, doi:10.1007/s00248-009-9568-y.
- 20 Whitehouse, C.A.; Kesterson, K.E.; Duncan, D.D.; Eshoo, M.W.; Wolcott, M. Identification and Characterization of *Francisella* Species from Natural Warm Springs in Utah, USA. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *54*, 313–324, doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03214.x.
- 21 Thompson, P.P.; Kowalski, R.P.; Shanks, R.M.Q.; Gordon, Y.J. Validation of Real-Time PCR for Laboratory Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3232–3236, doi:10.1128/JCM.00908-08.
- 22 Versage, J.L.; Severin, D.D.M.; Chu, M.C.; Petersen, J.M. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5492–5499.
- 23 Kugeler, K.J.; Pappert, R.; Zhou, Y.; Petersen, J.M. Real-Time PCR for *Francisella tularensis* Types A and B. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1799–1801, doi:10.3201/eid1211.060629.
- 24 Feldman, K.A.; Matyas, B.T.; Stiles-Enos, D.; Hayes, E.B. An Outbreak of Primary Pneumonic Tularemia on Martha's Vineyard. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 1601–1606.
- 25 Johansson, A.; Lärkeryd, A.; Widerström, M.; Mörtberg, S.; Myrtännäs, K.; Öhrman, C.; Birdsell, D.; Keim, P.; Wagner, D.M.; Forsman, M.; et al. An Outbreak of Respiratory Tularemia Caused by Diverse Clones of *Francisella tularensis*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2014**, *59*, 1546–1553, doi:10.1093/cid/ciu621.
- 26 Gilbert, S.E.; Rose, L.J. Survival and Persistence of Nonspore-Forming Biothreat Agents in Water. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *55*, 189–194, doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03277.x.
- 27 Berrada, Z.L.; Telford, S.R., III. Survival of *Francisella tularensis* Type A in Brackish-Water. *Arch. Microbiol.* **2011**, *193*, 223–226, doi:10.1007/s00203-010-0655-8.
- 28 Forsman, M.; Henningson, E.W.; Larsson, E.; Johansson, T.; Sandström, G. *Francisella tularensis* Does Not Manifest Virulence in Viable but Non-Culturable State. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2000**, *31*, 217–224.
- 29 Golovliov, I.; Bäckman, S.; Granberg, M.; Salomonsson, E.; Lundmark, E.; Näslund, J.; Busch, J.D.; Birdsell, D.; Sahl, J.W.; Wagner, D.M.; et al. Long-Term Survival of Virulent Tularemia Pathogens Outside a Host in Conditions That Mimic Natural Aquatic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, doi:10.1128/AEM.02713-20.
- 30 Abd, H.; Johansson, T.; Golovliov, I.; Sandström, G.; Forsman, M. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 600–606.
- 31 El-Etr, S.H.; Margolis, J.J.; Monack, D.; Robison, R.A.; Cohen, M.; Moore, E.; Rasley, A. *Francisella Tularensis* Type A Strains Cause the Rapid Encystment of *Acanthamoeba Castellanii* and Survive in Amoebal Cysts for Three Weeks Postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7488–7500, doi:10.1128/AEM.01829-09.
- 32 Buse, H.Y.; Schaefer Iii, F.W.; Rice, E.W. Enhanced Survival but Not Amplification of *Francisella* Spp. in the Presence of Free-Living Amoebae. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2017**, *64*, 17–36, doi:10.1556/030.63.2016.015.
- 33 Hennebique, A.; Peyroux, J.; Brunet, C.; Martin, A.; Henry, T.; Knezevic, M.; Santic, M.; Boisset, S.; Maurin, M. Amoebae Can Promote the Survival of *Francisella* Species in the Aquatic Environment. *Emerg. Microbes Infect.* **2021**, *10*, 277–290, doi:10.1080/22221751.2021.1885999.
- 34 Rodríguez-Zaragoza, S. Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, *20*, 225–241, doi:10.3109/10408419409114556.
- 35 Van Hoek, M.L. Biofilms: An Advancement in Our Understanding of *Francisella* Species. *Virulence* **2013**, *4*, 833–846, doi:10.4161/viru.27023.
- 36 Thelaus, J.; Andersson, A.; Broman, T.; Bäckman, S.; Granberg, M.; Karlsson, L.; Kuoppa, K.; Larsson, E.; Lundmark, E.; Lundström, J.O.; et al. *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists through the Developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible during Blood Feeding. *Microb. Ecol.* **2014**, *67*, 96–107, doi:10.1007/s00248-013-0285-1.

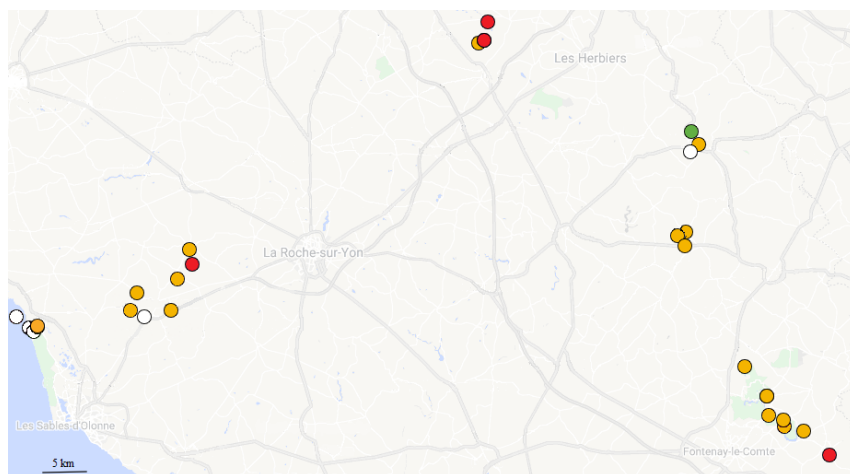
I.2.2 Données supplémentaires

Figure S1. *Francisella* sp. detection in surface water samples collected during July 2019



For each site DNA were extracted from water and three q-PCR were performed (ISFtu2-qPCR for *Francisella* sp., Tul4-qPCR for *F. tularensis*, and Type B-qPCR for *F. tularensis* subsp. *holarctica*). White disk: sample with no positive qPCR. Green disk: sample positive for ISFtu2-qPCR and negative for Tul4 and Type B-qPCR. Orange disk: sample positive for ISFtu2 and Tul4-qPCR and negative for Type B-qPCR. Red disk: sample positive for the three qPCR tests.

Figure S2. *Francisella* sp. detection in surface water samples collected during January 2020



For each site DNA were extracted from water and three q-PCR were performed (ISFtu2-qPCR for *Francisella* sp., Tul4-qPCR for *F. tularensis*, and Type B-qPCR for *F. tularensis* subsp. *holarctica*). White disk: sample with no positive qPCR. Green disk: sample positive for ISFtu2-qPCR and negative for Tul4 and Type B-qPCR. Orange disk: sample positive for ISFtu2 and Tul4-qPCR and negative for Type B-qPCR. Red disk: sample positive for the three qPCR tests.

II. *F. tularensis* ssp. *holarctica* persiste dans l'eau à l'état VBNC

II.1 Introduction

Bien qu'il soit encore mal caractérisé, *F. tularensis* ssp. *holarctica* a un cycle de vie aquatique. Cependant, nous ne savons pas si la survie dans l'eau est un phénomène transitoire, ou si une survie à long-terme est possible (128). Il est important de connaître la capacité de survie environnementale de *F. tularensis*, car en cas de dispersion accidentelle ou volontaire, il sera nécessaire de maîtriser rapidement les composants du potentiel réservoir environnemental de cette bactérie afin de limiter le nombre d'infections humaines et animales. Les études sur la persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'eau ne sont pas satisfaisantes, car elles évaluent la cultivabilité de la bactérie. Elles ont tout de même montré, une cultivabilité de plusieurs semaines dans l'eau, sans ajout de nutriments, à des températures inférieures à 20°C. La persistance des *Francisella* semble accrue dans l'eau saumâtre par rapport à l'eau douce et l'eau de mer (128,149,150). Les études sur la cultivabilité et la viabilité de *F. tularensis* ssp. *holarctica* réalisées avec des souches modifiées génétiquement (125,134) ont suggéré un passage à l'état VBNC qui demande à être confirmé sur des souches virulentes non modifiées.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la capacité de survie de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à long-terme dans l'eau sans ajout de nutriments. Pour cela, j'ai construit des modèles *in vitro* de survie bactérienne dans l'eau. L'eau utilisée provenait d'un lac de la région grenobloise, débarrassée des micro-organismes par filtration et inoculée avec *F. tularensis* ssp. *holarctica*. La persistance bactérienne a été analysée par l'évaluation de la viabilité, grâce à l'amplification de l'ADN des bactéries vivantes du modèle (PCR viabilité). Cette technique, ainsi que l'étalement d'échantillons sur gélose et la numération des colonies ont permis d'évaluer pendant plusieurs semaines la cultivabilité et la viabilité de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, dans l'eau à plusieurs concentrations en NaCl et à plusieurs températures.

Grâce à ces modèles, des mécanismes de survie environnementale de *F. tularensis* ssp. *holarctica* ont été analysés. J'ai ainsi démontré la persistance pendant plusieurs mois d'une souche virulente de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans un état VBNC. J'ai également identifié que la température est un critère important pour la survie de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Le passage à l'état VBNC a été observé à 4°C et 18°C, tandis que les bactéries n'ont pas survécu à 37°C. Bien que l'état VBNC soit un état de résistance aux stress, les bactéries sont restées

sensibles à la température puisque leur passage à 30°C ou 37°C a induit une mort bactérienne en quelques jours.

Ces résultats renforcent l'hypothèse du réservoir aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, et définissent l'état VBNC comme étant possiblement un état majeur de persistance pour cette bactérie dans les environnements aquatiques. Ils nous permettent également d'actualiser le cycle aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*.

II.2 Publication

II.2.1 Manuscrit

Aquatic long-term persistence of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* is driven by water temperature and transition to a viable but non-culturable state

Camille D. Brunet, Julien Peyroux, Léa Pondérand, Stéphanie Bouillot, Thomas Girard, Éric Faudry, Max Maurin, Yvan Caspar

Préprint déposé dans Biorxiv : BIORXIV/2022/480867.

Soumis à Applied and Environmental Microbiology le 10/03/2022.

Aquatic long-term persistence of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* is driven by water temperature and transition to a viable but non-culturable state

Camille D. Brunet¹, Julien Peyroux^{1,2}, Léa Pondérand^{3,4}, Stéphanie Bouillot³, Thomas Girard⁴,
Éric Faudry³, Max Maurin^{1,4}, Yvan Caspar^{3,4*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France.

² Laboratoire d'Informatique de Grenoble, Bâtiment IMAG, 38401 Saint Martin d'Hères

³ Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, 38000 Grenoble, France

⁴ Centre National de Référence des Francisella, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

* Corresponding author:

Dr Yvan Caspar, CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, CS10217, 38043,
15 Grenoble, Cedex 9, France, ycaspar@chu-grenoble.fr

Abstract

Francisella tularensis is a highly virulent bacterium causing tularemia zoonosis. An increasing proportion of infections occur through contaminated hydro-telluric sources, especially for the subspecies *holarctica* (*Fth*). Although this bacterium has been detected in several aquatic environments, the mechanisms of its long-term persistence in water are not yet elucidated. We evaluated the culturability and the viability of a virulent *Fth* strain in independent microcosms filled with nutrient-poor water. At 37°C, the bacteria remained culturable for only one week, while culturability was extended to 6 weeks at 18°C and up to 11 weeks at 4°C. However, while the viability of the bacteria declined similarly to culturability at 37°C, the viability of the bacteria remained stable overtime at 18°C and 4°C for more than 24 months, long after loss of culturability. We identified water temperature as one of the major factors driving the aquatic survival of *Fth* through a transition of the whole *Fth* population in a viable but non-culturable (VBNC) state. Low temperature of water ($\leq 18^{\circ}\text{C}$) favors the persistence of the bacteria in a VBNC state, while a temperature above 30°C kills culturable and VBNC *Fth* bacteria. These findings provide new insights into the environmental cycle of *Francisella tularensis* that suggest that the yet unidentified primary reservoir of the subspecies *holarctica* may be the aquatic environment itself in which the bacteria could persist for months or years without the need for a host.

Keywords

Francisella tularensis, tularemia, viable but non-culturable, dormancy, water microbiology

Introduction

Francisella tularensis is a Gram-negative bacterium causing the zoonosis called tularemia. It is a highly virulent human pathogen classified in category A of potential agents of biological threat by the US Centers for Disease Control and Prevention [1]. Two subspecies are associated with human tularemia: *F. tularensis* ssp. *tularensis* (*Ftt*) (type A strains), only present in North America; and *F. tularensis* ssp. *holarctica* (*Fth*) (type B strains), spread all over the Northern Hemisphere, with a few strains identified in the last decade in Australia [1,2].

Terrestrial and aquatic lifecycles of *F. tularensis* have been described but remain not fully characterized despite many decades of research [3]. Especially, the survival of the bacteria in hydro-telluric environments is still under active investigation [4,5]. The terrestrial animal reservoir of *F. tularensis* is large, but lagomorphs and small rodents are considered primary sources of human infections. Recent data corroborate that the aquatic lifecycle of the subspecies *Fth* may be predominant over the terrestrial lifecycle, in particular for the persistence of bacteria in the environment, as initially suggested by Jellison [5,6]. This aquatic cycle involves mainly mosquitoes, mosquito larvae, and aquatic rodents [3]. In Northern Europe, mosquitos can transmit *Fth* after larva contamination in water and consequently be responsible for large outbreaks [7–10]. Cases of tularemia related to water have also been described after an aquatic activity (e.g., swimming or canyoning) [11,12] or through drinking or using contaminated water [13,14].

Some studies suggested the potential persistence of this bacterium in aquatic environments over long periods. Genomic studies have confirmed that diverse clones of *Fth* survive for a prolonged period and that a single clone may be responsible for human or animal cases of tularemia over several decades (up to 70 years) [15–17]. Multiple independent respiratory infections with *Fth* strains acquired from the environment over a short period were observed during an outbreak in Sweden in 2010 and in France in 2018, arguing in favor of environmental

changes acting as the trigger of these outbreaks [17,18]. Analysis of exposition factors suggested environmental contamination, presumably through aerosols originating from an unidentified environmental reservoir [5]. Low temperature and salinity have been identified to impact the duration of culturability of *Fth*. It has been described that this bacterium can remain culturable up to 70 days at 8°C [19,20], ten days in fresh water at room temperature, 21 days in seawater, and 45 days in brackish water [21]. Recently while studying biofilm formation of *F. tularensis* in aquatic environments, Golovliov *et al.* identified that *Fth* remained culturable and infectious in a mice model after 24 weeks of incubation at 4°C in low nutrient water containing 9 g/L of NaCl. They suggested that this improved survival at low temperature in freshwater may be a critical mechanism to help the bacteria overwinter and survive between host-associated replication events [4]. In such situations the bacteria may choose to switch to a dormancy state that reduces competition with actively growing cells. Among potential persistence and/or quiescence mechanism identified in bacteria, bacterial switch to a viable but non-culturable (VBNC) state that has been poorly studied in virulent *F. tularensis* strains [20,22]. Initially described in 1982 for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* [23] the VBNC state corresponds to bacteria that lose their ability to grow, may change their shape and lose their virulent traits, although remaining still alive. The VBNC state is induced during a stress such as nutrient starvation, physicochemical changes of the environment, or thermal shock. It has already been identified that the virulence-attenuated live vaccine strain (LVS) of *Fth* is able to survive in a VBNC state at least 140 days at 8°C [20]. Survival of a fluorescent *Fth* strain in a VBNC state up to 38 days has also been described in the control conditions of a co-culture experiment with protozoan using a gfp-modified *Fth* strain [22].

Consequently, our goal was to investigate the role of water temperature and salinity on the persistence of a virulent human strain of *Fth* in water and explore the possibility of a transition of *Fth* into a VBNC state triggered by these factors.

Material and methods

Bacterial strains and preparation of aquatic microcosms

All culture assays were performed in a BSL3 laboratory. We used the fully virulent *Fth* biovar I clinical strain CHUGA-Ft6 (genome accession: VJBK000000000) [15]. This strain was grown on Polyvitex-enriched chocolate agar plates (PVX, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubated at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere. The *F. tularensis* collection of French National Reference Center for *Francisella* is approved by the Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (France) (ANSM, authorization number ADE-103892019-7).

Six independent aquatic microcosms were defined, consisting of 6 aliquots of the same environmental water sample from the Rhône-Alpes region in France (sent for analysis in the water laboratory Abiolab-Asposan, Monbonnot-Saint-Martin, France; Table S1). Microcosms were incubated at 4°C, 18°C, and 37°C, and supplemented with either 0 or 10 g/L of NaCl. Each condition was tested in biological triplicate. Bacterial suspensions were prepared in PBS and adjusted to 10⁹ CFU.ml⁻¹, and 25 mL were added to 225 mL of environmental water previously sterilized using a 0,22µm filter.

Monitoring of culturability and viability of bacteria in water

The culturability and viability of bacteria in the six environmental models were monitored each week. The culturability was measured by CFU counts after plating 100µL of serial dilutions of each microcosm and on PVX agar plates after 48h incubation at 37°C. The viability of the bacteria was determined using qPCR after PMAxx™ Dye treatment (Biotium San Francisco, US) allowing specific DNA amplification of viable bacteria only. In brief, 1 mL of bacteria suspension was added to 250 µL of enhancer for Gram-negative Bacteria (Biotium San Francisco, US). PMAxx™ Dye was dissolved in H₂O at 5mM and added to a bacterial solution

at a final concentration of 25µM. After 10 min of incubation in the dark, samples were exposed 30 min to light with GloPlate™ Blue LED Illuminator (Biotum, San Francisco, US). Bacterial-PMA suspensions were centrifugated at 11,000g for 10 min, and DNA was extracted using NucleoSpin Blood Kit (Macherey Nagel, Hoerdlt, France) according to manufacturers' recommendations. At each sampling point, DNA extraction of 1 mL of bacterial suspension without PMA treatment was realized in parallel to determine amplification of total DNA present in the samples. At each sampling point, control with dead bacteria for PMAxx™ Dye was realized using a 1 mL suspension of bacteria previously lysed. Each qPCR reaction contained 10µL of Master Mix EvaGreen 2X (Biotium, San Francisco, US), 1µM of each primer, 5µL of DNA template, and 1µL of sterile H₂O. The 23S ribosomal RNA gene was amplified using the following forward (5'-CATACGAACAAGTAGGACGG-3') and reverse (5'-GCAAGCGGTTTCAGATTCTA-3'). The qPCR was performed using a LightCycler 480 instrument (Roche, Meylan, France) and SYBRGreen channel, with the following protocol: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 5s and 60°C for 30s. Melting curve analysis was performed from 57°C to 99°C. A negative control (H₂O) was included in each qPCR run. The viability was evaluated by the Cycle threshold (Ct) of DNA amplification of living bacteria. Statistical analyses were performed by student t-test.

To compare the shape and the length of VBNC and culturable bacteria, pictures of bacteria incubated in water at 18°C without NaCl, one hour for culturable bacteria, and 6 months for VBNC bacteria labeled with Syto9, were analyzed by Image J software and Microbe J plugging [24]. Bacterial morphology was described by parameters: area (0.1-1.2µm); length (0.2-1.4 µm); width (0-1.4 µm); circularity (0.3-max µm). Parameters were calculated for 1055 bacteria in each sample.

Bacterial viability of VBNC cells after temperature change of microcosm

Several months after the loss of culturability of *Fth* in water, 5 mL of microcosm at 4°C were transferred at 18°C, 30°C and 37°C. 5 mL of microcosm at 18°C were transferred at 4°C, 30°C and 37°C. After 7 and 14 days, the viability was evaluated by qPCR after PMAxx™ Dye treatment. Statistical analyses were performed using R (version 4.0.3) for the comparison of multiple groups by one-way ANOVA. False discovery rate (FDR) correction was applied for pairwise t-tests.

Biofilm quantification

Biofilm quantification was performed on the bacterial suspensions evolved in nutrient-poor water in T75 culture flasks, one year at 4°C, six months at 18°C, or four months at 37°C after inoculation. Negative control consisted in fresh culturable bacteria incubated for one hour in water. Each condition was tested in a biological duplicate. After incubation, the culture medium was aspirated, and flasks were washed three times with PBS. 5 mL of Crystal violet (0,2% w/v) were added, and flasks were re-incubated for 15 minutes. Crystal violet was washed three times with PBS, and biofilm was solubilized by 1 mL of ethanol 95%. 200µL of this biofilm was added to microtiter plates in three wells, and biofilm was quantified by measuring absorbance at 570nm. Statistical analyses were performed by student t-test.

Results

Culturability of F. tularensis ssp. holarctica extends to 11 weeks at low temperature

In low nutrient-containing water, at 37°C, the culturability of the virulent clinical strain of *Fth* biovar I decreased from 10⁸ to 0 CFU/mL in 8 days (Figure 1a). However, the culturability of bacteria extended dramatically when reducing the temperature of water microcosms. At 18°C, bacteria decreased from 10⁸ to 0 CFU/mL in 6 weeks (Figure 1b). At 4°C, culturability of bacteria declined even more slowly with a complete absence of growing colonies only 11 weeks

after inoculation of the water sample (Figure 1c). At 37°C, NaCl concentration enrichment of the microcosm at 10g/L conferred only a slight transient survival advantage to the bacteria (Figure 1a). No significant differences were observed at 18°C or 4°C.

F. tularensis ssp. holarctica switched to VBNC state at low temperature in nutrient-poor water

The virulent clinical strain of *Fth* biovar I did not survive for more than eight days at 37°C in nutrient-poor water. In this microcosm, viability was correlated with culturability. qPCR-PMA Ct value increased from 12.1 ± 0.5 to 25.8 ± 0.2 after eight days in nutrient-poor water without NaCl showing a strong reduction of viable bacteria in this microcosm. In comparison, for each condition, the Ct value of the controls with dead bacteria, i.e., lysed and PMAxx™ Dye treated bacteria, was 22.7 ± 3.9 . On the opposite, while the culturability declined, almost all bacteria remained alive during the eight-week study at 18°C and the 14 weeks study at 4°C (Figures 1e and 1f). The Ct value of viable bacteria stayed stable at 12.5 ± 1.3 for all four conditions during the whole experiment and for more than two weeks after the loss of culturability (Water at 4°C without NaCl, Ct range: 11.8-13.8. Water at 4°C with NaCl, Ct range: 11-13.5. Water at 18°C without NaCl, Ct range: 12-13.6. Water at 18°C with NaCl, Ct range: 10.4-13.7). Interestingly, two replicates were kept in the water for 24 months and tested again. The Ct of PMA-qPCR remained unchanged (13.2 and 14.1). Thus, we observed that roughly, the full initial bacterial inoculum switched at low temperature to viable but non-culturable state corresponding to the definition of transition into VBNC state. It is interesting to note that the temperatures of 4°C and 18°C differentially affected culturability but not viability. Viability of the bacteria in the microcosms at 4 and 18°C was confirmed by the Live/Dead® BacLight™ assay (Figure S1).

The addition of 10g/L NaCl conferred a slight transient survival advantage to the bacteria at 37°C. On the fourth day, there was a 4-log difference (p-value = 0.0005) between the two conditions but qPCR-PMA Ct value also increased from 11.4 ± 1.1 to 22.6 ± 0.4 showing that all the bacteria were dead in eight days in both conditions (Figure 1d). The addition of salt to the

microcosm did not significantly affect the culturability and viability of the bacteria at 4°C and 18°C (p-value > 0,05 for each time points, Figures 1b,c,e,f).

To visualize bacterial morphology after transition into VBNC state, fresh bacteria suspended one hour in water and VBNC bacteria sampled five months after the loss of culturability were labeled with an anti- *F. tularensis* LPS antibody and observed with oil immersion objective 100X. After the loss of culturability the anti-LPS antibody was still able to bind to the LPS of *Fth* strain and microscopic examination suggested a reduced length of VBNC bacteria (Figure S2). Modification of the size of the bacteria was confirmed by Syto9 staining and image analysis that showed that VBNC bacteria were smaller than culturable *Fth* with respectively an area of $0.31 \pm 0.19 \mu\text{m}^2$ and $0.47 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$; a length of $0.62 \pm 0.22 \mu\text{m}$ and $0.76 \pm 0.26 \mu\text{m}$; a perimeter of $1.85 \pm 0.63 \mu\text{m}$ and $2.29 \pm 0.75 \mu\text{m}$ (p-value <0.0001 for each parameters). However, circularity was not statistically different (0.97 ± 0.03 for both culturable and VBNC *Fth* samples; p-value = 0.47) (Figure S3).

High water temperatures inactivated F. tularensis ssp. holarctica VBNC bacteria

After their transition into the VBNC state, the viability of the bacteria was still dependent on the temperature of the water. Several months after the loss of culturability, when VBNC bacteria were moved from 4°C to 18°C and vice versa, the temperature change did not influence the viability of the bacteria after 14 days of incubation (4°C to 18°C: Ct value from 13.8 ± 0.8 to 14.3 ± 2.5 ; 18°C to 4°C: Ct value from 12.7 ± 1.1 to 15.3 ± 3.7). However, when the temperature was shifted to 30°C, the viability of VBNC bacteria significantly declined in 14 days (4°C to 30°C: Ct value from 13.8 ± 0.8 to 20 ± 1.5 ; 18°C to 30°C: Ct value from 12.7 ± 1.1 to 20 ± 6) (p-value < 0.05). Moreover, when placed at 37°C, viability of VBNC bacteria declined in 14 days under the threshold corresponding to dead bacteria only (4°C to 37°C: Ct value from 13.8 ± 0.8 to 23.8 ± 2.5 ; 18°C to 37°C: Ct value from 12.7 ± 1.1 to 26.3 ± 3.3) (p-value <0.05) (Figure 2).

Virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* strain was able to form biofilm in water

Optical density at 570 nm of the water flasks containing fresh bacteria after crystal violet staining was 0.14 ± 0.01 while optical density of the flasks containing the *Fth* VBNC bacteria were increased twofold: 0.27 ± 0.01 for VBNC bacteria after one year at 4°C (p-value = 0.019) and 0.3 ± 0.01 (p-value < 0.0001) for VBNC bacteria after six months at 18°C. On the opposite, optical density of the flasks containing dead *Fth* bacteria (4 months at 37°C) was 0.15 ± 0.03 showing no significant biofilm production compared to fresh bacteria (p-value = 0.7) (Figure 3). Microscopic observation of the stained flasks showed small Gram-negative coccobacilli embedded and surrounded by a structure resembling a biofilm (Figure S4).

Discussion

Although the presence and potential survival of *Fth* in the aquatic environment have been identified in several studies [25–29], the mechanisms of its persistence and its precise environmental reservoir remain unclear. According to current descriptions of the aquatic cycle of *Fth*, aquatic environments may be initially contaminated by *F. tularensis* through dead animals or excrements of infected animals [3]. However, how these bacteria can persist for weeks or even years within these environments remains to be elucidated. Following recent work showing extended culturability of *Fth* at 4°C in water, we hypothesized that in environmental water, this bacterium might also survive in a dormancy form such as the VBNC state. This hypothesis would help the bacteria to survive in hostile environments, as described for several other Gram-negative bacteria, thus limiting nutrient starvation and competition with other microorganisms [20,22,30,31].

We observed that a clinical strain of *Fth* remained culturable for more than 11 weeks of incubation in nutrient-poor water at 4°C; more than one month at 18°C but only one week at

37°C, consistent with previously published data on the culturability of *Fth* FSC200 and LVS [4,19–21]. However, we show here that culturability is not representative of the viability of *Fth* strains since the bacterium may switch to the VBNC state under conditions that remain to be fully characterized. Indeed, our results showed prolonged survival in nutrient-poor water at 4°C and 18°C of a virulent *Fth* biovar I strain long after the bacterium had lost its ability to grow on an agar plate. Our main approach assessing bacterial survival is based on qPCR amplification of DNA from bacteria preincubated with PMAxx™ Dye widely used to detect and determine the viability of human pathogens [32]. As PMAxx™ Dye does not pass through intact bacterial membranes, it cannot bind to the DNA of living bacteria although binding to the DNA of dead bacteria and extracellular DNA is possible. While the amount of DNA from living bacteria decreased similarly to culturability at 37°C, it remained remarkably stable over time at 4°C and 18°C during the whole experiment, matching the definition of bacterial switch into a VBNC state as the majority of initial bacteria remained viable despite the loss of culturability, and results were confirmed by Live/Dead® BacLight™ assay [33]. Morphological analysis showed that VBNC *Fth* bacteria are smaller as they have a reduced length, perimeter and area compared to the culturable forms.

Like the seeds of plants, VBNC forms allow preserving the genetic heritage of bacteria in unfavorable conditions [34]. *Fth* bacteria could then remain viable for a very long time as VBNC bacteria in aquatic environments without the need for a host. When more favorable conditions return, VBNC bacteria revert to their vegetative state, usually recovering their culturability and virulence. Reversion after switch into VBNC state remains to be demonstrated for *Fth* in further studies.

Bacteria evolve to a VBNC state to withstand environmentally induced stresses. In our experiments, incubation of *Fth* in water at 37°C was the most deleterious environmental condition. It did not induce a transition to the VBNC state since bacterial mortality correlated

with loss of culturability. Therefore, it appears that conditions that are too harmful to *Fth* and associated with a loss of their culturability in one week do not allow the development of VBNC bacteria. The most favorable conditions for *Fth* survival are close to environmental conditions in tularemia endemic areas, i.e., areas of water temperatures ranging from 4 to 20°C between winter and summer periods [4,28]. Importantly, after the switch into VBNC state, *Fth* viability was still dependent on the temperature of the water. Over 30°C, the viability of VBNC bacteria declined, and was completely abolished after seven days at 37°C. Thus, the temperature tipping point no longer supporting the transition of *Fth* to the VBNC state is between 18°C and 30°C. Our results support the aquatic environmental distribution of *Fth* in Northern regions where water temperature may not often exceed the temperature limit killing bacteria in a VBNC state. The inter-tropical region, with higher water temperature, could therefore represent a physical limitation to spreading towards the southern hemisphere. The seasonality could also have a significant role in maintaining this environmental reservoir since the bacterial persistence is better in freshwater.

One other mode of persistence of bacteria in aquatic environments is biofilm formation, as observed for many bacteria like *Legionella pneumophila* [35]. Experimental studies have shown that environmental species of *Francisella* can form biofilms *in vitro* [36]. *F. novicida* starts biofilm formation after two hours and can be evidenced by crystal violet staining after 24h [36]. In our study, we observed thin biofilm formation at the bottom of the flasks after six or 12 months of incubation of the microcosms at 18°C or 4°C but no biofilm formation after four months at 37°C. The biofilm was very fragile and therefore difficult to manipulate for observation. Biofilm formation of *Fth* strains may be a slow process requiring the viability of the bacteria for more than one week. The absence of biofilm formation of *F. tularensis* strains observed in the study of Golovliov *et al.* may be related to experimental conditions in axenic media not mimicking the natural aquatic environment [4]. Our study is closer to environmental

conditions, although it did not contain other competitive bacteria or predatory microorganism, because the *Fth* strain was incubated in a large volume of filtered French lake water. In our experiment, VBNC bacteria seemed to be embedded in a biofilm matrix, as previously shown for other pathogens (e.g., *Legionella pneumophila* and *Listeria monocytogenes*) [30,37]. In 2016, Flemming *et al.* described biofilms as a “reservoir of VBNC bacteria,” especially in the starvation zones of the biofilm [35]. The biofilm and VBNC states play an essential role in the persistence of bacteria. Both allow the bacteria to survive in hostile environments while many pathogens lose their virulence properties after their switch into a VBNC state [31].

The persistence of *Fth* in aquatic environments in a VBNC state questions our capacity to detect and control this bacterium in this specific reservoir. VBNC state may be a way of long-term bacterial persistence of *Fth* that cannot be detected by conventional culture-based techniques. The VBNC formation process likely explains that detection of *F. tularensis* in the aquatic environment has been obtained by species-specific molecular methods but very rarely by culture techniques [5]. In case of accidental or intentional dispersal of *F. tularensis*, the bacterium may thus survive for many months in water environments although undetected by culture methods. Identification of reactivation factors from the VBNC state into a more virulent and culturable state will have to be addressed in further experiments. It would help prevent and control waterborne sporadic and outbreak tularemia cases.

The impact of temperature may also have some effects on tularemia diagnosis in humans. *F. tularensis* is usually cultured at 37°C from clinical samples, but in only 10% of tularemia patients bacteria grown. In the light of this work, this temperature may not be optimal for isolating this bacterium from patients, animal samples, or environmental samples or even for bacterial counts after growth on an agar medium. Potential switch into VBNC state *in vivo* in infected tissues (especially lymph nodes) could also partly explain the failure to isolate this bacterium and may impact therapeutic outcome as VBNC bacteria usually exhibit increased

309 antibiotic resistance because of a reduced metabolism while biofilms also increase resistance to
310 antibiotics [31,38]. These findings may have implications in treatment failures observed in 20
311 to 30% of patients, especially when the diagnosis is delayed, which could allow the bacteria to
312 switch to a VBNC state *in vivo*.

313 Finally, all these data about the environmental survival of *Fth* in water at low temperature brings
314 new important features allowing updating the aquatic cycle of this bacterium and proposing
315 new hypotheses (Figure 4). Indeed, many other *Francisella* species are aquatic bacteria, making
316 reinforces the hypothesis aquatic cycle [5]. What if *Fth* had rather evolved to adapt to an aquatic
317 niche yet poorly characterized so far while becoming infectious for various mammal species,
318 which are usually dead ends for the bacteria because it often kills its hosts [3]? Indeed, this
319 bacterium has been identified in many aquatic areas, including the sea water, rivers, ponds [25–
320 28,39,40], which might suggest that the primary reservoir of the subspecies *holarctica* could
321 rather be the aquatic environment itself. This hypothesis could explain why a specific reservoir
322 within the environment has not been identified despite decades of research. Some aquatic
323 environments may thus represent the largest reservoir of *Fth* with the implication of aquatic
324 rodents to maintain the cycle through bacterial inoculum amplification. Animals and humans
325 may thus be infected directly from this environmental reservoir through water consumption or
326 aerosols, explaining some sporadic human respiratory contaminations after outdoor activities.
327 Aquatic environments could act as a primary source of human and animal infections or
328 mosquito larvae contamination after reactivation of the VBNC state into virulent bacteria upon
329 particular environmental conditions. Further studies will be necessary to determine: 1/ if *Fth*
330 VNBC bacteria are also virulent and able to infect animals and mosquito larvae who are at the
331 interface between the aquatic and the terrestrial cycle; 2/ to identify reactivation factors from
332 the VBNC state towards the culturable and virulent state; 3/ to study interaction of VBNC *Fth*
333 *bacteria* within biofilms and with amoeba.

In conclusion, our study demonstrated the extended persistence of a virulent strain of *Fth* in water up to 24 months through the formation of VBNC bacteria and thin biofilms. Water temperature appears as a major factor for bacterial survival in aquatic environments. It affects the culturability of the bacteria, the switch toward the VBNC state, and the viability of VBNC cells. Our findings reinforce the hypothesis of a long-term environmental aquatic reservoir of this pathogen.

Funding

This work and the doctorate allocation of Camille D. Brunet are funded by the Agence Innovation Defense, Direction Générale de l'Armement, France, [grant number Tulamibe ANR-17-ASTR-0024].

Acknowledgment

We thank the company Abiolab Asposan for the chemical analysis of the water. We thank Ludovic Sansoni for his help on the figure of aquatic cycle.

Declaration of interest statement

The authors declare no conflicts of interest

References

- [1] A. Sjostedt, Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;110:1–29.
- [2] J. Jackson, A. McGregor, L. Cooley, et al. *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011, *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18:1484–1486.
- [3] M. Maurin and M. Gyuranecz, Tularaemia: clinical aspects in Europe, *Lancet Infect. Dis.* 2016;16:113–124.

356 [4] I. Golovliov, S. Bäckman, M. Granberg, et al. Long-term survival of virulent tularemia
 357 pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments, Appl. Environ.
 358 Microbiol. 2021;AEM.027:13-20.

359 [5] A. Hennebique, S. Boisset and M. Maurin, Tularemia as a waterborne disease: a review,
 360 Emerg. Microbes Infect. 2019;8:1027–1042.

361 [6] W.L. Jellison, Tularemia in North America, 1930-1974, (1974).

362 [7] S. Bäckman, J. Näslund, M. Forsman, et al. Transmission of tularemia from a water
 363 source by transstadial maintenance in a mosquito vector, Sci. Rep. 2015;5:7793.

364 [8] O. Wik, Large tularaemia outbreak in Varmland, central Sweden, 2006, Euro Surveill.
 365 Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 2006;11

366 [9] H. Eliasson and E. Bäck, Tularaemia in an emergent area in Sweden: An analysis of 234
 367 cases in five years, Scand. J. Infect. Dis. 2007;39:880–889.

368 [10] U. Jounio, M. Renko and M. Uhari, An outbreak of *holarctica*-type tularemia in
 369 pediatric patients, Pediatr. Infect. Dis. J. 2010;29:160–162.

370 [11] E. Peker, A. Ayaydin and N. Duran, Familial tularaemia, Indian J. Med. Microbiol.
 371 2009;27:272.

372 [12] B. Guerpillon, A. Boibieux, C. Guenne, et al. Keep an Ear Out for *Francisella*
 373 *tularensis*: Otomastoiditis Cases after Canyoneering, Front. Med. 2016;3.

374 [13] A. Karadenizli, M. Forsman, H. Şimşek, et al. Genomic analyses of *Francisella*
 375 *tularensis* strains confirm disease transmission from drinking water sources, Turkey, 2008,
 376 2009 and 2012, Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 2015;20.

377 [14] T. Kantardjiev, I. Ivanov, T. Velinov, et al., Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997-2005,
 378 Emerg. Infect. Dis. 2006;12:678–680.

379 [15] M. Kevin, G. Girault, Y. Caspar, et al. Phylogeography and Genetic Diversity of
 380 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France (1947–2018), Front. Microbiol. 2020;11.

381 [16] C. Dwibedi, D. Birdsell, A. Lärkeryd, et al., Long-range dispersal moved *Francisella*
 382 *tularensis* into Western Europe from the East, Microb. Genomics 2016;2:100.

383 [17] A. Johansson, A. Lärkeryd, M. Widerström, et al. An Outbreak of Respiratory
384 Tularemia Caused by Diverse Clones of *Francisella tularensis*, Clin. Infect. Dis. Off. Publ.
385 Infect. Dis. Soc. Am. 2014;59:1546–1553.

386 [18] A. Mailles, R. Ollivier, F. Benezit, et al. [A tularemia outbreak in France in 2018
387 suggesting a change in the epidemiology of the disease] Médecine Mal. Infect. 2019;49:4.
388 French.

389 [19] S.E. Gilbert and L.J. Rose, Survival and persistence of nonspore-forming biothreat
390 agents in water: Persistence of nonspore-forming biothreat agents in water, Lett. Appl.
391 Microbiol. 2012;55:189–194.

392 [20] M. Forsman, E.W. Henningson, E. Larsson, et al. *Francisella tularensis* does not
393 manifest virulence in viable but non-culturable state, FEMS Microbiol. Ecol. 2000;31:217–
394 224.

395 [21] Z.L. Berrada and S.R. Telford III, *Survival of Francisella tularensis Type A in brackish-*
396 *water*, Arch. Microbiol. 2011;193:223–226.

397 [22] J. Thelaus, A. Andersson, P. Mathisen, et al. Influence of nutrient status and grazing
398 pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water: Role of nutrient and protozoa for
399 the fate of *F. tularensis*, FEMS Microbiol. Ecol. 2009;67:69–80.

400 [23] H.S. Xu, N. Roberts, F.L. Singleton, et al. Survival and viability of nonculturable
401 *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment, Microb. Ecol.
402 1982;8:313–323.

403 [24] A. Ducret, E.M. Quardokus and Y.V. Brun, MicrobeJ, a tool for high throughput
404 bacterial cell detection and quantitative analysis, Nat. Microbiol. 2016;1:16077.

405 [25] I. Janse, R.Q.J. Van der Plaats, A.M. de Roda Husman et al. Environmental Surveillance
406 of Zoonotic *Francisella tularensis* in the Netherlands, Front. Cell. Infect. Microbiol.
407 2018;8:140.

408 [26] T. Broman, J. Thelaus, A.-C. Andersson, et al. Molecular Detection of Persistent
409 *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Natural Waters, Int. J. Microbiol. 2011;1–10.

410 [27] S. Duodu, P. Larsson, A. Sjödin, et al. The Distribution of *Francisella*-like Bacteria
411 Associated with Coastal Waters in Norway, Microb. Ecol. 2012;64:370–377.

412 [28] C.D. Brunet, A. Hennebique, J. Peyroux, et al. Presence of *Francisella tularensis* subsp.
413 *holarctica* DNA in the Aquatic Environment in France, *Microorganisms* 2021;9:1398.

414 [29] Z.L. Berrada and S.R. Telford, Diversity of *Francisella* Species in Environmental
415 Samples from Martha's Vineyard, Massachusetts, *Microb. Ecol.* 59 (2010), pp. 277–283.

416 [30] L. Li, N. Mendis, H. Trigui, et al. The importance of the viable but non-culturable state
417 in human bacterial pathogens, *Front. Microbiol.* 2014;5

418 [31] J.D. Oliver, Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria,
419 *FEMS Microbiol. Rev.* 2010;34:415–425.

420 [32] L. Soto-Muñoz, N. Teixidó, J. Usall, et al. Development of PMA real-time PCR method
421 to quantify viable cells of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist to control the major
422 postharvest diseases on oranges, *Int. J. Food Microbiol.* 2014;180:49–55.

423 [33] M. Ayrapetyan and J.D. Oliver, The viable but non-culturable state and its relevance in
424 food safety, *Curr. Opin. Food Sci.* 2016;8:127–133.

425 [34] J.T. Lennon and S.E. Jones, Microbial seed banks: the ecological and evolutionary
426 implications of dormancy, *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9:119–130.

427 [35] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, et al. Biofilms: an emergent form of
428 bacterial life, *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14:563–575.

429 [36] C. Siebert, C. Villers, G. Pavlou, et al., *Francisella novicida* and *F. philomiragia* biofilm
430 features conditionning fitness in spring water and in presence of antibiotics, *PLOS ONE*
431 2020;15:0228591.

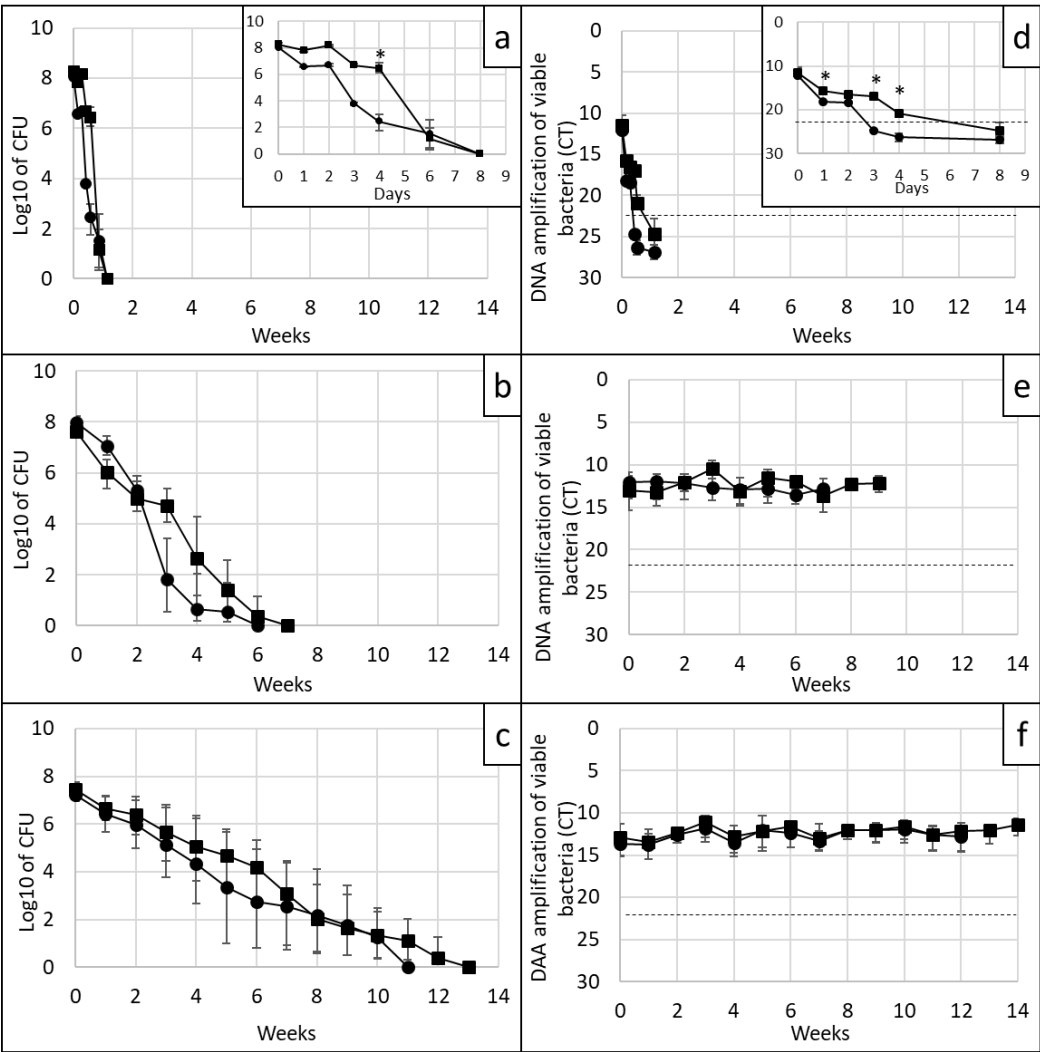
432 [37] J. Wingender and H.-C. Flemming, Biofilms in drinking water and their role as reservoir
433 for pathogens, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2011;204:417–423.

434 [38] S.J. Kassinger and M.L. van Hoek, Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in
435 *Francisella*, *Front. Microbiol.* 2021;12:644855.

436 [39] P. Kaysser, E. Seibold, K. Mätz-Rensing, et al. Re-emergence of tularemia in Germany:
437 Presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas, *BMC Infect.*
438 *Dis.* 2008;8:157.

439 [40] J. Hightower, I.T. Kracalik, N. Vydayko et al. Historical distribution and host-vector
440 diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine, Parasit. Vectors
441 2014;7:453.

442



444

445 Figure 1: Culturability and viability of *F. tularensis* ssp. *holarctica* in nutrient-poor water.

446 Culturability (1a-c) and viability (1d-f) of *Fth* in nutrient-poor water at respectively 37°C (1a,d),

447 18°C (1b,e) and 4°C (1c,f). Culturability was measured by CFU counts after serial dilutions and

448 spreading on chocolate agar plates. Viability was evaluated by amplification of DNA after

449 PMAxx™ Dye treatment. Black circle: nutrient-poor water with 0 g/L NaCl; black square:

450 nutrient-poor water with 10 g/L NaCl.; Dotted line: mean Ct of all the controls performed on

451 dead populations at each sampling points. The results are expressed as the average of three

452 biological replicates. Data were analyzed by student t-test. * p value <0,05 between samples

453 with and without NaCl.

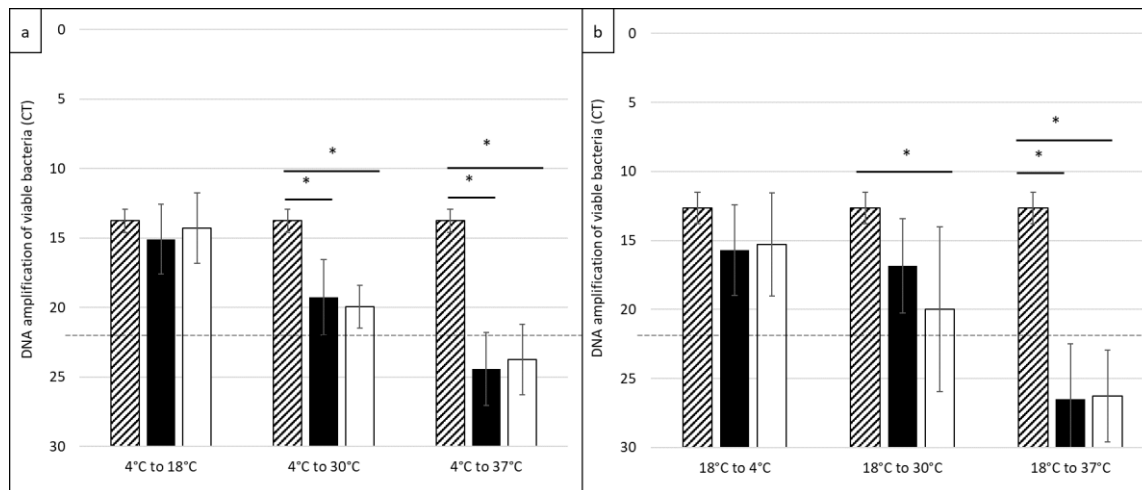


Figure 2: Viability of VBNC *F. tularensis* ssp. *holarctica* in water after a temperature change. Several months after the loss of culturability of *Fth* in water, 5 mL of microcosm at 4°C were transferred at 18°C, 30°C and 37°C (2a) and 5 mL of microcosm at 18°C were transferred at 4°C, 30°C and 37°C (2b). After 7 and 14 days, the viability was evaluated by qPCR after PMAxx™ Dye treatment. Dash bars: Ct at day 0, black bars: Ct at day 7, white bars: Ct at day 14, dotted line: Ct of the control corresponding to average of a dead population. The results are expressed as the average of three biological replicates. Data were analyzed by one-way ANOVA with pairwise t-tests using FDR correction. * p-value < 0.05.

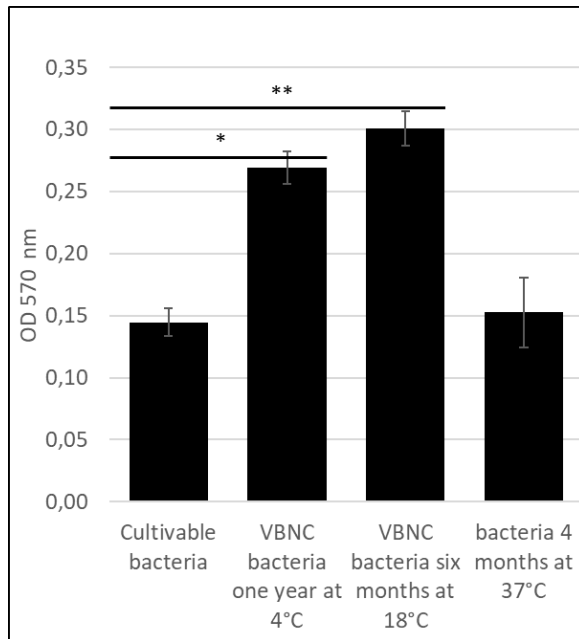


Figure 3: Quantitative measurement of biofilm formation of *F. tularensis* ssp. *holarctica* in VNBC state. *Fth* bacteria were incubated in nutrient-poor water for one hour for cultivable bacteria, one year at 4°C and six months at 18°C for VBNC and for four months at 37°C for non-persistent bacteria. Biofilm biomass was estimated by absorbance at 570 nm of crystal violet assay. The results are expressed as the average of three biological replicates. Data were analyzed by student t-test, * p-value <0.05 ** p-value < 0.01.

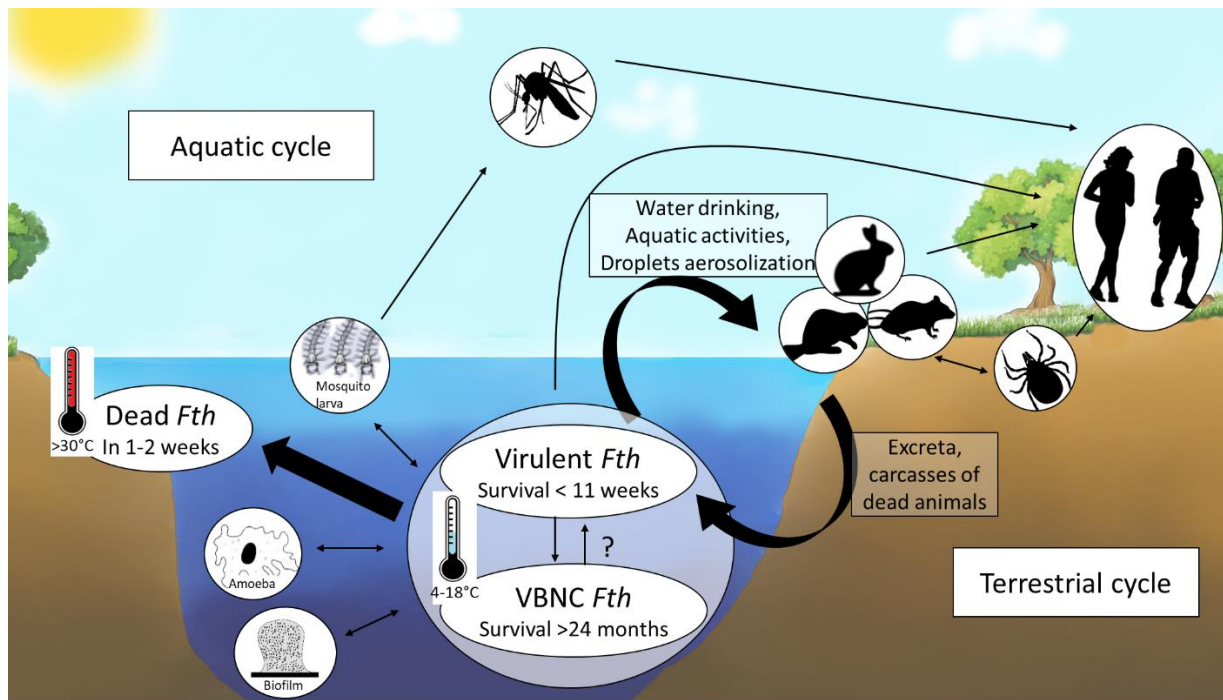


Figure 4: The hidden aquatic reservoir of *F. tularensis* ssp. *holarctica*?

We updated the current knowledge about the aquatic cycle of *Fth* according to the results of this work and proposed hypotheses that emerged from our observations. We showed that the survival of *Fth* in aquatic environments is driven by water temperature and transition into a VBNC state. While *Fth* culturability is prolonged in water at low temperatures ($4-18^{\circ}\text{C}$), these low temperatures actually also allow the survival of the bacteria for months or years after transition into a VBNC state. On the opposite high temperatures ($> 30^{\circ}\text{C}$) are associated to complete loss of culturability and loss of viability of the bacteria, even if the bacteria has already switched into the VBNC state at lower temperatures. Thus, mammals or accidentally human may be contaminated from this long-term aquatic reservoir by water drinking, direct contact or by inhalation of contaminated droplets that could explain several respiratory tularemia cases related to environmental exposure only. When infected, wild animals can amplify the bacterial inoculum within the same aquatic environment or disperse the bacteria in other environments with their carcasses and feces and may contaminate other animals or exceptionally humans as described in the terrestrial cycle of the bacteria.

486

II.2.3 Données supplémentaires

487 **Table S1: Physico-chemical analysis of environmental water**

488 *Material & Methods*

489 The water used for the models was taken in winter from a French lake. pH, calcium, nitrates,
 490 nitrites, orthophosphates, sulfates, chloride, sodium, potassium, magnesium, dissolved oxygen,
 491 hydrogen carbonates, and anionic detergents were measured (Abiolab-Asposan, Monbonnot-
 492 Saint-Martin, France) in one liter of water with *Fth* at a concentration of 10^8 bacteria / mL
 493 incubated at 18°C. Two weeks after the loss of bacterial culturability, samples were filtered
 494 through 0,22µm filters and sent for physicochemical analysis. Another 1 liter of water was not
 495 inoculated with bacteria but processed and analyzed similarly.

496 *Results*

497 pH, calcium, nitrates, nitrites, orthophosphates, sulfates, chloride, sodium, potassium,
 498 magnesium, dissolved oxygen, hydrogen carbonates, and anionic detergents were measured
 499 before and after incubation of bacteria. These measurements confirmed that water used without
 500 NaCl addition contained 0 g/L NaCl. The bacteria did not change any parameters measured
 501 during the eight weeks of incubation. Microcosm were filled with this environmental water,
 502 considered as low nutrient water as it contains less nutrient than usual culture media for *Fth* but
 503 more than saline solution.

	Without bacteria incubation	With bacteria incubated 8 weeks at 18°C
pH	Neutral	Neutral
Calcium (Ca)	50 mg/L	51 mg/L
Nitrates (NO3)	<0.5 mg/L	<0.5 mg/L

Nitrites (NO ₂)	<0.02 mg/L	<0.02 mg/L
Orthophosphates (PO ₄)	2.98 mg/L	2.99 mg/L
Sulphates (SO ₄)	29 mg/L	30 mg/L
Total chlorine	<0.02 mgCl ₂ /L	<0.02 mgCl ₂ /L
Sodium (Na)	350 mg/L	360 mg/L
Potassium (K)	11 mg/L	11 mg/L
Magnesium (Mg)	14 mg/L	14 mg/L
Dissolved oxygen	8.3 mg/L	8.2 mg/L
Hydrogen carbonates (HCO ₃)	212 mg/L	218 mg/L
Anionic detergents	<0.1 mg/L	<0.1 mg/L

504

505

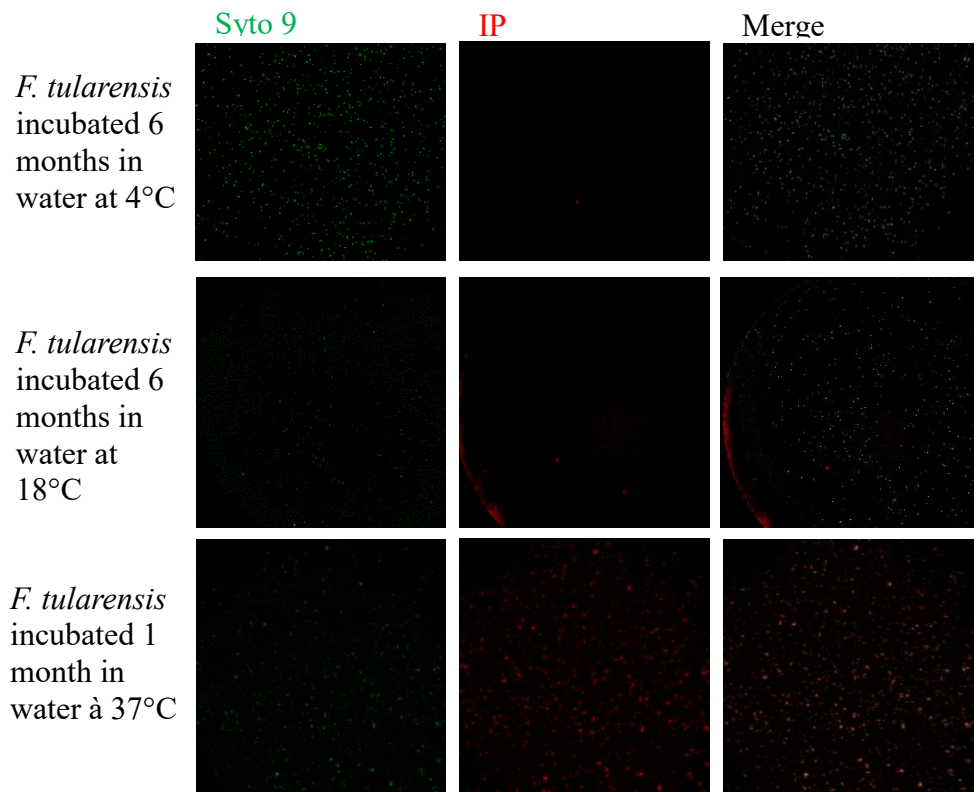
Figure S1: Live/Dead® BacLight™ labelling

Material & Methods

The Live/Dead® BacLight™ assay distinguishes dead bacteria with mixt Syto9 and Propidium Iodide (PI). All bacteria were labeled in green by Syto9 and dead bacteria were labeled in red by PI. Briefly, 130 µL of culture were diluted and incubated with a mixture containing 0.2 µL of PI and 0.2 µL of Syto9. After 15 min of incubation in the dark, bacteria were observed using a fluorescence microscope with oil immersion objective 100Xa/1.25 (Nikon).

Results

Six months after their inoculation in microcosm, only a few numbers of bacteria incubated at 4°C and 18°C and visualized by Syto9 were stained by IP. On the contrary, one month after their inoculation in microcosm, all bacteria incubated at 37°C were marked by Syto9 and IP, demonstrating that there were no more living bacteria in this experimental condition.



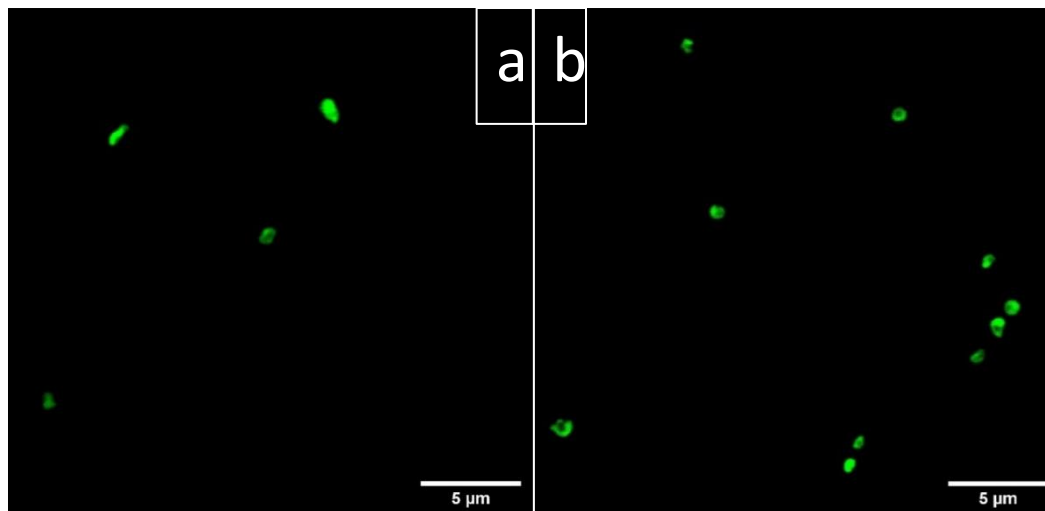
Caption

Fluorescent live/dead staining of *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Bacteria were incubated in nutrient-poor water and treated by Live/Dead® BacLight™ kit after six months incubation at 4°C or 18°C, and after one month at 37°C.

Figure S2: Fluorescent labeling of bacteria

Material & Methods

Imaging was performed on culturable and non-culturable bacteria to observe the shape of bacteria before and after their switch into VBNC state, respectively. VBNC bacteria were induced in water at 18°C, and observed five months after the loss of culturability. Culturable bacteria corresponded to fresh bacteria grown on PVX agar plate and suspended in water at 18°C one hour. 1 ml of each sample was added to a well with a coverslip. Bacteria were fixed on slides with PFA 4% for 10 min. The slides were then saturated with BSA 3% for 30 min and were covered with a primary anti-*F. tularensis* LPS antibody (ThermoFisher Scientific, Waltham, US) diluted at 1/100, and incubated for 1 hour at room temperature. After washing, the slide was covered with a secondary anti-mouse antibody coupled to the Alexa fluor 488 (ThermoFisher Scientific, Waltham, US) at 1/1000 dilution and incubated for 1 hour at room temperature. Microscopic observation was realized using a scanning confocal microscope (Zeiss LSM710) with oil immersion objective 100X.



Caption

Fluorescent labeling of *F. tularensis* ssp. *holarctica* in culturable form (2a) and VBNC form (2b). Bacteria-LPS were labeled with a primary anti-*F. tularensis* LPS antibody (ThermoFisher Scientific, Waltham, US) and a secondary anti-mouse antibody coupled to the Alexa fluor 488 (ThermoFisher Scientific, Waltham, US). Microscopic observation was realized using a scanning confocal microscope (Zeiss LSM710) with oil immersion objective 100X.

Figure S3: Bacterial morphology

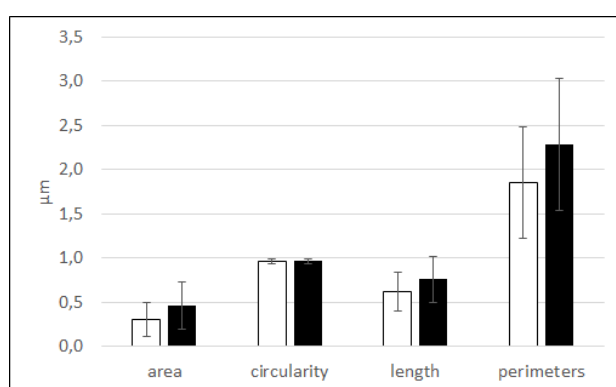
Material & Methods

To compare the shape and the length of bacteria, pictures of bacteria labeled with Syto9 were analyzed by Image J software and Microbe J plugging¹. Bacterial morphology was described by parameters: area (0.1-1.2μm); length (0.2-1.4 μm); width (0-1.4 μm); circularity (0.3-max μm). Parameters were calculated for 1055 bacteria in each sample.

¹ A. Ducret, E.M. Quardokus and Y.V. Brun, *MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis*, Nat. Microbiol. 1 (2016), pp. 16077.

Results

Modification of the size of the bacteria was confirmed by Syto9 staining and image analysis that showed that VBNC *Fth* were smaller than culturable. *Fth* with respectively an area of $0.31 \pm 0.19 \mu\text{m}^2$ and $0.47 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$; a length of $0.62 \pm 0.22 \mu\text{m}$ and $0.76 \pm 0.26 \mu\text{m}$; a perimeter of $1.85 \pm 0.63 \mu\text{m}$ and $2.29 \pm 0.75 \mu\text{m}$ (p-value <0.0001 for each parameters). However, VBNC bacteria kept a similar round shape with a circularity of 0.97 ± 0.03 for both culturable and VBNC *Fth* sample (p-value = 0.47).



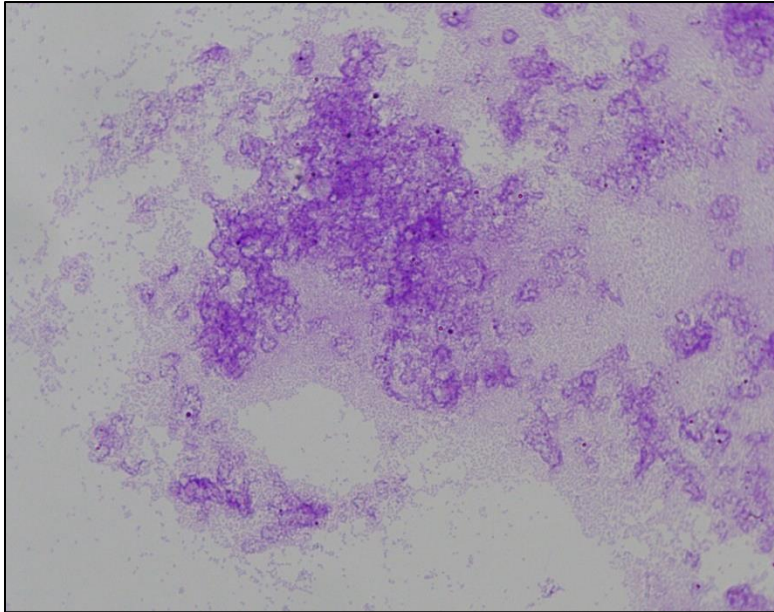
Caption

Bacterial morphology of culturable *Fth* (white bars) and VBNC *Fth* (black bars) in μm . Data were analyzed by student t-test ** p-value < 0.005.

Figure S4: Microscopic examination of biofilm

Material & Methods

Biofilm labeling was performed on bacterial suspension evolved in nutrient-poor water in T75 culture flasks at 18°C for six months. The culture supernatant was aspirated, and the flask was washed three times with PBS. 5 mL of Cristal violet (0,2% w/v) were added and incubated for 15 minutes. After three washing, the flask was opened, biofilm was transferred on a coverslip, placed on a glass slide, and fixed by Eukitt®. Biofilm was observed by an optical microscope (oil immersion objective 100X).



572

573 *Caption*

574 *F. tularensis* ssp. *holarctica* biofilm containing VBNC bacteria.

575 Bacteria were incubated in nutrient-poor water at 18°C in a culture flask; after six months,
576 flasks were washed, and biofilms were stained with crystal violet. Biofilms were observed by
577 optic microscope (oil immersion objective 100X).

578

II.3 Résultats complémentaires

La virulence des bactéries à l'état VBNC est incertaine. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction (II.5), plusieurs espèces bactériennes perdent leur virulence à l'état VBNC, en modèles *in vivo* ou *in vitro*. J'ai donc voulu évaluer ce paramètre pour *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC. J'ai essayé de mettre au point un modèle d'infection de *Galleria mellonella* qui n'a pas abouti car la souche virulente de *F. tularensis* ssp. *holarctica* s'est avérée non virulente dans ce modèle animal, le rendant inadapté pour étudier la virulence de cette bactérie.

Pour certaines espèces bactériennes, la culture des bactéries à l'état VBNC en présence de cellules eucaryotes ou l'infection de cellules eucaryotes induit leur réactivation et le regain de leur virulence dans ces mêmes cellules (155,199). Les mécanismes de réactivation n'étant pas connus, il n'est pas encore identifié qui de la croissance bactérienne ou de la virulence est restaurée en premier. J'ai tenté une réactivation des bactéries à l'état VBNC à l'aide de deux modèles de coculture cellulaire sur des amibes et des macrophages murins. Dans le modèle amibien, aucune réactivation et lyse cellulaire n'ont été observées. Dans le modèle macrophagique, les résultats n'ont pas été reproductibles.

II.3.1 Infection de *G. mellonella* par *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Les *G. mellonella* sont des petits vers blancs de plus en plus utilisés en recherche comme modèle de virulence bactérienne (200). Leur manipulation est plus facile et plus éthique que la souris et donne des premiers résultats sur la virulence des agents pathogènes. Pour mettre au point ce modèle, j'ai d'abord voulu évaluer la virulence d'une souche clinique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans ce modèle. Pour cela, j'ai fait croître la souche virulente CHUGA-Ft6 en milieu riche (bouillon Sheadler K3) une nuit. Les bactéries ont ensuite été diluées dans du PBS à des concentrations de 3×10^6 UFC / mL, 3×10^4 UFC / mL et 3×10^2 UFC / mL. Cinq groupes de 12 larves chacun ont été constitués, dans lesquels les bactéries ou le contrôle ont été inoculés :

- Groupe 1 : 3×10^6 UFC / mL injectées ;

- Groupe 2 : 3×10^4 UFC / mL injectées ;
- Groupe 3 : 3×10^2 UFC / mL injectées ;
- Groupe 4 : PBS injecté ;
- Groupe 5 : pas d'injection.

Les larves ont ensuite été disposées dans une enceinte à température régulée à 18°C. En moyenne, 7 jours après injection, une seule larve du groupe PBS était morte, et 10 jours après injection deux larves de chaque groupe, à l'exception du groupe 5, étaient mortes. Ainsi, aucune différence significative de virulence chez *G. mellonella* n'a été observée entre l'injection de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et l'injection de la solution contrôle PBS. La souche virulente de *F. tularensis* ssp. *holarctica* ne semble donc pas pathogène pour *G. mellonella* dans ces conditions. Nous n'avons donc pas testé la virulence des bactéries à l'état VBNC sur ce modèle et nous avons décidé d'arrêter cette mise au point.

II.3.2 Coculture d'amibes et de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC

Les cocultures de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC ont été réalisées avec les amibes d'espèces *Acanthamoeba castellanii* et *Acanthamoeba polyphaga*. Une précédente doctorante du laboratoire, Aurélie Hennebique, a montré que la coculture entre ces deux espèces d'amibes et une souche cultivable de *F. tularensis* ssp. *holarctica* promeut la multiplication bactérienne (124). J'ai donc voulu savoir si la coculture de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC avec les amibes, en l'absence d'autres facteurs de croissance, pouvait restaurer la capacité de pousser. Le modèle de coculture amibien que j'ai utilisé est similaires à celui mis au point par Aurélie Hennebique (124). Brièvement, les amibes ont été décongelées et maintenues en culture dans du milieu riche peptone-yeast extract-glucose (PYG). Pour la coculture, des plaques de 24 puits ont été utilisées et 10^5 amibes ont été distribuées par puits. Une fois l'adhérence des amibes obtenue, 10^7 bactéries à l'état VBNC ont été ajoutées. Les plaques ont ensuite été incubées à 27°C, 10 jours. Chaque jour, la lyse cellulaire a été évaluée par observation microscopique et la cultivabilité des bactéries par étalement de 100 µL de surnageant sur gélose PVX. Au terme des 10 jours, aucune lyse cellulaire et réactivation bactérienne n'ont été observées avec les deux espèces amibiennes *A. castellanii* et *A. polyphaga*, qu'elles aient été incubées dans un tampon de survie empêchant leur division ou dans un milieu

riche PYG. Dans ces conditions, *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC ne semble pas se réactiver.

II.3.3 Coculture de macrophages et de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC

Cette expérience a été réalisée une fois sur des macrophages murins J774 et plusieurs fois sur des macrophages de souris BMDM (pour bone marrow-derived macrophages) issus d'une collaboration avec l'équipe du Dr Thomas Henry au CIRI de Lyon. *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans un état cultivable est capable d'infecter et se répliquer dans ces deux types cellulaires (201,202). J'ai donc voulu tester si la coculture de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC, avec ces deux types cellulaires pouvait restaurer la capacité de croissance des bactéries, et si ces dernières étaient virulentes dans ces modèles. Le protocole de coculture des macrophages et *F. tularensis* était très similaire de celui des amibes. Les macrophages ont été décongelés et incubés deux jours en DMEM à 37°C. Ils ont ensuite été distribués en plaque de 24 puits à une concentration de 10^5 cellules par puits, une fois l'adhésion des macrophages réalisée, 10^7 bactéries à l'état VBNC ont été ajoutées. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C. Chaque jour, la lyse cellulaire a été évaluée par observation microscopique et la cultivabilité bactérienne par étalement de 100 µL de milieu extracellulaire sur PVX. Avec les macrophages murins J774, ni la lyse cellulaire des macrophages, ni la réactivation des bactéries n'ont été observées. Avec les macrophages de souris BMDM, qui ne se divisent pas, une lyse cellulaire et une réactivation bactérienne extracellulaire ont été observées lors d'une expérience en triplicat technique. Mais ce résultat n'a pas été reproductible lors des deux expérimentations suivantes. Nous avons également observé une réactivation bactérienne intra macrophagique 16 jours après le début de la coculture, en triplicat technique, mais là aussi ce résultat n'a pas été reproductible lors de l'expérimentation suivante.

II.3.4 Réactivation de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC

En plus des modèles de coculture présentés ci-dessus, j'ai essayé d'appliquer plusieurs changements environnementaux aux bactéries à l'état VBNC pour restaurer leurs capacités de croissance. En milieu liquide, j'ai inoculé l'équivalent de 10^8 bactéries à l'état VBNC dans

plusieurs milieux riches incubés à 37°C pendant 14 jours. Les milieux testés étaient le Sheadler K3, le BHI, le DMEM, le CO2i et le PYG. Dans chacun des cas, la cultivabilité a été évaluée 7 et 14 jours après l'inoculation, par étalement de 100 µL de suspension bactérienne sur PVX. J'ai également essayé de réactiver les bactéries à l'état VBNC en les étalant sur des milieux solides riches : 100µL de bactéries à l'état VBNC, estimées à une concentration de 10⁸ CFU/mL ont été étalées sur géloses COS à 37°C et sur géloses PVX à 4°C, 18°C, 30°C et 37°C. Aucune des expériences n'a permis de restaurer la capacité de croissance des bactéries à l'état VBNC.

III. Le protéome de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC est différent de celui à l'état cultivable

III.1 Introduction

Après avoir démontré la persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC, nous avons débuté l'analyse protéique de cet état bactérien. L'objectif de ce travail était d'identifier un marqueur protéique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC ou les protéines responsables du passage à l'état VBNC. Pour cela, j'ai extrait les protéines du protéome et de l'exoprotéome de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans 4 états : (i) en phase exponentielle ; (ii) en phase stationnaire ; (iii) en état VBNC précoce (alors que la cultivabilité décroît) ; (iv) en état VBNC tardif (plus de croissance en milieu riche). Les extraits protéiques ont été envoyés à la plateforme de protéomique du CEA Marcoule, pour en identifier les séquences protéiques. J'ai ensuite identifié les protéines, des protéomes avec des différences d'abondance relative significatives, entre les bactéries en phase stationnaire et à l'état VBNC (précoce et tardif). Faute de temps, les protéines dont l'expression est modulée en phase exponentielle par rapport à la phase stationnaire et les protéines des exoprotéomes n'ont pas pu être analysées dans le cadre de cette thèse.

L'ensemble des protéines dont l'abondance relative est significativement différente entre l'état stationnaire et les 2 états VBNC analysés sont répertoriées en Annexe. Les résultats suggèrent que les bactéries à l'état VBNC ont un remodelage de leur enveloppe bactérienne avec une répression de ces composants et des voies de synthèse (antigène-O, peptidoglycane ...). Cela pourrait avoir un impact sur la résistance au stress, la virulence et le phénotype des bactéries. Des études *in vitro* doivent maintenant être réalisées pour le confirmer.

III.2 Publication

III.2.1 Manuscrit

Comparative proteome of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in culturable and viable but non-culturable (VBNC) states

Camille D. Brunet, Mélodie Kielbasa, Julien Peyroux, Jean Armengaud, Max Maurin, Yvan Caspar

En cours d'écriture, cette version sera modifiée les prochaines semaines en vue d'une soumission.

Comparative proteome of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in culturable and viable but non-culturable (VBNC) states

Camille D. Brunet¹, Mélodie Kielbasa², Julien Peyroux^{1,3}, Jean Armengaud², Max Maurin^{1,4}, Yvan Caspar^{4,5}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France.

² Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

³ Laboratoire d'Informatique de Grenoble, Bâtiment IMAG, 38401 Saint Martin d'Hères

⁴ Centre National de Référence des *Francisella*, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

⁵ Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, 38000 Grenoble, France

* Corresponding author: Dr Yvan Caspar, CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, CS10217, 38043,15 Grenoble, Cedex 9, France, ycaspar@chu-grenoble.fr

Introduction

Francisella tularensis is the zoonotic agent of tularemia, responsible for hundreds of human infections each year in the Northern Hemisphere. It is a highly virulent Gram-negative bacterium classified in category A of potential agents of biological threat by the US Centers for Disease Control and Prevention (Oyston, Sjöstedt, et Titball 2004). Human tularemia can be caused by two subspecies: *F. tularensis* ssp. *tularensis* (type A strain) in North America and *F. tularensis* ssp. *holarctica* (*Fth*) (type B strain) all over the Northern Hemisphere, with a few strains identified in Australia the last decade (Jackson et al. 2012; Sjöstedt 2007). These subspecies cause mild to life-threatening infections according to the portal of entry of the bacteria and the clinical form of the disease (Maurin et al. 2011). In the US, the average incidence of tularemia was 0.1 per 100,000 residents from 2010 to 2019 (CDC 2021) and 0.2 per 100,000 residents in Europe from 2015 to 2019 (European Centre for Disease Prevention and Control: 2021).

Fth epidemiology includes a terrestrial and an aquatic life cycles (Maurin et Gyuranecz 2016). Human contaminations may occur from the direct contact with animal reservoirs especially during hunting activities but a significant number of cases of tularemia are today also related to mosquito or tick bites, aquatic activities (e.g., swimming or canyoning), drinking or using contaminated water (Karadenizli et al. 2015; Reintjes et al. 2002; Kantardjiev et al. 2006) or to environmental respiratory exposure to infectious aerosols in endemic areas (Ughetto et al. 2015; Väyrynen et al. 2017) . As tularemia cause common symptom, diagnostic may be delayed as some environmental risk factors are hard to identify or yet poorly characterized, especially for environmental airborne contamination.

Recently, we demonstrated the ability of *Fth* to persist for months or years in environmental water at low temperature in a viable but non culturable (VBNC) state (Brunet et al. submitted). At low temperature, the bacterium lost its capacity to grow on rich media while remaining alive.

43 Such a dormancy strategy would allow the persistence of *Fth* bacteria outside of a host for very
44 long periods in aquatic environments. The current aquatic cycle of *Fth* likely involves
45 mosquito larvae, aquatic rodents, amoeba, biofilm formation (Maurin et Gyuranecz 2016;
46 Hennebique, Boisset, et Maurin 2019) and survival of bacteria in a VBNC state. Although long-
47 term persistence in water of *Fth* has been demonstrated in a few field studies, the involved
48 mechanisms remain poorly characterized in this subspecies and the recently identified *Fth*
49 VBNC state requires to be documented more precisely.

50 Recent advances in next-generation proteomics make more comprehensive the analysis of
51 bacteria (Gouveia et al. 2020). Based on the comparison of the profile of the peptides generated
52 by trypsin for each sample and analyzed in rigorously identical conditions, most of the soluble
53 proteins are uncovered by label-free shotgun proteomics. This approach allows to identify the
54 modulation of proteins between two bacterial states and to suggest metabolic changes that occur
55 in the VBNC state. In particular, it has been used to pinpoint exotoxins and virulence factors
56 secreted by bacterial pathogens (Duport, Alpha-Bazin, et Armengaud 2019).

57 It has been reported that VBNC bacteria may also change their shape, usually from bacillus to
58 coccoid forms that may contribute to differences observable in NGS proteomics. As regards
59 *Fth*, VBNC bacteria have a smaller length and perimeter than culturable bacteria (Brunet et al.
60 submitted). To resist environmental stresses, the bacterial cell wall of VBNC bacteria can
61 become more hermetic to the external environment (Li et al. 2014). However, the membrane
62 composition and biosynthesis pathways have not been characterized in VBNC state.
63 Transcriptomics and proteomics of bacteria in VBNC state have not highlighted common
64 keystone players in every bacterial species so far and no specific signature of VBNC state has
65 yet been described. The molecular responses of microorganisms likely depend on the bacterial
66 species and the mode of induction of VBNC (Dong et al. 2020).

In order to gain insights into the molecular players involved in the proteome rewiring during the transition of *Fth* towards VBNC state, we compared the proteomes of early- and late-VBNC bacteria with stationary phase bacteria collected before their transition into VBNC state. For this purpose, two times for collecting VBNC samples were selected. Early-VBNC bacteria included culturable bacteria and VBNC bacteria while late-VBNC bacteria exclusively contained VBNC bacteria. Data suggest a protein modulation during bacterial switch into the VBNC state.

Material and Methods

Induction of F. tularensis VBNC state

We used the fully virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* biovar I clinical strain CHUGA-Ft6 (genome accession: VJBK000000000) (Kevin et al. 2020), representative of the major clade B6 found in France. It was isolated from the blood of a patient with bloodstream infection (Kevin et al. 2020). All culture assays were performed in a BSL3 laboratory. The *F. tularensis* collection of the French National Reference Center for *Francisella* is approved by the Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (France) (ANSM, authorization number ADE-103892019-7). The strain was grown on Polyvitex-enriched chocolate agar plates (PVX, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubated at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere. The VBNC state of *F. tularensis* was induced as previously described (Brunet et al. unpublished data).

Three independent aquatic microcosms were created using 225 mL of environmental water sampled from a French lake previously sterilized by filtration through a 0.22 µm filter, and 25 mL of a bacterial suspension in PBS pH7 (ThermoFisher scientific, Waltham, US) adjusted to 10⁹ CFU.mL⁻¹. All microcosms were incubated at 18°C without agitation. The first microcosm corresponded to culturable bacteria in stationary phase. Samples for proteins extraction were

taken after one-hour incubation at 18°C. The second microcosm corresponded to early-formed VBNC bacteria. Samples for proteins extraction were taken after three weeks of incubation. The third microcosm corresponded to the late VBNC bacteria after complete loss of culturability of all bacteria. Samples for proteins extraction were taken after eight weeks of incubation (Figure 1). Each of the three microcosm conditions were tested in five independent biological replicates.

Monitoring the culturability and viability of bacteria in microcosms

The culturability and viability of bacteria were monitored each week for each microcosm according to previously published protocols (Brunet et al. submitted). The culturability was measured by CFU counts after plating 100 µL of serial dilutions of bacterial suspensions from each microcosm on PVX agar plates incubated 48 h incubation at 37°C. The viability of the bacteria was determined using a specific qPCR assay after PMAxx™ Dye treatment (Biotium San Francisco, US).

Protein extraction and identification by tandem mass spectrometry

For each microcosm, 150 mL of bacterial suspension were centrifuged for 20 min at 3,400 g. After removal of the supernatant, the pellet of each sample was centrifuged 1 min at 10,000 g to eliminate the residual supernatant droplets. Then, 12 mg of the pellet were transferred in a clean microtube and 60 µL of LDS 1X (ThermoFisher scientific, Waltham, US) were added. Samples were incubated 5 min at 99°C. The samples were diluted with 120 µL additional LDS1X, sonicated briefly, and then heated 5 min at 99°C. A volume of 20 µL of each sample was subjected to denaturing electrophoresis onto a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (ThermoFisher scientific, Waltham, US). After a 4 min migration at 200 V in MES SDS running buffer (50 mM MES ([2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid], 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3), the gel was rinsed with MilliQ water, stained for 5 min with Coomassie

115 BlueSafe Stain (ThermoFisher scientific, Waltham, US), and destain with MilliQ water
116 overnight. A single gel band containing the LDS-soluble proteome of each sample was excised
117 and processed as previously described (Hartmann et al. 2014) for in-gel trypsin proteolysis with
118 sequencing-grade trypsin Gold (Promega, Madison, US) in the presence of ProteaseMAX
119 Surfactant (Promega, Madison, US). The resulting peptides (2 μ l out of 50 μ l) were analyzed
120 using a Q-Exactive HF tandem mass spectrometer (ThermoFisher scientific, Waltham, US)
121 coupled to an Ultimate 3000 nanoRSLC nano LC system (Dionex-LC Packings) essentially as
122 previously described (Klein et al. 2016). They were resolved on an Acclaim PepMap100 C18
123 nano column (3 μ m bead size, 100 Å pore size, 75 μ m internal diameter, 15 cm length, Thermo)
124 at a 0.2 μ l/min flow rate with a 3.2-20% gradient of acetonitrile for 100 min followed by a 20%-
125 32% gradient of acetonitrile for 20 min. The acquisition of MS/MS spectra was done in data-
126 dependent mode selecting the 20 most intense peptide ions with potential charges of either 2+
127 or 3+ and a dynamic exclusion of 10 s. Full-scan mass spectra were recorded from m/z 350 to
128 1800 at a resolution of 60,000 while MS/MS scans were acquired at a resolution of 15,000.
129 MS/MS spectra were assigned to peptide sequences (p value ≤ 0.05) using the MASCOT search
130 engine (version 2.5.1, Matrix Science) against the protein sequences of the FT6_faa.fasta
131 database obtained after sequencing and annotating the FT6 strain (2,091 polypeptide
132 sequences). The assignation was done with the following parameters: trypsin as enzyme,
133 maximum of two missed cleavages, mass tolerances of 5 ppm on the precursor ion and 0.02 Da
134 on the fragmented ions, fixed modification of carboxyamidomethylated cysteine, and oxidized
135 methionine as variable modification. MS and MS/MS mass tolerances were set to 5 ppm and
136 0.5 Da, respectively. Proteins were identified when at least two different peptide sequences
137 were assigned (FDR below 1%). The abundance of the identified proteins in each fraction was
138 assessed by their spectral counts corresponding to the number of MS/MS spectra assigned per
139 protein.

140 *Bioinformatics analysis*

141 Protein abundances were compared with the PatternLab tfold procedure (Carvalho, Yates, et
142 Barbosa 2012). Each protein sequence with a relative abundance between two conditions of
143 tfold >|1.2| and pvalue < 0.05 was selected and further analyzed. Protein functional description
144 was derived from sequence similarity obtained by blast against UniProt database. The
145 molecular function biological processes and cellular components gene ontologies were obtained
146 with the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>). Predicted protein functions and pathways
147 KO were identified by KEGG database (<https://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>). Cluster of
148 orthologous genes (COG) of proteins were used for additional functional annotation
149 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>). In NCBI database, 1020 proteins of *F. tularensis*
150 have a knowing COG.

151 **Results**

152 *F. tularensis* VBNC state induction

153 The bacterial culturability decreased from 10^8 to 0 CFU/ml after six weeks of incubation of
154 bacteria in poor-nutrient water at 18°C. During the reduction of the cultivability, the average
155 Ct of the qPCR-PMA remained stable at 12.5 ± 0.9 indicating that bacteria remained alive while
156 switching into a VBNC state. The stability of Ct of qPCR-PMA tests over time indicated that
157 the full initial bacterial inoculum had switched to the VBNC state. At the time of sampling, the
158 first microcosm contained 10^8 CFU/mL culturable bacteria in stationary phase, the second
159 microcosm (early-VBNC bacteria) contained 10^8 CFU/mL of total bacteria but only 10^2
160 CFU/mL (0.01%) culturable bacteria and the third microcosm (late-VBNC bacteria) contained
161 10^8 CFU/mL VBNC bacteria (Figure 1).

162 *Proteome analysis of bacterial cells' soluble proteins*

The tandem mass spectrometry dataset acquired on the samples comprised 1,231,852 MS/MS spectra. Roughly, 59% of these spectra could be assigned to peptide sequences from *F. tularensis* proteins. A total of 18,640 peptide sequences were identified, allowing the confident identification of 1,018 proteins certified with at least 2 peptides.

Compared to stationary phase bacteria, early-VBNC bacteria displayed 31 up-regulated proteins with a tfold > 1.2 and 121 proteins were down-regulated with a tfold < 1.2 (p-value < 0.05) (figure 2a). In late-VBNC bacteria, ten proteins were up-regulated with a tfold > 1.2 and 236 proteins were down-regulated with a tfold < 1.2 (p-value < 0.05) (figure 2b).

Interestingly, compared to stationary phase bacteria, among the ten proteins up-regulated (tfold >1.2) in late-VBNC bacteria, only four were also up-regulated in early-VBNC bacteria. Among the 236 proteins down-regulated (tfold <1.2) in late-VBNC state, only 53 were also down-regulated in early-VBNC state (figure 3).

Descriptions of up-regulated and down-regulated proteins are presented in Table S1. In early-VBNC bacteria, the up-regulated proteins (tfold >1.2) included five ribonucleoproteins, three metal ion binding proteins, three transferases, and two chaperones. The down-regulated proteins (tfold < 1.2) included 18 hydrolases, 12 metal ion binding proteins, 11 ATP-binding proteins, and 10 transferases. The up-regulated proteins in late-VBNC bacteria (tfold >1.2) included two hydrolases, two ATP-binding proteins, one ribonucleoprotein, one DNA-binding proteins, one isomerase, and one transporter. The down-regulated proteins (tfold <1.2) included 21 metal ion binding proteins, 18 ATP-binding proteins, 13 hydrolases, 12 transferases, 10 oxidoreductases, and eight ribonucleoproteins.

Impact of VBNC state on functional pathways

COG analysis showed that among 152 regulated proteins (tfold >|1.2|) in early-VBNC state compared to the stationary phase bacteria, 115/152 (76%) could be assigned to specific bacterial

functions (figure 4A). All up-regulated proteins were not in the same COG category. COG pathways with most proteins repressed was “M-Cell wall/membrane/envelop biogenesis” (13 proteins). The categories “E-Amino acid transport and metabolism”, “J-Translation, ribosomal structure and biogenesis”, “L-Replication, recombination and repair” were each represented by eleven down-regulated proteins. Compared to the known *F. tularensis* proteins for each of COGs, the categories with the highest percentage of down-regulated proteins among the known proteins were the “D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning” (22%) and “T-Signal transduction mechanisms” (22%).

COG analysis showed that among the 246 regulated proteins (tfold >|1.2|) in late-VBNC state compared to the stationary phase bacteria, 196/246 (80%) could be assigned to specific bacterial functions (figure 4B). All up-regulated proteins were not related to the same category. The COG pathways with the most repressed proteins were “J-Translation, ribosomal structure and biogenesis” and “M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis” with respectively 31 and 32 modulated proteins. The categories “E-Amino acid transport and metabolism”, “H-Coenzyme transport and metabolism”, and “G-Carbohydrate transport and metabolism” were represented by eleven or more down-regulated proteins. Compared to the known *F. tularensis* proteins for each of COGs, the categories with the highest percentage of down-regulated proteins among the known proteins were the “M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis” (34%) and “U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport” (30%).

Main bacterial modulation in VBNC state

Among the proposed genes encoding proteins involved in LPS and capsule expression, we found 11 down-regulated proteins in VBNC state compared to the stationary phase bacteria. ManB and FTT_0794 were down-regulated in early-VBNC bacteria; WaaY, WbtF, WbtC, Rpe and GalE in late-VBNC bacteria, and WbtM, WbtL, LpxE and FTL_1428 in both early and late-VBNC bacteria (Table 1).

Among the 17 proposed genes encoding proteins involved in type IV pili synthesis (Rowe et Huntley 2015), five proteins were regulated in VBNC state. PilB was down-regulated in early-VBNC bacteria; PilC and PilE6 in late-VBNC bacteria and PilQ in both states. On the contrary, PilO was up-regulated in early-VBNC bacteria (Table 2).

Several enzymes involved in peptidoglycan precursor biosynthesis were down-regulated in the VBNC state: MurF and Ddl in late-VBNC bacteria and MurA, MurB, MurE in both early and late-VBNC bacteria (Table 3).

As for proteins synthesis, in early-VBNC bacteria five ribonucleoproteins were up-regulated. In late-VBNC bacteria, one ribonucleoprotein was up-regulated and 14 ribonucleoproteins and the ribosome silencing factor (RsfS) were down-regulated (Table 4).

Concerning the *Francisella* pathogenicity Island (FPI): the two transcription regulators SspA and PigR were down-regulated in late-VBNC bacteria while nine FPI proteins were down-regulated in early-VBNC bacteria: PdpA, PdpB, PdpC, VgrC, IglB, IglD, IglF, IglH, IglI (Table 5).

Discussion

To explore the molecular modifications of *Fth* VBNC state, we performed next-generation proteomic analyses of VBNC bacteria induced in poor-nutrient water at 18°C, as previously reported (Brunet et al. submitted). The results did not identify a specific marker of VBNC state but showed global down-regulation of many bacterial metabolic categories such as “Cell wall/membrane/envelope biogenesis”. How these down-regulated proteins impact the virulence of VBNC bacteria is an open question to date. Virulence may be decreased to limit energy consumption by bacterial cells (Zhao et al. 2016). Noteworthy, several bacterial species produce toxins in a VBNC state (e.g., *Vibrio* sp.) while others do not (e.g., *Escherichia coli*) (Ramamurthy et al. 2014). Hitherto, the level of virulence of *F. tularensis* in the VBNC state

remains unknown and will have to be assessed in infection assays. However, monitoring the production of virulence factors proteins is worth the effort as it could be an indicator of infectiousness of *F. tularensis* in VBNC state. Results seems to show a reduced expression of several *Fth* virulence factors that could affect the infectiousness of *Fth* or its impact on the immune system.

In particular, we observed a potential modification of the composition of the cell wall assessed by a modification of the expression of the proteins involved in the capsule, LPS, type IV pili and peptidoglycan synthesis. In 2020, two studies proposed a list of genes involved in the expression of *F. tularensis* capsule and LPS compounds (Catanzaro et Inzana 2020; Rowe et Huntley 2015). Among the 41 proposed genes encoding proteins involved in LPS expression and capsule expression, we found 11 down-regulated proteins in VBNC state compared to the bacteria in the stationary phase.

The O-antigen is composed of a 792-Da repeating unit. It is a compound of LPS and the unique compound of *Fth* capsule. The absence of O-antigen is correlated with reduced virulence of *F. tularensis*. Indeed, the O-antigen of the capsule and the LPS *F. tularensis* prevent IgM and C3 components to bind to the surface of the bacteria (Catanzaro et Inzana 2020; Rowe et Huntley 2015). O-antigen synthesis is mediated by glucosyltransferase (Wbt proteins) and the deletion of the genes encoding these proteins correlates with the loss of sO-antigen expression in *F. tularensis* LVS strain (Catanzaro et Inzana 2020). In this study, we found a repression of proteins responsible for the synthesis of O-antigen (Wbt proteins), core-sugar attachment (ManB), and lipid A biosynthesis (Lpx proteins). These results correspond to a major redesign of cell wall structure and regulation of virulence factors (Rowe et Huntley 2015).

Type IV pili allow adherence of bacteria. Their deletion induces a loss of virulence of *Fth* but the mechanisms are poorly understood known (Catanzaro et Inzana 2020). We found a regulation of type IV pili in VBNC state. Interestingly, PilB, PilC and PilQ are three down-

261 regulated proteins in the VBNC state. Their respective genes are homologous to genes involved
262 in type II secretion systems, while *F. tularensis* does not have a type II secretion system
263 (Näslund Salomonsson, Forslund, et Forsberg 2011).

264 Peptidoglycan has a role in determining cell shape and the maintenance of cell integrity during
265 cell division (Pazos et Peters 2019). Major proteins involved in peptidoglycan precursor
266 synthesis (MurA, MurB and MurE) were down-regulated in early and late-VBNC bacteria.
267 These modifications must have occurred quickly after the start of the decline of culturability.
268 As bacteria become non-culturable, they do not need peptidoglycan synthesis because they no
269 longer multiply.

270 O-antigen, capsule, LPS, type IV pili are cell wall structures involved in bacterial virulence.
271 Their down-regulation in VBNC state supports the hypothesis that bacteria might have reduced
272 virulence in this state (Li et al. 2014).

273 Another point in favor of the potential decrease in virulence of *F. tularensis* in VBNC state, is
274 the under-expression of seven proteins encoded in FPI in early-VBNC. These proteins are
275 constituents of the type-VI secretion system of the bacteria, required for the phagosomal escape
276 of the bacteria during infection (Spidlova et al. 2020). Transcription regulators of FPI PigR and
277 SspA were also down-regulated in late-VBNC state (Cuthbert et al. 2017; Dai et al. 2011).

278 Globally, proteins synthesis is impacted by ribosome protein expression. Ribonucleoproteins
279 that were up-regulated in VBNC state were identified in early-VBNC state, except one. On the
280 opposite, ribonucleoproteins that were down-regulated were exclusively evidenced in the late-
281 VBNC bacteria. These data suggest that global protein synthesis may be repressed after total
282 loss of culturability, while some proteins that are necessary to persist in stress environment are
283 produced at the beginning of bacterial stress leading to the switch into VBNC state.

In conclusion, this is the first descriptive proteomic analysis of *Fth* VBNC bacteria. While we observed significant differences between VBNC state and bacteria in stationary phase, we did not find any specific marker for VBNC state transition. We mainly identified a down-regulation of proteins involved in the synthesis or modeling of the external surface of the bacteria and of virulence factors, which could correlate with the modulation of the shape and the reduced size of the bacteria and with an impact on the virulence of *F. tularensis* VBNC bacteria. Future studies will be necessary to better characterize these modifications and study the actual virulence of *Fth* bacteria in their VBNC state in animal infection models.

References

- Carvalho, Paulo C., John R. Yates, et Valmir C. Barbosa. 2012. « Improving the TFCold Test for Differential Shotgun Proteomics ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (12): 1652-1654. doi:10.1093/bioinformatics/bts247.
- Catanzaro, Kelly C. Freudenberger, et Thomas J. Inzana. 2020. « The Francisella Tularensis Polysaccharides: What Is the Real Capsule? » *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, février. doi:10.1128/MMBR.00065-19.
- CDC. 2021. « Tularemia Data and Surveillance | CDC ». *Centers for Disease Control and Prevention*. <https://www.cdc.gov/tularemia/statistics/index.html>.
- Cuthbert, Bonnie J., Wilma Ross, Amy E. Rohlfing, Simon L. Dove, Richard L. Gourse, Richard G. Brennan, et Maria A. Schumacher. 2017. « Dissection of the Molecular Circuitry Controlling Virulence in Francisella Tularensis ». *Genes & Development* 31 (15): 1549-1560. doi:10.1101/gad.303701.117.
- Dai, Shipan, Nrusingh Mohapatra, Larry Schlesinger, et John Gunn. 2011. « Regulation of Francisella Tularensis Virulence ». *Frontiers in Microbiology* 1. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00144>.

308 Dong, Kai, Hanxu Pan, Dong Yang, Lei Rao, Liang Zhao, Yongtao Wang, et Xiaojun Liao.
 309 2020. « Induction, Detection, Formation, and Resuscitation of Viable but Non-
 310 Culturable State Microorganisms ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*
 311 *Safety* 19 (1): 149-183. doi:10.1111/1541-4337.12513.

312 Duport, Catherine, Béatrice Alpha-Bazin, et And Jean Armengaud. 2019. « Advanced
 313 Proteomics as a Powerful Tool for Studying Toxins of Human Bacterial Pathogens ». *Toxins* 11 (10): E576. doi:10.3390/toxins11100576.

315 European Centre for Disease Prevention and Control: 2021. *AER-tularaemia-2019.pdf*.
 316 <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-tularaemia-2019.pdf>.

317 Gouveia, Duarte, Lucia Grenga, Olivier Pible, et Jean Armengaud. 2020. « Quick Microbial
 318 Molecular Phenotyping by Differential Shotgun Proteomics ». *Environmental*
 319 *Microbiology* 22 (8): 2996-3004. doi:10.1111/1462-2920.14975.

320 Hartmann, Erica Marie, François Allain, Jean-Charles Gaillard, Olivier Pible, et Jean
 321 Armengaud. 2014. « Taking the Shortcut for High-Throughput Shotgun Proteomic
 322 Analysis of Bacteria ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1197: 275-285.
 323 doi:10.1007/978-1-4939-1261-2_16.

324 Hennebique, Aurélie, Sandrine Boisset, et Max Maurin. 2019. « Tularemia as a Waterborne
 325 Disease: A Review ». *Emerging Microbes & Infections* 8 (1): 1027-1042.
 326 doi:10.1080/22221751.2019.1638734.

327 Jackson, Justin, Alistair McGregor, Louise Cooley, Jimmy Ng, Mitchell Brown, Chong Wei
 328 Ong, Catharine Darcy, et Vitali Sintchenko. 2012. « *Francisella tularensis* Subspecies
 329 *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011 ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (9):
 330 1484-1486. doi:10.3201/eid1809.111856.

331 Kantardjiev, Todor, Ivan Ivanov, Tzvetan Velinov, Plamen Padeshki, Boris Popov, Roumiana
 332 Nenova, et Milcho Mincheff. 2006. « Tularemia Outbreak, Bulgaria, 1997-2005 ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (4): 678-680. doi:10.3201/eid1204.050709.
 333
 334 Karadenizli, A., M. Forsman, H. Şimşek, M. Taner, C. Öhrman, K. Myrtenäs, A. Lärkeryd, A.
 335 Johansson, L. Özdemir, et A. Sjödin. 2015. « Genomic Analyses of *Francisella*
 336 *Tularensis* Strains Confirm Disease Transmission from Drinking Water Sources,
 337 Turkey, 2008, 2009 and 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies*
 338 *Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 20 (21).
 339 doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.21.21136.
 340 Kevin, Maëlllys, Guillaume Girault, Yvan Caspar, Moulay Ali Cherfa, Christiane Mendy,
 341 Herbert Tomaso, Dolores Gavier-Widen, et al. 2020. « Phylogeography and Genetic
 342 Diversity of *Francisella Tularensis* Subsp. *Holarctica* in France (1947–2018) ». *Frontiers in Microbiology* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00287.
 343
 344 Klein, Géraldine, Christelle Mathé, Mathilde Biola-Clier, Stéphanie Devineau, Emilie
 345 Drouineau, Elie Hatem, Laurent Marichal, et al. 2016. « RNA-Binding Proteins Are a
 346 Major Target of Silica Nanoparticles in Cell Extracts ». *Nanotoxicology* 10 (10):
 347 1555-1564. doi:10.1080/17435390.2016.1244299.
 348 Li, Laam, Nilmini Mendis, Hana Trigui, James D. Oliver, et Sebastien P. Faucher. 2014. « The
 349 Importance of the Viable but Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens ». *Frontiers in Microbiology* 5 (juin). doi:10.3389/fmicb.2014.00258.
 350
 351 Maurin, Max, et Miklós Gyuranecz. 2016. « Tularaemia: Clinical Aspects in Europe ». *The*
 352 *Lancet Infectious Diseases* 16 (1): 113-124. doi:10.1016/S1473-3099(15)00355-2.
 353 Maurin, Max, Isabelle Pelloux, Jean Paul Brion, Jeanne-Noëlle Del Banõ, et Aleth Picard. 2011.
 354 « Human Tularemia in France, 2006–2010 ». *Clinical Infectious Diseases* 53 (10):
 355 e133-e141. doi:10.1093/cid/cir612.

356 Näslund Salomonsson, Emelie, Anna-Lena Forslund, et Åke Forsberg. 2011. « Type IV Pili in
 357 Francisella – A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen ». *Frontiers in*
 358 *Microbiology* 2: 29. doi:10.3389/fmicb.2011.00029.

359 Oyston, Petra C. F., Anders Sjöstedt, et Richard W. Titball. 2004. « Tularaemia: Bioterrorism
 360 Defence Renews Interest in Francisella Tularensis ». *Nature Reviews Microbiology* 2
 361 (12): 967-978. doi:10.1038/nrmicro1045.

362 Pazos, Manuel, et Katharina Peters. 2019. « Peptidoglycan ». In *Bacterial Cell Walls and*
 363 *Membranes*, édité par Andreas Kuhn, 92:127-168. Cham: Springer International
 364 Publishing. doi:10.1007/978-3-030-18768-2_5.

365 Ramamurthy, Thandavarayan, Amit Ghosh, Gururaja P. Pazhani, et Sumio Shinoda. 2014.
 366 « Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria ». *Frontiers in Public Health* 2 (juillet). doi:10.3389/fpubh.2014.00103.

368 Reintjes, Ralf, Isuf Dedushaj, Ardiana Gjini, Tine Rikke Jorgensen, Benvon Cotter, Alfons
 369 Lieftucht, Fortunato D'Ancona, et al. 2002. « Tularemia Outbreak Investigation in
 370 Kosovo: Case Control and Environmental Studies ». *Emerging Infectious Diseases* 8
 371 (1): 69-73.

372 Rowe, Hannah M., et Jason F. Huntley. 2015. « From the Outside-In: The Francisella tularensis
 373 Envelope and Virulence ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5
 374 (décembre): 94. doi:10.3389/fcimb.2015.00094.

375 Sjöstedt, A. 2007. « Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical
 376 Manifestations ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105 (1): 1-29.
 377 doi:10.1196/annals.1409.009.

378 Spidlova, Petra, Pavla Stojkova, Anders Sjöstedt, et Jiri Stulik. 2020. « Control of Francisella
 379 Tularensis Virulence at Gene Level: Network of Transcription Factors ». *Microorganisms* 8 (10): 1622. doi:10.3390/microorganisms8101622.

381 Ughetto, Estelle, Geneviève Héry-Arnaud, Marie-Estelle Cariou, Isabelle Pelloux, Max
 382 Maurin, Jocelyne Caillon, Philippe Moreau, Jean-François Ygout, et Stéphane Corvec.
 383 2015. « An Original Case of *Francisella Tularensis* Subsp. *Holarctica* Bacteremia after
 384 a near-Drowning Accident ». *Infectious Diseases (London, England)* 47 (8): 588-590.
 385 doi:10.3109/23744235.2015.1028099.

386 Väyrynen, Sara A., Elina Saarela, Janne Henry, Sini Lahti, Terttu Harju, et Heikki Kauma.
 387 2017. « Pneumonic Tularaemia: Experience of 58 Cases from 2000 to 2012 in Northern
 388 Finland ». *Infectious Diseases (London, England)* 49 (10): 758-764.
 389 doi:10.1080/23744235.2017.1341054.

390 Zhao, Feng, Yongtao Wang, Haoran An, Yanling Hao, Xiaosong Hu, et Xiaojun Liao. 2016.
 391 « New Insights into the Formation of Viable but Nonculturable *Escherichia Coli*
 392 O157:H7 Induced by High-Pressure CO₂ ». Édité par Stephanie Doores. *MBio* 7 (4).
 393 doi:10.1128/mBio.00961-16.

394

395 **Tables**

396 Table 1: *F. tularensis* proteins involved in capsule and LPS biosynthesis and regulated in VBNC state vs. stationary phase

Name	Gene (FTT)	Gene (LVS)	Proteins	Modulation in VBNC bacteria	VBNC state	tfold
WbtM	FTT_1450c	FTL_0606	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	down-regulated	early and late	-1,26
WbtL	FTT_1451c	FTL_0485	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	down-regulated	early and late	-1,21
WbtC	FTT_1462c	FTL_0594	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein	down-regulated	late	-1,33
WbtF	FTT_1459c	FTL_0597	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein	down-regulated	late	-1,23
ManB	FTT_1447c	FTL_0609	phosphoglucomutase/phosphomannomutase, alpha/beta/alpha domain III family protein	down-regulated	early	-1,42
LpxH	FTT_0436c	FTL_0506	UDP-2,3-diacylglucosamine diphosphatase	down-regulated	late	-1,76
LpxC	FTT_0189	FTL_1906	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N- acetylglucosamine deacetylase	down-regulated	late	-1,22
Rpe	FTT_0789	FTL_1432	Ribulose-phosphate 3-epimerase	down-regulated	late	-1,23
GalE	FTT_0791	FTL_1430	UDP-glucose 4-epimerase	down-regulated	late	-1,39
	FTT_0793	FTL_1428	ABC transporter, ATP-binding and membrane protein	down-regulated	early and late	-2,50
	FTT_0794	FTL_1427	HAD-IB family phosphatase	down-regulated	early	-2,10
LpxE	FTT_0891	FTL_0393	PAP2 superfamily protein	down-regulated	early and late	-1,4
WaaY	FTT_1236	FTL_0708	Glycosyltransferase family 4 protein	down-regulated	late	-1,34

397

398 Table 2: *F. tularensis* proteins involved in type IV pilus biosynthesis and regulated in VBNC state vs. stationary phase

Name	Gene (FTT)	Gene (LVS)	Proteins	Modulation in VBNC bacteria	VBNC state	tfold
PilB	FTT_1133	FTL_0828	type IV-A pilus assembly ATPase PilB	down-regulated	early	-1,23
PilC	FTT_1134	FTL_0827	Type IV pili polytopic inner membrane protein	down-regulated	late	-1,53
PilE6	FTT_1314c	FTL_1475	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein	down-regulated	late	-2,33
PilQ	FTT_1156c	FTL_0800	Type IV pilus secretin PilQ family protein	down-regulated	early and late	-1,41
PilO	FTT_1158c	FTL_0798	Type IV pili glycosylation protein, pilO family	up-regulated	early	1,29

399

400 Table 3: *F. tularensis* proteins involved in peptidoglycan biosynthesis and regulated in VBNC state vs. stationary phase

Name	Gene (FTT)	Gene (LVS)	Proteins	Modulation in VBNC bacteria	VBNC state	tfold
MurA	FTT_1305c	FTL_0413	UDP-N-acetylglucosamine-1-carboxyvinyltransferase	down-regulated	early and late	-1,35
MurB	FTT_1304c	FTL_0412	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	down-regulated	early and late	-1,22
MurE	FTT_0420	FTL_0490	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	down-regulated	early and late	-1,62
MurF	FTT_0422	FTL_0492	UDP-N--acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanyl ligase	down-regulated	late	-1,24
Ddl	FTT_0185	FTL_1910	D-alanine--D-alanine ligase family protein	down-regulated	late	-1,22

401

402 Table 4: *F. tularensis* ribosomal proteins regulated in VBNC state vs. stationary phase

Name	Gene (FTT)	Gene (LVS)	Proteins	Modulation in VBNC bacteria	VBNC state	tfold
RpsF	FTT_1062c	FTL_1024	30S ribosomal protein S6	up-regulated	early	1,21
RpsS	FTT_0329	FTL_0240	30S ribosomal protein S19	up-regulated	early	1,25
RplS	FTT_0153	FTL_1735	50S ribosomal protein L19	up-regulated	early	1,24
RplT	FTT_0820	FTL_1404	50S ribosomal protein L20	up-regulated	early	1,28
RpmE	FTT_0366	FTL_1303	50S ribosomal protein L31	up-regulated	early	1,29
RpmI	FTT_0819	FTL_1405	50S ribosomal protein L35	up-regulated	late	1,47
RplA	FTT_0141	FTL_1747	50S ribosomal protein L1	down-regulated	late	-1,24
RplB	FTT_0328	FTL_0239	50S ribosomal protein L2	down-regulated	late	-1,21
RpsE	FTT_0342	FTL_0253	30S ribosomal protein S5	down-regulated	late	-1,23
RplF	FTT_0340	FTL_0251	50S ribosomal protein L6	down-regulated	late	-1,33
RplJ	FTT_0142	FTL_1746	50S ribosomal protein L10	down-regulated	late	-1,3
RpsM	FTT_0347	FTL_0258	30S ribosomal protein S13	down-regulated	late	-1,26
RplM	FTT_1273	FTL_1187	50S ribosomal protein L13	down-regulated	late	-1,22
RplN	FTT_0335	FTL_0246	50S ribosomal protein L14	down-regulated	late	-1,28
RpmA	FTT_0773	FTL_1452	50S ribosomal protein L27	down-regulated	late	-1,53
RpmB	FTT_1603	FTL_0522	50S ribosomal protein L28	down-regulated	late	-1,32
RpmC	FTT_0333	FTL_0244	50S ribosomal protein L29	down-regulated	late	-1,22
RpmD	FTT_0343	FTL_0254	50S ribosomal protein L30	down-regulated	late	-1,35
RpmF	FTT_1371	FTL_1143	50S ribosomal protein L32	down-regulated	late	-1,67
RpmG	FTT_1604	FTL_0521	50S ribosomal protein L33	down-regulated	late	-1,31

403

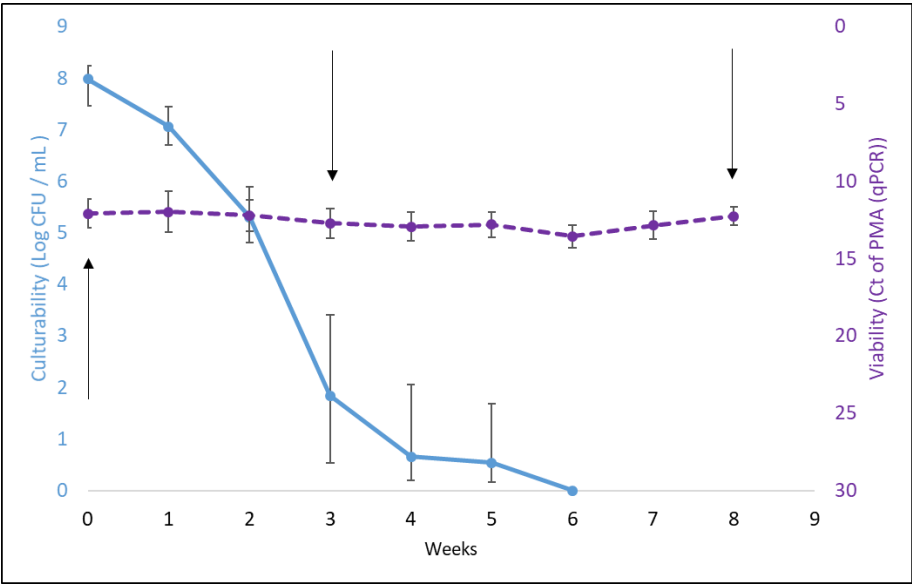
404 Table 5 : FPI proteins and FPI transcription regulators regulated in *Fth* VBNC state vs. stationary phase

Name	Gene (FTT)	Gene (LVS)	Proteins	Modulation in VBNC bacteria	VBNC state	tfold
SspA	FTT_0458	FTL_1606	stringent starvation protein A	down-regulated	late	-1,42
PigR	FTT_0383	FTL_0449	pathogenicity island gene regulator	down-regulated	late	-1,34
PdpA	FTT_1344 / FTT_1699	FTL_0126 / FTL_1172	Pathogenicity determinant protein A	down-regulated	Early	-1,45
PdpB	FTT_1345 / FTT_1700	FTL_0125 / FTL_1171	Pathogenicity determinant protein B	down-regulated	Early	-1,37
PdpC	FTT_1354 / FTT_1709	FTL_0116 / FTL_1162	Pathogenicity determinant protein C	down-regulated	Early	-1,33
VgrG	FTT_1347 / FTT_1702	FTL_0123 / FTL_1169	Valine-glycine repeat protein G	down-regulated	Early	-1,61
IglB	FTT_1358c / FTT_1713c	FTL_0112 / FTL_1158	intracellular growth locus subunit B	down-regulated	Early	-1,35
IglD	FTT_1356c / FTT_1711	FTL_0114 / FTL_1160	Intracellular growth locus D	down-regulated	Early	-1,24
IglF	FTT_1348 / FTT_1703	FTL_0122 / FTL_1168	Intracellular growth locus F	down-regulated	Early	-1,69
IglH	FTT_1350 / FTT_1705	FTL_0120 / FTL_1166	Intracellular growth locus H	down-regulated	Early	-1,28
IglI	FTT_1352 / FTT_1707	FTL_0118	FPI, Intracellular growth locus I	down-regulated	Early	-1,23

405

406

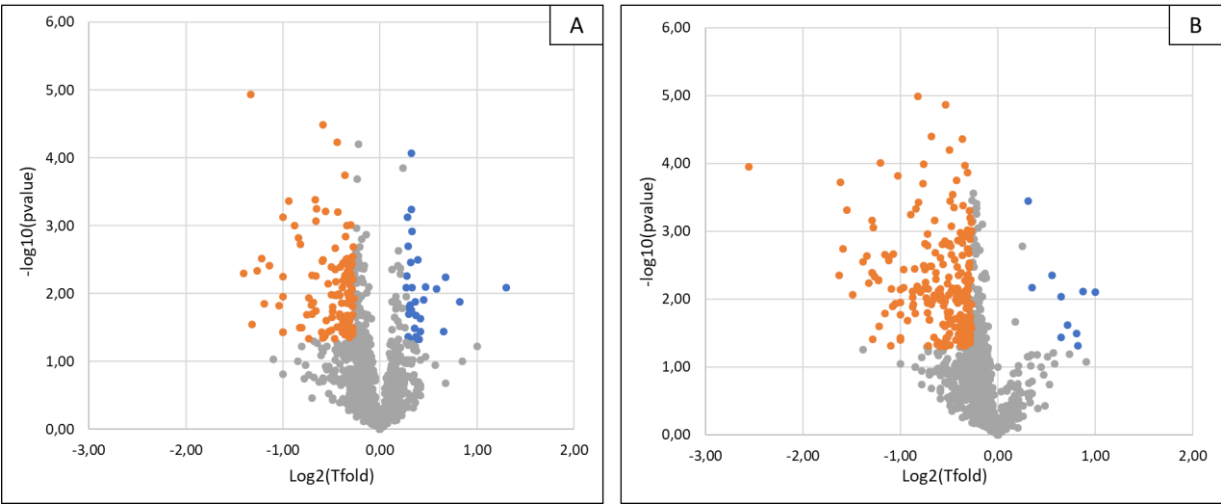
III.2.2 Figures et légendes



407

408 Figure 1: Culturability and viability of *F. tularensis* ssp. *holarctica* in the microcosms. *F.*
409 *tularensis* ssp *holarctica* was incubated in poor-nutrient water at 18°C. Blue: culturability was
410 evaluated by bacterial suspension dilution, spread on PVX agar plates and CFU counts. Purple:
411 viability was evaluated by PMA-qPCR assay. Three different microcosm conditions were
412 evaluated. The arrows represent the week of protein extraction for each condition. Each
413 microcosm was performed in five replicates.

414



415

Figure 2: Volcano plot representing proteins changes in relative abundance in early-VBNC state (A) and late-VBNC state (B). The significant cut-off was set a $p < 0.05$ (Student t test) and the biological cut-off was set to Tfold change of $|1.2|$. Bleu: proteins up-regulated in VBNC state. Orange: proteins down-regulated in VBNC state. Grey: proteins insignificantly regulated in VBNC state.

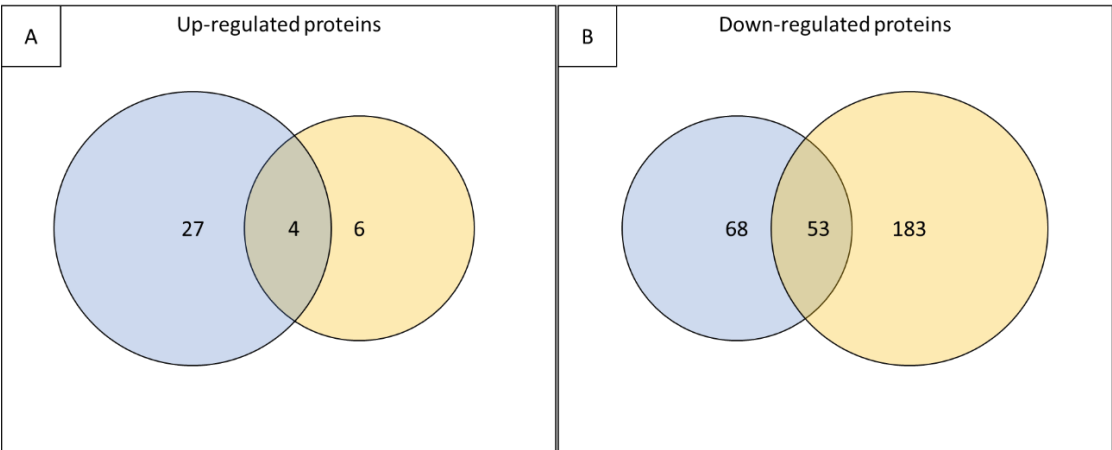


Figure 3: Comparison of proteins modulated in early-VBNC and in late-VBNC

A: Total of proteins up-regulated in both VBNC state with Tfold > 1.2 . B: Total of proteins down-regulated proteins with Tfold < 1.2 . Blue circle: Number of proteins modulated in early-VBNC, orange circle: Number of proteins modulated in late-VBNC. Pvalue (student t test) < 0.05 .

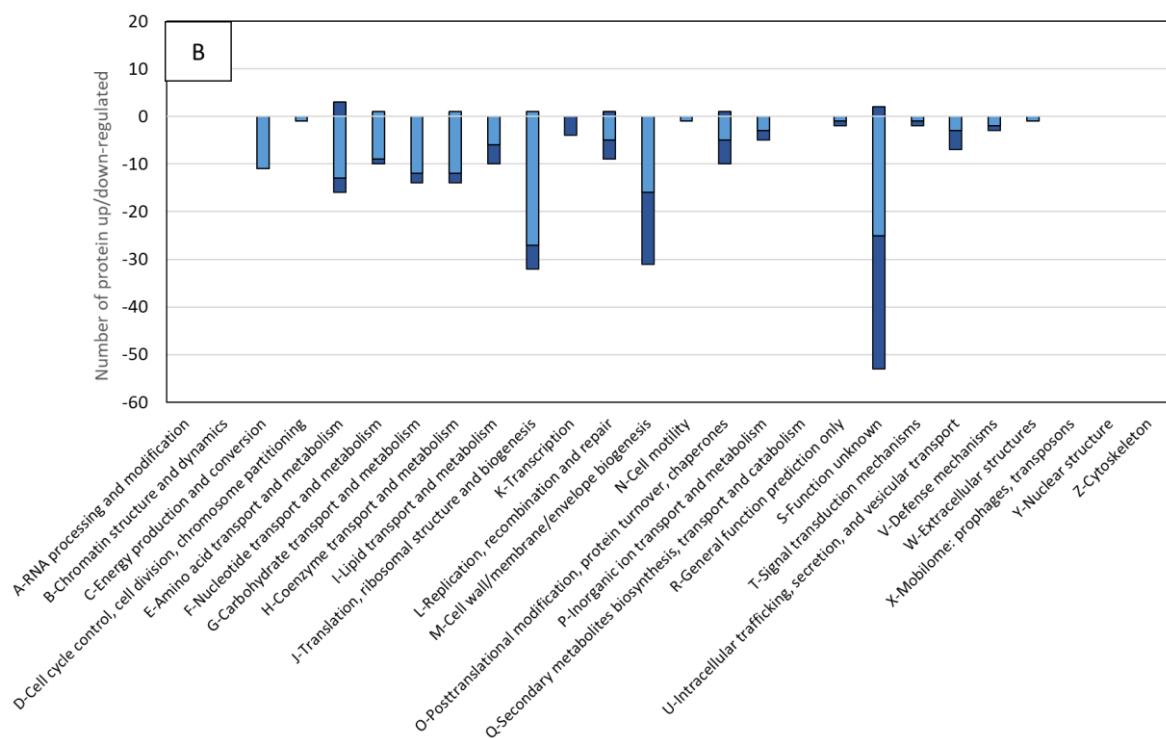
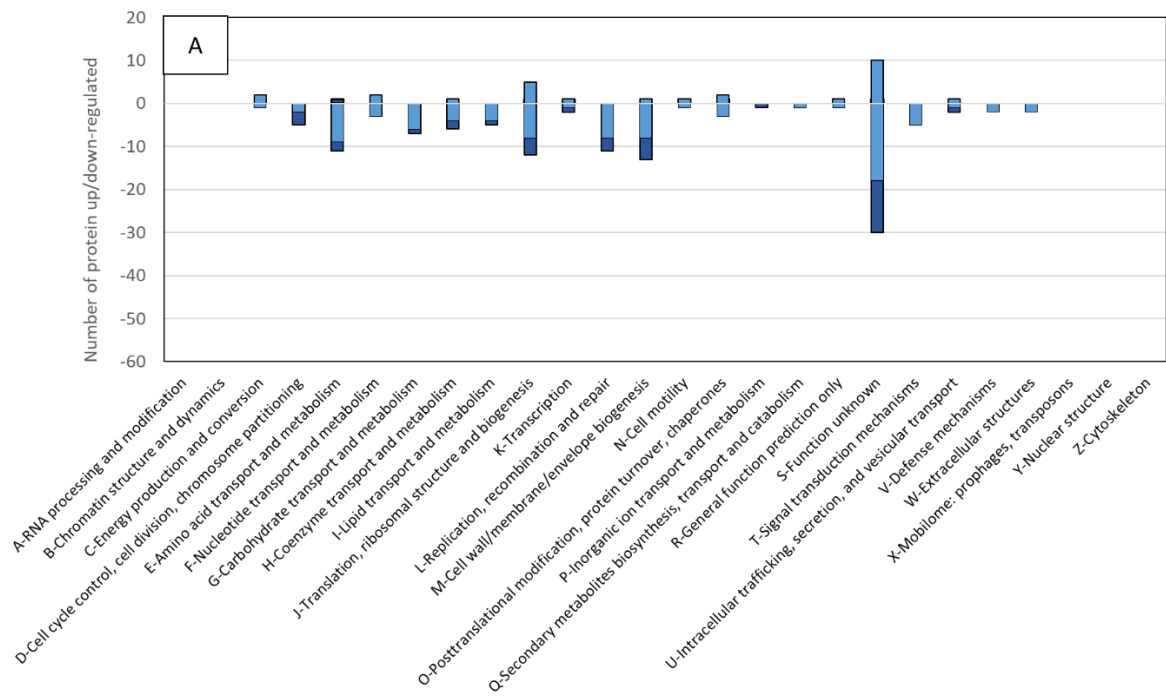


Figure 4: Classification of differentially abundant proteins in early-VBNC (A) and late-VBNC (B) according to Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) classification. Positive axe: number of proteins up-regulated, negative axe: number of proteins down-regulated. Dark blue: number of proteins regulated with a Tfold $\geq |1.5|$ and light blue: number of proteins regulated with a Tfold $> |1.2|$ and $< |1.5|$. P-value (Student t-test < 0.05).

436 Table S1: Proteins of each COG modulated in VBNC state

	number of proteins known for each COG category in <i>F. tularensis</i>	Number of proteins modulated in early-VBNC vs. stationary phase		Number of proteins modulated in late-VBNC vs. stationary phase	
		up-regulated	down-regulated	up-regulated	down-regulated
A-RNA processing and modification	1	0	0	0	0
B-Chromatin structure and dynamics	0	0	0	0	0
C-Energy production and conversion	70	2 (3%)	1 (1%)	0	12 (17%)
D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	23	0	5 (22%)	0	2 (9%)
E-Amino acid transport and metabolism	80	1 (1%)	11 (14%)	3 (4%)	16 (20%)
F-Nucleotide transport and metabolism	58	2 (3%)	4 (7%)	1 (2%)	11 (19%)
G-Carbohydrate transport and metabolism	51	0	7 (14%)	0	14 (27%)
H-Coenzyme transport and metabolism	79	1 (1%)	6 (8%)	1 (1%)	16 (20%)
I-Lipid transport and metabolism	47	0	5 (11%)	0	10 (21%)
J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	154	6 (4%)	11 (7%)	1 (1%)	32 (21%)
K-Transcription	36	2 (6%)	2 (6%)	0	4 (11%)
L-Replication, recombination and repair	67	0	11 (16%)	1 (1%)	9 (13%)
M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	91	1 (1%)	13 (14%)	0	31 (34%)
N-Cell motility	16	1 (6%)	1 (6%)	0	1 (6%)
O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	58	3 (5%)	3 (5%)	1 (2%)	10 (17%)
P-Inorganic ion transport and metabolism	45	0	1 (2%)	0	5 (11%)
Q-Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	8	0	1 (13%)	0	0
R-General function prediction only	54	1 (2%)	1 (2%)	0	2 (4%)
T-Signal transduction mechanisms	23	0	5 (22%)	0	2 (9%)
U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	23	1 (4%)	2 (9%)	0	7 (30%)
V-Defense mechanisms	21	0	2 (10%)	0	3 (14%)
W-Extracellular structures	12	0	2 (17%)	0	1 (8%)
X-Mobilome: prophages, transposons	2	0	0	0	0
Y-Nuclear structure	0	0	0	0	0
Z-Cytoskeleton	1	0	0	0	0

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

F. tularensis est une bactérie zoonotique avec un réservoir animal et un réservoir aquatique encore mal caractérisé. Bien que la tularémie soit une maladie relativement peu commune, ses formes graves et la classification de *F. tularensis* comme agent potentiel de bioterrorisme imposent de mieux appréhender ses réservoirs environnementaux, afin d'obtenir des données de persistance de cette bactérie dans l'environnement en cas de dispersion volontaire ou accidentelle.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le projet Tulamibe du laboratoire, financé par l'ANR ASTRID [ANR-17-ASTR-0024], avec pour objectif de caractériser le réservoir aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Le projet Tulamibe consistait à :

- définir précisément les conditions optimales de survie prolongée de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans divers environnements hydro-telluriques, en développant des modèles expérimentaux de contamination tellurique ou hydrique, en présence ou non d'hôtes eucaryotes tels que les amibes ;
- caractériser les conditions et mécanismes de formation de biofilm par *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans différents environnements hydro-telluriques naturels ;
- détecter *F. tularensis* ssp. *holarctica* et les autres espèces de *Francisella* dans un environnement hydro-tellurique naturel ;
- comprendre les mécanismes de persistance des *Francisella*, et plus particulièrement de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, dans l'environnement ;
- évaluer diverses stratégies permettant d'éliminer *F. tularensis* ou de réduire la charge infectieuse de cette bactérie dans un environnement hydro-tellurique contaminé.

Au début de ce projet, il était déjà établi que *F. tularensis* ssp. *holarctica* survivait dans l'eau, (128,129,149) mais la durée de cette survie ainsi que les mécanismes impliqués étaient insuffisamment caractérisés. Pour les explorer, des études sur le biofilm et sur l'interaction avec les amibes ont été réalisées au sein du laboratoire. Les objectifs de mon doctorat étaient de définir précisément les conditions optimales de survie prolongée de l'espèce virulente *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'environnement aquatique, et de mieux caractériser les mécanismes de persistance aquatique.

Ce travail de thèse s'est articulé autour de plusieurs étapes relatives à la persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'eau :

- l'identification d'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans des environnements aquatiques par des campagnes de terrain ;
- la démonstration de la survie *in vitro* de *F. tularensis* ssp. *holarctica* pendant plusieurs mois dans l'eau à basse température sans ajout de nutriments ;
- la démonstration de la sensibilité à la température de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC ;
- la démonstration du passage de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans un état de dormance appelé état viable mais non cultivable (VBNC) en condition axénique ;
- la caractérisation protéique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC.

Une des difficultés de ce travail était due aux contraintes réglementaires de la manipulation de *F. tularensis*. Pour que les données soient transposables à la tularémie, nous avons souhaité construire nos expériences sur une souche virulente et non pas sur la souche vaccinale atténuée LVS, ou sur une souche appartenant à l'espèce *F. novicida* fréquemment utilisée comme modèle. En effet, la virulence de ces souches pour les humains est bien moindre que celle de *F. tularensis*. En France, cette bactérie est classée MOT par l'ANSM, ce qui nous impose une manipulation en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Ainsi, les expériences sur bactéries vivantes ont été limitées par les techniques disponibles dans ce laboratoire. J'ai ainsi dû mettre au point des expériences (comme l'évaluation de la viabilité) réalisables avec peu ou pas d'automates. Cette législation limite aussi les collaborations, puisque l'envoi de matériels bactériens inactivés n'est possible que dans les laboratoires possédant les autorisations MOT et que les échanges internationaux sont extrêmement restreints par les réglementations propres à chaque pays. Pour cela, nous avons pu réaliser les analyses de protéomique au laboratoire du CEA-Macroule.

Ce doctorat à tout de même été l'occasion pour moi de participer à plusieurs travaux de recherche en collaboration. Après l'échec de mes expériences d'infection de *G. mellonella* par *F. tularensis* ssp. *holarctica*, j'ai participé à la mise au point de ce modèle d'infection pour *F. novicida* (203). Travaillant sur des thématiques très proches, j'ai aussi participé aux expériences évaluant la survie des *Francisella* en présence d'amibes (124).

Je me suis particulièrement investie dans une collaboration avec une équipe algérienne. Nous avons exploré la présence de *F. tularensis* dans le réservoir animal en Algérie. Pour cela, des lagomorphes ont été prélevés sur le territoire algérien et *F. tularensis* a été recherchée par des outils de dépistages. L'objectif de ce travail était de démontrer formellement pour la

première fois, la présence de l'agent étiologique de la tularémie, sur le continent Africain et plus précisément dans les lièvres, connus pour être réservoir de *F. tularensis*, dans les pays endozootique. Mon travail pour cette collaboration a consisté à mettre au point et réaliser les extractions d'ADN de rate et foie des rongeurs. J'ai ensuite réalisé les qPCR sur ces extraits d'ADN pour rechercher l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Nous avons ainsi montré la présence d'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans deux rates de lièvres sur 74 animaux testés. Un foie de lièvre s'est également révélé positif en immunohistochimie pour *F. tularensis*. Nous en avons conclu qu'il est très probable que la tularémie soit aussi présente sur le continent Africain. Des études complémentaires sont nécessaires pour détecter d'éventuelles contaminations humaines (Ammam et al. soumis).

Outre les collaborations, ce travail de doctorat s'est intéressé à plusieurs aspects de la persistance aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, avec des études de terrain et des expérimentations *in vitro*. L'ensemble des travaux ont permis de compléter le cycle aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et de confirmer la persistance de cette bactérie en milieu aquatique à l'état VBNC sur des périodes très longues et en dehors de tout hôte.

Les deux campagnes de prélèvements ont été réalisées dans l'Ouest de la France suite à une augmentation des cas de tularémie en 2018 (107). Nous avons montré la présence d'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans 8/87 échantillons d'eau environnementale. Bien que la détection d'ADN ne soit pas une preuve de la présence de la bactérie vivante, cette présence dans des milieux aquatiques situés dans des zones de forte incidence est un élément supplémentaire dans la caractérisation du réservoir aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Notons également qu'un point de prélèvement a donné un résultat positif pour l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* lors des deux campagnes. Ce résultat conduit à deux hypothèses : soit la zone est recontaminée par les animaux, l'environnement aquatique participerait ainsi à un réservoir multisystémique ; soit les bactéries persistent dans l'eau plusieurs mois. Ces deux hypothèses sont parfaitement complémentaires l'une de l'autre, et indiquent que l'environnement aquatique a un rôle majeur dans la persistance environnementale de *F. tularensis* ssp. *holarctica*.

Ces campagnes se sont déroulées aux mêmes points de prélèvement à six mois d'intervalle. La saison, la distribution de l'eau ainsi que la température étaient différentes et pourtant nous avons trouvé l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* lors des deux campagnes. Il est intéressant de noter la différence des niveaux d'eau lors des deux campagnes. Lors de la

première campagne, en juillet 2019, l'environnement était très sec et l'eau plutôt rare avec de nombreuses étendues presque asséchées. A l'inverse, lors de la deuxième campagne, en janvier 2020, l'environnement était très humide et des inondations avaient eu lieu. Au regard des résultats, nous faisons l'hypothèse d'une persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'eau. La dissémination dans l'environnement des bactéries à partir de l'eau pourrait être due aux variations climatiques (inondations) et aux activités humaines (systèmes d'irrigation), en plus de la dissémination par des animaux infectés.

Plusieurs perspectives pourraient être envisagées à partir de ce premier travail de doctorat. Au CNR des *Francisella*, certaines souches responsables de ces cas de tularémie de l'Ouest de la France en 2018, ont été isolées et séquencées (données non publiées). Il serait donc pertinent de séquencer les prélèvements d'eau contenant l'ADN de *F. tularensis*, afin de déterminer si les souches de *F. tularensis* isolées dans l'environnement sont génétiquement similaires aux souches de *F. tularensis* isolées de prélèvements humains. Les échantillons d'eau étant contaminés par l'ADN d'autres micro-organismes, des techniques spécifiques de séquençage d'ADN (ex : métagénomique) doivent être mises au point au laboratoire. Deuxièmement, les campagnes ont été réalisées dans une région avec plus de cas de tularémie que la moyenne nationale. Nous n'avons cependant aucune idée de la présence de l'ADN de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans les zones aquatiques des autres régions. Elle pourrait être indépendante des contaminations humaines. Pour répondre à cette question, d'autres campagnes pourraient être réalisées sur le territoire, tout en gardant à l'esprit que la temporalité est différente. Troisièmement, il serait intéressant d'évaluer l'état bactérien de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans les prélèvements environnementaux. En effet, la détection de l'ADN ne nous renseigne pas sur la viabilité bactérienne. Il peut s'agir de traces résiduelles des bactéries, des bactéries à l'état VBNC ou encore des bactéries virulentes. Il faudrait donc mettre au point une technique pour s'assurer de détecter des bactéries vivantes. Si c'est le cas, il faudrait également déterminer si *F. tularensis* ssp. *holarctica* est dans un état VBNC ou non. Par la suite, nous pourrions également imaginer d'évaluer la persistance bactérienne dans ces zones aquatiques par des analyses contrôlées et régulières.

Concernant la deuxième partie de ce travail de thèse, qui a permis de démontrer la survie à long-terme de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'eau, à l'état VBNC. J'ai commencé par analyser la cultivabilité bactérienne dans l'eau à différentes températures et concentrations en NaCl. Pour cela, j'ai construit des modèles *in vitro* de persistance dans l'eau. *F. tularensis* ssp. *holarctica* a été mise en suspension dans de l'eau environnementale filtrée avec diverses

concentrations en NaCl et incubée à plusieurs températures. J'ai retrouvé des résultats similaires à la littérature, avec une cultivabilité de 11 semaines à 4°C et 6 semaines à 18°C (128,149,150). Grâce aux observations microscopiques, nous avons rapidement fait l'hypothèse qu'une survie en état de dormance était possible. J'ai ainsi mis au point des techniques d'évaluation de la survie bactérienne. J'ai retenu la PCR viabilité avec l'intercalant PMAXx précédemment utilisée par d'autres équipes pour identifier des bactéries à l'état VBNC (204,205). Cette technique parfaitement adaptée au laboratoire et à nos modèles m'a permis de montrer que *F. tularensis* ssp. *holarctica* survit dans un état VBNC à 4°C et 18°C. En effet, lors du déclin de la cultivabilité, la viabilité bactérienne reste stable pendant plus de 18 mois. A l'inverse, à 37°C la cultivabilité et la viabilité de *F. tularensis* ssp. *holarctica* ont décliné en une semaine. Ces résultats nous éclairent sur les mécanismes de persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* dans l'environnement. Premièrement, les bactéries sont capables de survivre à l'état VBNC, bien plus longtemps que les quelques semaines observées et publiées antérieurement, la cultivabilité se révélant d'ailleurs inappropriée pour évaluer la survie bactérienne. Deuxièmement, nous avons identifié que la température de l'eau est un facteur déterminant pour la persistance bactérienne de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Nous avons ainsi pu suggérer un cycle aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica* actualisé avec l'état VBNC comme principal mode de survie dans l'eau.

Ces nouvelles données apportent également un élément de réponse à la répartition géographique de la tularémie. Cette maladie persiste dans les pays plutôt tempérés, avec des épidémies presque annuelles dans les pays Scandinaves. Ces épidémies sont causées par la transmission due aux moustiques (92). Les données de ce travail amènent à faire l'hypothèse que *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC pourrait toujours être infectieux pour les moustiques ou les larves de moustiques. Dans les régions où la température de l'eau reste inférieure à 20°C toute l'année, les bactéries à l'état VBNC pourraient persister. L'été, les moustiques se contamineraient à l'état larvaire pour ensuite contaminer les humains dans leur forme adulte après le passage transtadial de la bactérie (119). A l'inverse, dans les régions plus tempérées, une augmentation de la température régulerait fortement la charge bactérienne dans l'eau limitant ainsi la dispersion de la tularémie. Une des perspectives de ce travail serait donc d'évaluer l'infectiosité de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC chez les arthropodes et notamment les moustiques, pour tester ces hypothèses.

La persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC dans l'eau soulève plusieurs questionnements. Lors d'une dissémination dans l'environnement, outre la

température de l'eau, les facteurs favorisant ou défavorisant le passage dans cet état sont encore méconnus. Ces bactéries peuvent aussi représenter un risque non maîtrisé en santé humaine, et en agronomie puisqu'elles ne sont pas détectées par les outils de diagnostic basés sur la culture.

L'état VBNC m'a paru particulièrement intéressant à explorer. J'ai souhaité commencer sa caractérisation par des études de virulence et de protéomique. J'ai également essayé, sans résultats à ce jour, de définir des conditions de réactivation. Ces dernières dépendent de l'espèce bactérienne et du stress induit (165). La détermination de ces conditions est une autre perspective de ce travail.

La virulence des bactéries à l'état VBNC n'est pas définie. La mise au point d'un modèle d'infection de *G. mellonella* par *F. tularensis* ssp. *holarctica* a été un échec. Bien que non concluantes, les cocultures réalisées avec les macrophages et les amibes, semblaient montrer que les bactéries à l'état VBNC ne sont pas virulentes. L'étude protéomique que nous avons réalisée nous laisse à penser que *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC réduirait l'abondance de l'expression de leurs protéines de virulence (SST6, pili de type IV, antigène-O) par rapport à une souche cultivable. Ainsi, une autre perspective de ce travail est d'explorer la virulence bactérienne chez l'animal et en modèles cellulaires.

Si *F. tularensis* ssp. *holarctica* à l'état VBNC n'est pas virulente pour les humains, les conditions de réactivation sont d'autant plus importantes à définir. En effet, nous pouvons faire l'hypothèse qu'après une dispersion massive de *F. tularensis* ssp. *holarctica*, les bactéries pourraient persister de longs mois à l'état VBNC. Des changements environnementaux, encore non-identifiés, pourraient alors induire la réactivation des bactéries et le regain de la virulence. Les réservoirs aquatiques seraient alors des sources potentielles de cas sporadiques ou d'épidémies de tularémie.

Dans les modèles de survie *in vitro*, j'ai également montré que les bactéries étaient capables de produire un biofilm. Ce biofilm a été marqué grâce au crystal violet, cependant aucune caractérisation moléculaire n'a pu être faite. Quelques marquages de molécules spécifiques du biofilm comme les lectines ont été réalisés sans succès. Les analyses protéiques suggèrent un remodelage de l'enveloppe bactérienne avec une sous-expression des pili de type IV impliqués dans l'adhérence bactérienne. La caractérisation du biofilm de *F. tularensis* ssp. *holarctica* et des molécules membranaires impliquées pourrait également faire l'objet de futurs travaux.

Pour finir, la dernière partie de ce travail de thèse concernait l'analyse protéomique des bactéries à l'état VBNC. Nous avons montré la modulation de l'enveloppe bactérienne et de certaines voies protéiques. Cependant, je n'ai pas identifié de protéines impliquées dans l'activation de l'état VBNC, ni de marqueurs moléculaires de cet état. Cela pourrait également faire l'objet de futurs travaux. Certaines protéines d'intérêt comme les régulateurs globaux SpoT, RelA, TrpE ... (sous-exprimés à l'état VBNC), des ribonucléoprotéines ou des protéines membranaires pourraient être spécifiquement étudiées afin de déterminer leur implication dans l'état VBNC de *F. tularensis* ssp. *holarctica*.

Pour conclure, ce travail de doctorat a permis de confirmer la persistance de *F. tularensis* ssp. *holarctica* en milieu aquatique sur des périodes très longues et en dehors de tout hôte vertébré, grâce au passage à l'état VBNC. Ces données ont participé à une meilleure compréhension du cycle aquatique de *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Ainsi, cette bactérie possède probablement un réservoir multi-systémique comprenant l'environnement aquatique et des composantes terrestres (lièvres, arthropodes ...). Ces éléments du réservoir multi-systémique s'alimentent entre eux participant au maintien et à la dissémination des bactéries dans l'environnement.

RÉFÉRENCES

1. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jan;16(1):113–24.
2. Hennebique A, Boisset S, Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg Microbes Infect*. 2019 Jan;8(1):1027–42.
3. Jellison WL, Owen CR. Tularemia and animal populations ecology and epizootiology. 1961;
4. Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, editors. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Chichester, West Sussex, UK ; Malden, MA: Blackwell Pub; 2012. 554p.
5. Sjöstedt A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1105(1):1–29.
6. Sandström G. The tularaemia vaccine. *J Chem Technol Biotechnol*. 1994 Apr;59(4):315–20.
7. Ohara S. Studies on yato-byo (Ohara's disease, tularemia in Japan). I. *Jpn J Exp Med*. 1954 Apr;24(2):69–79.
8. McCoy GW. Plague among Ground Squirrels in America. *J Hyg (Lond)*. 1910 Dec;10(4):589–601.
9. OLSUFJEV NG, MESHCHERYAKOVA ISY 1983. Subspecific Taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int J Syst Evol Microbiol*. 33(4):872–4.
10. McCoy GW, Chapin CW. Further Observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, *Bacterium tularense*. *J Infect Dis*. 1912;10(1):61–72.
11. Wherry WB. A New Bacterial Disease of Rodents: Transmissible to Man. *Public Health Rep 1896-1970*. 1914;29(51):3387.
12. Wherry WB, Lamb BH. Infection of Man with *Bacterium Tularense*. *J Infect Dis*. 1914;15(2):331–40.
13. Francis E. Tularaemia Francis 1921. i. The Occurrence of Tularaemia in Nature as a Disease of Man. *Public Health Rep*. 1921;36(30):1731–8.
14. Francis E. A summary of present knowledge of tularemia. *Medicine (Baltimore)*. 1928;
15. Telford S, Goethert heidi. Toward an Understanding of the Perpetuation of the Agent of Tularemia. *Front Microbiol*. 2011;1:150.
16. Oyston PCF, Sjöstedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Dec;2(12):967–78.
17. Bell JF, Jellison WL, Owen CR, Larson CL. Applicability of the Ascoli Test to Epizootic Tularemia in Wild Rodents. *J Wildl Manag*. 1959;23(2):238–40.
18. Jellison WL. Tularemia in North America, 1930-1974. 1974

19. Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1982;26(3):291–9.
20. Kudelina RI, Olsufiev NG. Sensitivity to macrolide antibiotics and lincomycin in *Francisella tularensis holarctica*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1980;24(1):84–91.
21. Tigertt WD. Soviet viable *pasteurella tularensis* vaccines a review of selected articles. 1962;26:20.
22. Oyston PCF. *Francisella tularensis* vaccines. Vaccine. 2009 Nov;27:D48–51.
23. Leglu D. La menace: bioterrorisme, la guerre à venir. Robert Laffont; 2002. 299 p.
24. Petersen JM, Schriefer ME. Tularemia: emergence/re-emergence. Vet Res. 2005 May;36(3):455–67.
25. CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response
26. Smallpox | CDC [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 30].
27. Traités, États parties et Commentaires - États Parties - Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou à toxines et sur leur destruction. Ouvert à la signature à Londres, Moscou et Washington le 10 avril 1972.
28. Kevin M, Girault G, Caspar Y, Cherfa MA, Mendy C, Tomaso H, et al. Phylogeography and Genetic Diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France (1947–2018). Front Microbiol. 2020
29. Kugeler KJ, Mead PS, Janusz AM, Staples JE, Kubota KA, Chalcraft LG, et al. Molecular Epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Apr 1;48(7):863–70.
30. Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1959;3:138–49.
31. Hornick R. Tularemia Revisited
32. Molins CR, Delorey MJ, Yockey BM, Young JW, Sheldon SW, Reese SM, et al. Virulence differences among *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* clades in mice. PloS One. 2010 Apr 16;5(4):e10205.
33. Jackson J, McGregor A, Cooley L, Ng J, Brown M, Ong CW, et al. *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011. Emerg Infect Dis. 2012 Sep;18(9):1484–6.
34. Sjøstedt A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar 29;1105(1):1–29.

35. Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: Global Expansion of a Highly Fit Clone. *J Bacteriol.* 2009 Apr;191(8):2474–84.
36. Wang Y, Peng Y, Hai R, Xia L, Li H, Zhang Z, et al. Diversity of *Francisella tularensis* Subsp. *holarctica* Lineages, China. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jul;20(7).
37. Sandström G, Sjöstedt A, Forsman M, Pavlovich NV, Mishankin BN. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. *J Clin Microbiol.* 1992 Jan;30(1):172–5.
38. Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014
39. Busse H-J, Huber B, Anda P, Escudero R, Scholz HC, Seibold E, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis* – response to Johansson et al. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(8):1718–20.
40. Johansson A, Celli J, Conlan W, Elkins KL, Forsman M, Keim PS, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Aug;60(Pt 8):1717–8; author reply 1718–1720.
41. Brett ME, Respicio-Kingry LB, Yendell S, Ratard R, Hand J, Balsamo G, et al. Outbreak of *Francisella novicida* bacteremia among inmates at a louisiana correctional facility. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2014 Sep 15;59(6):826–33.
42. Kreitmann L, Terriou L, Launay D, Caspar Y, Courcol R, Maurin M, et al. Disseminated Infection Caused by *Francisella philomiragia* , France, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2012 Dec;21(12):2260–1.
43. Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, Friis-Møller A, Kamaishi T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J Appl Microbiol.* 2009;106(4):1231–43.
44. Brevik OJ, Ottem KF, Kamaishi T, Watanabe K, Nylund A. *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J Appl Microbiol.* 2011 Nov 1;111(5):1044–56.
45. Caipang CMA, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. Detection of *Francisella piscicida* in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. *Vet J.* 2010 Jun 1;184(3):357–61.
46. Huber B, Escudero R, Busse H-J, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Aug;60(Pt 8):1887–96.
47. Challacombe JF, Petersen JM, Gallegos-Graves LV, Hodge D, Pillai S, Kuske CR. Whole-Genome Relationships among *Francisella* Bacteria of Diverse Origins Define New

- Species and Provide Specific Regions for Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Feb 1;83(3):e02589-16.
48. Qu P-H, Chen S-Y, Scholz HC, Busse H-J, Gu Q, Kämpfer P, et al. *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Oct;63:3628–35.
 49. Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL. Tularaemia: a challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar 1;37(2):85–96.
 50. Griffin KF, Oyston PCF, Titball RW. *Francisella tularensis* vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Apr;49(3):315–23.
 51. Barel M, Charbit A. *Francisella tularensis* intracellular survival: to eat or to die. *Microbes Infect.* 2013 Dec;15(14–15):989–97.
 52. Hall JD, Woolard MD, Gunn BM, Craven RR, Taft-Benz S, Frelinger JA, et al. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun.* 2008 Dec;76(12):5843–52.
 53. Pizarro-Cerdá J, Charbit A, Enninga J, Lafont F, Cossart P. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Dec 1;60:155–67.
 54. Moreau GB, Mann BJ. Adherence and uptake of *Francisella* into host cells. *Virulence.* 2013 Nov 15;4(8):826–32.
 55. Clemens DL, Lee B-Y, Horwitz MA. The *Francisella* Type VI Secretion System. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Apr 23;8:121.
 56. Clemens DL, Horwitz MA. Uptake and Intracellular Fate of *Francisella tularensis* in Human Macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1105(1):160–86.
 57. Alkhuder K, Meibom KL, Dubail I, Dupuis M, Charbit A. Glutathione Provides a Source of Cysteine Essential for Intracellular Multiplication of *Francisella tularensis*. Monack DM, editor. *PLoS Pathog.* 2009 Jan 30;5(1):e1000284.
 58. Steele S, Radlinski L, Taft-Benz S, Brunton J, Kawula TH. Trogocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *eLife.* 5:e10625.
 59. Bourdonnay E, Henry T. Catch me if you can. *eLife.* 5:e14721.
 60. Rowe HM, Huntley JF. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Dec 23;5:94.
 61. Bandara AB, Champion AE, Wang X, Berg G, Apicella MA, McLendon M, et al. Isolation and Mutagenesis of a Capsule-Like Complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and Contribution of the CLC to *F. tularensis* Virulence in Mice. *PLOS ONE.* 2011 Apr 22;6(4):e19003.
 62. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res.* 2006;12(4):205–23.

63. Okan NA, Kasper DL. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. Carbohydr Res. 2013 Aug 30;378:79–83.
64. Catanzaro KCF, Inzana TJ. The *Francisella tularensis* Polysaccharides: What Is the Real Capsule? Microbiol Mol Biol Rev. 2020 Feb 12
65. Pazos M, Peters K. Peptidoglycan. In: Kuhn A, editor. Bacterial Cell Walls and Membranes. Cham: Springer International Publishing; 2019
66. Shaku M, Ealand C, Matlhabe O, Lala R, Kana BD. Peptidoglycan biosynthesis and remodeling revisited. In: Advances in Applied Microbiology. Elsevier; 2020
67. Forsberg A, Guina T. Type II Secretion and Type IV Pili of *Francisella*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar 29;1105(1):187–201.
68. Näslund Salomonsson E, Forslund A-L, Forsberg Å. Type IV Pili in *Francisella* – A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen. Front Microbiol. 2011;2:29.
69. Forslund A-L, Salomonsson EN, Golovliov I, Kuoppa K, Michell S, Titball R, et al. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. BMC Microbiol. 2010 Dec;10(1):227.
70. Nano FE, Schmerk C. The *Francisella* Pathogenicity Island. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar 29;1105(1):122–37.
71. Wehrly TD, Chong A, Virtaneva K, Sturdevant DE, Child R, Edwards JA, et al. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. Cell Microbiol. 2009;11(7):1128–50.
72. Dai S, Mohapatra N, Schlesinger L, Gunn J. Regulation of *Francisella tularensis* Virulence. Front Microbiol 2011
73. Travis BA, Ramsey KM, Prezioso SM, Tallo T, Wandzilak JM, Hsu A, et al. Structural Basis for Virulence Activation of *Francisella tularensis*. Mol Cell. 2021 Jan;81(1):139-152.e10.
74. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu J-J, Rodriguez SA, Liu J, et al. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence: *Francisella* pathogenicity island protein secretion. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1459–70.
75. Cuthbert BJ, Ross W, Rohlfing AE, Dove SL, Gourse RL, Brennan RG, et al. Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. Genes Dev. 2017 Jan 8;31(15):1549–60.
76. Rigard M, Bröms JE, Mosnier A, Hologne M, Martin A, Lindgren L, et al. *Francisella tularensis* IglG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. Blanke SR, editor. PLOS Pathog. 2016 Sep 7;12(9):e1005821.
77. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Banõ J-N, Picard A. Human Tularemia in France, 2006–2010. Clin Infect Dis. 2011 Nov 15;53(10):e133–41.

78. Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1105:378–404.
79. Chaignat V, Djordjevic-Spasic M, Ruettger A, Otto P, Klimpel D, Müller W, et al. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect Dis.* 2014 May 5;14:234.
80. Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol.* 1994 Jan;44(1):38–46.
81. Michelet L, Bonnet S, Madani N, Moutailler S. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: evaluation of current molecular techniques. *Vet Microbiol.* 2013 May 3;163(3–4):399–403.
82. Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Petersen JM. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec 1;41(12):5492–9.
83. Ahlinder J, Öhrman C, Svensson K, Lindgren P, Johansson A, Forsman M, et al. Increased knowledge of *Francisella* genus diversity highlights the benefits of optimised DNA-based assays. *BMC Microbiol.* 2012 Sep 25;12(1):220.
84. Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg Infect Dis.* 2006 Nov;12(11):1799–801.
85. Johansson A, Ibrahim A, Göransson I, Eriksson U, Gurycova D, Clarridge JE, et al. Evaluation of PCR-Based Methods for Discrimination of *Francisella* Species and Subspecies and Development of a Specific PCR. That Distinguishes the Two Major Subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4180–5.
86. Birdsell DN, Vogler AJ, Buchhagen J, Clare A, Kaufman E, Naumann A, et al. TaqMan Real-Time PCR Assays for Single-Nucleotide Polymorphisms Which Identify *Francisella tularensis* and Its Subspecies and Subpopulations. *PLoS ONE.* 2014 Sep 19;9(9):e107964.
87. Petersen JM, Schrieffer ME, Gage KL, Montenieri JA, Carter LG, Stanley M, et al. Methods for Enhanced Culture Recovery of *Francisella tularensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jun 1;70(6):3733–5.
88. Caspar Y, Maurin M. *Francisella tularensis* Susceptibility to Antibiotics: A Comprehensive Review of the Data Obtained In vitro and in Animal Models. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:122.
89. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jan;69(1):101–10.
90. Gustin B, Valade E, Thibault F, Schneider D, Maurin M. Phenotypic and genetic characterization of macrolide resistance in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar I. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Nov;65(11):2359–67.

91. Biot FV, Bachert BA, Mlynek KD, Toothman RG, Koroleva GI, Lovett SP, et al. Evolution of Antibiotic Resistance in Surrogates of *Francisella tularensis* (LVS and *Francisella novicida*): Effects on Biofilm Formation and Fitness. *Front Microbiol.* 2020;11:593542.
92. Desvars A, Furberg M, Hjertqvist M, Vidman L, Sjöstedt A, Rydén P, et al. Epidemiology and Ecology of Tularemia in Sweden, 1984–2012. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):32–9.
93. Kilic S, Birdsell DN, Karagöz A, Çelebi B, Bakkaloglu Z, Arikan M, et al. Water as Source of *Francisella tularensis* Infection in Humans, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2015 Dec;21(12):2213–6.
94. Farlow J, Wagner DM, Dukerich M, Stanley M, Chu M, Kubota K, et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg Infect Dis.* 2005 Dec;11(12):1835–41.
95. Chaudhuri RR, Ren C-P, Desmond L, A. Vincent G, Silman NJ, Brehm JK, et al. Genome Sequencing Shows that European Isolates of *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* Are Almost Identical to US Laboratory Strain Schu S4. Ausubel F, editor. *PLoS ONE.* 2007 Apr;2(4):352.
96. Morbidity and Mortality Weekly Report. Tularemia — United States, 2001–2010. 2013 Nov 963–5. Report No.: Vol 62. No. 47.
97. European Centre for Disease Prevention and Control: AER-tularaemia-2019. 2021
98. Eden J-S, Rose K, Ng J, Shi M, Wang Q, Sintchenko V, et al. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Ringtail Possums, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jul;23(7):1198–201.
99. Mohamed SER, Mubarak AI, Alfaroq LO. *Francisella tularensis* Bacteremia: A Case Report from Sudan. *Case Rep Infect Dis.* 2012.
100. Njeru J, Tomaso H, Mertens K, Henning K, Wareth G, Heller R, et al. Serological evidence of *Francisella tularensis* in febrile patients seeking treatment at remote hospitals, northeastern Kenya, 2014–2015. *New Microbes New Infect.* 2017 Sep;19:62–6.
101. Santé publique France. tularemie-donnees-epidemiologiques-2014.pdf. 2015.
102. Santé publique France. tularemie-donnees-epidemiologiques-2015.pdf. 2016.
103. Santé publique France. tularemie-donnees-epidemiologiques-2016.pdf. 2017.
104. Santé publique France. tularemie-donnees-epidemiologiques-2017.pdf. 2018.
105. Santé et sécurité au travail. Tableau 68, régime général. M P. :18.
106. Mailles A, Ollivier R, Benezit F, Lepoivre H, Faisant M, Aranda grau JH, et al. Une épidémie de tularémie en France en 2018 suggérant une modification de l'épidémiologie de la maladie. *Médecine Mal Infect.* 2019 Jun;49(4):S4.
107. Santé publique France. Tularemie - donnees epidemiologiques 2018 pdf. 2019.

108. Capellan J, Fong IW. Tularemia from a cat bite: case report and review of feline-associated tularemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1993 Apr;16(4):472–5.
109. Gyuranecz M, Rigó K, Dán Á, Földvári G, Makrai L, Dénes B, et al. Investigation of the Ecology of *Francisella tularensis* During an Inter-Epizootic Period. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2011 Aug 1;11(8):1031–5.
110. Kuehn A, Schulze C, Kutzer P, Probst C, Hlinak A, Ochs A, et al. Tularaemia seroprevalence of captured and wild animals in Germany: the fox (*Vulpes vulpes*) as a biological indicator. *Epidemiol Infect*. 2013 Apr;141(4):833–40.
111. Gyuranecz M, Birdsell DN, Splettstoesser W, Seibold E, Beckstrom-Sternberg SM, Makrai L, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb;18(2):290–3.
112. Výrosteková V. Transstadial transmission of *Francisella tularensis* by *Ixodes ricinus* ticks infected during the nymphal stage. *Epidemiol Mikrobiol Imunol Cas Spolecnosti Epidemiol Mikrobiol Ceske Lek Spolecnosti JE Purkyne*. 1994 Dec;43(4):166–70.
113. Eliasson H, Bäck E. Tularaemia in an emergent area in Sweden: An analysis of 234 cases in five years. *Scand J Infect Dis*. 2007 Jan 1;39(10):880–9.
114. Wik O. Large tularaemia outbreak in Varmland, central Sweden, 2006. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2006 Sep 21;11(9):E060921.1.
115. Jounio U, Renko M, Uhari M. An outbreak of *holarctica*-type tularemia in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Feb;29(2):160–2.
116. Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Tuominen H, Syrjälä H. Guillain-Barré syndrome and ulceroglandular tularemia. *Infection*. 2013 Aug;41(4):881–3.
117. Hanke CA, Otten J-E, Berner R, Serr A, Splettstoesser W, von Schnakenburg C. Ulceroglandular tularemia in a toddler in Germany after a mosquito bite. *Eur J Pediatr*. 2009 Aug 1;168(8):937–40.
118. Triebenbach An, Vogl Sj, Lotspeich-cole L, Sikes Ds, Happ Gm, Hueffer K. Detection of *Francisella tularensis* in Alaskan Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Assessment of a Laboratory Model for Transmission. *J Med Entomol*. 2010 Jul;47(4):639–48.
119. Abdellahoum Z, Maurin M, Bitam I. Tularemia as a Mosquito-Borne Disease. *Microorganisms*. 2020 Dec 23;9(1):26.
120. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res*. 2009 Mar;40(2):07.
121. Padeshki PI, Ivanov IN, Popov B, Kantardjiev TV. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission. *Epidemiol Infect*. 2010 Mar;138(3):376–9.
122. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar 29;1105(1):30–66.

123. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan 1;69(1):600–6.
124. Hennebique A, Peyroux J, Brunet C, Martin A, Henry T, Knezevic M, et al. Amoebae can promote the survival of *Francisella* species in the aquatic environment. Emerg Microbes Infect. 2021 Dec;10(1):277–90.
125. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol. 2016 Sep;14(9):563–75.
126. van Hoek ML. Biofilms: An advancement in our understanding of *Francisella* species. Virulence. 2013 Nov 15;4(8):833–46.
127. Siebert C, Villers C, Pavlou G, Touquet B, Yakandawala N, Tardieux I, et al. *Francisella novicida* and *F. philomiragia* biofilm features conditioning fitness in spring water and in presence of antibiotics. PLOS ONE. 2020 Feb 5;15(2):e0228591.
128. Gilbert SE, Rose LJ. Survival and persistence of nonspore-forming biothreat agents in water: Persistence of nonspore-forming biothreat agents in water. Lett Appl Microbiol. 2012 Sep;55(3):189–94.
129. Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandström G. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. FEMS Microbiol Ecol. 2000 Mar;31(3):217–24.
130. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, et al. *Francisella tularensis* Type A Strains Cause the Rapid Encystment of *Acanthamoeba castellanii* and Survive in Amoebal Cysts for Three Weeks Postinfection. Appl Environ Microbiol. 2009 Dec 1;75(23):7488–500.
131. Verhoeven AB, Durham-colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. *Francisella philomiragia* Biofilm Formation and Interaction With the Aquatic Protist *Acanthamoeba castellanii*. Biol Bull. 2010 Oct 1;219(2):178–88.
132. Santic M, Ozanic M, Semic V, Pavokovic G, Mrcic V, Kwaik YA. Intra-Vacuolar Proliferation of *F. novicida* within *H. Vermiformis*. Front Microbiol. 2011;2:78.
133. Ozanic M, Gobin I, Brezovec M, Marecic V, Trobonjaca Z, Abu Kwaik Y, et al. *F. novicida*-Infected *A. castellanii* Does Not Enhance Bacterial Virulence in Mice. Front Cell Infect Microbiol. 2016 Jan 1;6:56.
134. Lauriano CM, Barker JR, Yoon S-S, Nano FE, Arulanandam BP, Hassett DJ, et al. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. Proc Natl Acad Sci. 2004 Mar 23;101(12):4246–9.
135. Kelava I, Marecic V, Fucak P, Ivek E, Kolaric D, Ozanic M, et al. Optimisation of External Factors for the Growth of *Francisella novicida* within *Dictyostelium discoideum*. BioMed Res Int. 2020 Jan 22;2020:e6826983.

136. Buse HY, Schaefer III FW, Rice EW. Enhanced survival but not amplification of *Francisella* spp. in the presence of free-living amoebae. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017 Mar;64(1):17–36.
137. Thelaus J, Andersson A, Mathisen P, Forslund A-L, Noppa L, Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water: Role of nutrient and protozoa for the fate of *F. tularensis*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009 Jan;67(1):69–80.
138. Gustafsson K. Growth and survival of four strains of *Francisella tularensis* in a rich medium preconditioned with *Acanthamoeba palestinensis*. *Can J Microbiol*. 1989;35(12):1100–4.
139. Filloux A, Vallet-Gely I. Biofilm: Set-up and organization of a bacterial community. *Médecine Sci MS*. 2003 Feb 1;19:77–83.
140. Duodu S, Larsson P, Sjödin A, Forsman M, Colquhoun DJ. The Distribution of *Francisella*-like Bacteria Associated with Coastal Waters in Norway. *Microb Ecol*. 2012 Aug;64(2):370–7.
141. Berrada ZL, Telford SR. Diversity of *Francisella* Species in Environmental Samples from Martha's Vineyard, Massachusetts. *Microb Ecol*. 2010 Feb;59(2):277–83.
142. Janse I, van der Plaats RQJ, de Roda Husman AM, van Passel MWJ. Environmental Surveillance of Zoonotic *Francisella tularensis* in the Netherlands. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 May 8;8:140.
143. Hightower J, Kracalik IT, Vydayko N, Goodin D, Glass G, Blackburn JK. Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine. *Parasit Vectors*. 2014 Dec;7(1):453.
144. Şimşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Sep;31(9):2353–7.
145. Broman T, Thelaus J, Andersson A-C, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, et al. Molecular Detection of Persistent *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Natural Waters. *Int J Microbiol*. 2011;2011:1–10.
146. Kaysser P, Seibold E, Mätz-Rensing K, Pfeffer M, Essbauer S, Splettstoesser WD. Re-emergence of tularemia in Germany: Presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis*. 2008 Dec;8(1):157.
147. Whitehouse CA, Kesterson KE, Duncan DD, Eshoo MW, Wolcott M. Identification and characterization of *Francisella* species from natural warm springs in Utah, USA: *Francisella* from natural warm springs in Utah. *Lett Appl Microbiol*. 2012 Apr;54(4):313–24.
148. Parker RR, Steinhaus EA, Kohls GM, Jellison WL. Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern United States. *Bull Natl Inst Health US*. 1951;193:1–161.

149. Berrada ZL, Telford III SR. Survival of *Francisella tularensis* Type A in brackish-water. Arch Microbiol. 2011 Mar;193(3):223–6.
150. Golovliov I, Bäckman S, Granberg M, Salomonsson E, Lundmark E, Näslund J, et al. Long-term survival of virulent tularemia pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments. Appl Environ Microbiol. 2021 Jan 4
151. Breeuwer P, Abee T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int J Food Microbiol. 2000 Apr;55(1–3):193–200.
152. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichert DH, Harwood CR, Barer MR. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antoni Van Leeuwenhoek. 1998;73:169–87.
153. Colwell RR, Grimes DJ, editors. Nonculturable Microorganisms in the Environment MA: Springer US; 2000
154. Oliver JD. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 1995 Nov;133(3):203–8.
155. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front Microbiol. 2014
156. Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. Trends Microbiol. 2015 Jan;23(1):7–13.
157. Ayrapetyan M, Oliver JD. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. Curr Opin Food Sci. 2016 Apr;8:127–33.
158. Yamamoto H. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. J Infect Chemother. 2000;6(2):112–4.
159. Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA, Janssen PH. Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. Appl Environ Microbiol. 2003 Dec;69(12):7210–5.
160. Dewi Puspita I, Kamagata Y, Tanaka M, Asano K, Nakatsu CH. Are Uncultivated Bacteria Really Uncultivable? Microbes Environ. 2012;27(4):356–66.
161. Thomas C, Hill D, Mabey M. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. J Appl Microbiol. 2002;92(3):433–42.
162. Barer MR, Harwood CR. Bacterial Viability and Culturability. In: Advances in Microbial Physiology. Elsevier; 1999. p. 93–137.
163. Bogosian G, Bourneuf EV. A matter of bacterial life and death. EMBO Rep. 2001 Sep;2(9):770–4.
164. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2010 Jul;34(4):415–25.

165. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health*. 2014 Jul 31
166. Fakruddin Md, Mannan KSB, Andrews S. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN Microbiol*. 2013;2013:1–6.
167. Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin C-W, Ding T. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front Microbiol* 2017
168. Kumar SS, Ghosh AR. Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology*. 2019 Jun 1;165(6):593–610.
169. Pinto D, Santos MA, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol*. 2015 Jan 2;41(1):61–76.
170. Lennon JT, Jones SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Feb;9(2):119–30.
171. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol*. 1982 Dec;8(4):313–23.
172. Martins PMM, Merfa MV, Takita MA, De Souza AA. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Front Microbiol*. 2018 May 25;9:1099.
173. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*. 2012 Nov;91(2):276–89.
174. Trevors JT. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *J Microbiol Methods*. 2011 Aug;86(2):266–73.
175. Trevors JT, Bej AK, Mojib N, van Elsas JD, Van Overbeek L. Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*. 2012 Mar;16(2):167–76.
176. Dong K, Pan H, Yang D, Rao L, Zhao L, Wang Y, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020;19(1):149–83.
177. Boaretti M, Del Mar Lleò M, Bonato B, Signoretto C, Canepari P. Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ Microbiol*. 2003;5(10):986–96.
178. Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. Margolin W, editor. *J Bacteriol*. 2018 Aug 6;200(20):e00249-18, /jb/200/20/e00249-18.atom.
179. Bibi-Triki S. Identification et caractérisation fonctionnelle et structurale du système toxine-antitoxine HicA3-HicB3 de *Yersinia pestis*. :140.

180. Postnikova OA, Shao J, Mock NM, Baker CJ, Nemchinov LG. Gene Expression Profiling in Viable but Nonculturable (VBNC) Cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Front Microbiol* 2015 Dec 18.
181. Kundu M, Basu J. Applications of Transcriptomics and Proteomics for Understanding Dormancy and Resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2021;12:511.
182. Zhao F, Wang Y, An H, Hao Y, Hu X, Liao X. New Insights into the Formation of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 Induced by High-Pressure CO₂. Doores S, editor. *mBio*. 2016 Sep 7
183. Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends Microbiol*. 2006 Jun;14(6):271–6.
184. Signoretto C, Lleò M del M, Canepari P. Modification of the Peptidoglycan of *Escherichia coli* in the Viable But Nonculturable State. *Curr Microbiol*. 2002 Feb 1;44(2):125–31.
185. Pfeffer JM, Strating H, Weadge JT, Clarke AJ. Peptidoglycan O Acetylation and Autolysin Profile of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188(3):902–8.
186. Thevenard B. Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*. :279.
187. Zhong Q, Tian J, Wang J, Fang X, Liao Z. iTRAQ-based proteomic analysis of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 induced by food preservative and low temperature. *Food Control*. 2018 Mar;85:369–75.
188. Meng L, Alter T, Aho T, Huehn S. Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015 May;91(5).
189. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*. 2002;43(3):717–31.
190. Zhong Q, Wang B, Wang J, Liu Y, Fang X, Liao Z. Global Proteomic Analysis of the Resuscitation State of *Vibrio parahaemolyticus* Compared With the Normal and Viable but Non-culturable State. *Front Microbiol*. 2019;10:1045.
191. Lai C-J, Chen S-Y, Lin I-H, Chang C-H, Wong H. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol*. 2009 Oct;135(2):118–24.
192. Ye C, Lin H, Zhang M, Chen S, Yu X. Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC *Escherichia coli* induced by low level chlorination. *Sci Rep*. 2020 Feb 6;10(1):1957.
193. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res*. 2018 Sep;141:428–38.

194. Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, et al. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res.* 2013 Nov;47(17):6606–17.
195. Wideman NE, Oliver JD, Crandall PG, Jarvis NA. Detection and Potential Virulence of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A Review. *Microorganisms.* 2021 Jan 19;9(1):194.
196. Telkov MV, Demina GR, Voloshin SA, Salina EG, Dudik TV, Stekhanova TN, et al. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. *Biochem Biokhimiia.* 2006 Apr;71(4):414–22.
197. Kana BD, Mizrahi V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Feb;58(1):39–50.
198. Nichols CE, Johnson C, Lockyer M, Charles IG, Lamb HK, Hawkins AR, et al. Structural characterization of *Salmonella typhimurium* YeaZ, an M22 O-sialoglycoprotein endopeptidase homolog. *Proteins.* 2006 Jul 1;64(1):111–23.
199. Cervero-Aragó S, Schrammel B, Dietersdorfer E, Sommer R, Lück C, Walochnik J, et al. Viability and infectivity of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* strains induced at high temperatures. *Water Res.* 2019 Jul;158:268–79.
200. Thelaus J, Lundmark E, Lindgren P, Sjödin A, Forsman M. *Galleria mellonella* Reveals Niche Differences Between Highly Pathogenic and Closely Related Strains of *Francisella* spp. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jun 5;8:188.
201. Lindgren M, Eneslätt K, Bröms JE, Sjöstedt A. Importance of PdpC, IglC, IglI, and IglG for Modulation of a Host Cell Death Pathway Induced by *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2013 Jun;81(6):2076–84.
202. Lindgren H, Shen H, Zingmark C, Golovliov I, Conlan W, Sjöstedt A. Resistance of *Francisella tularensis* Strains against Reactive Nitrogen and Oxygen Species with Special Reference to the Role of KatG. *Infect Immun.* 2007 Mar;75(3):1303–9.
203. Kazemzadeh K, Hajj Chehade M, Hourdoir G, Brunet CD, Caspar Y, Loiseau L, et al. The Biosynthetic Pathway of Ubiquinone Contributes to Pathogenicity of *Francisella novicida*. Galperin MY, editor. *J Bacteriol.* 2021 Nov 5;203(23):e00400-21.
204. Brauge T, Midelet-Bourdin G, Soumet C. Viability Detection of Foodborne Bacterial Pathogens in Food Environment by PMA-qPCR and by Microscopic Observation. In: Bridier A, editor. *Foodborne Bacterial Pathogens: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer; 2019 p. 117–28.
205. Soto-Muñoz L, Teixidó N, Usall J, Viñas I, Crespo-Sempere A, Torres R. Development of PMA real-time PCR method to quantify viable cells of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist to control the major postharvest diseases on oranges. *Int J Food Microbiol.* 2014 Jun;180:49–55.

ANNEXE

Tableau des protéines identifiées en protéomique

Le tableau ressenne l'ensemble des protéines identifiées dans les protéomes des bactéries à l'état VBNC qui ont une abondance relative significativement différente de la phase stationnaire (Tfold > 1,2).

Name	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> gene	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> LVS	Protein	COG	Tfold	Modulation	Bacteria state
fkpB	FTT_0832	FTL_0326	FKBP-type peptidyl- prolyl cis-trans isomerase	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,46	up-regulated	early- VBNC
	FTT_1730c	FTL_1873	Amino acid transporter	E-Amino acid transport and metabolism	2,00	up-regulated	late- VBNC
	FTT_0164c	FTL_1685	MFS transporter	S-Function unknown	1,83	up-regulated	late- VBNC
fkpB	FTT_0832	FTL_0326	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1,77	up-regulated	late- VBNC
	FTT_1730c	FTL_1873	Amino acid transporter	E-Amino acid transport and metabolism	1,77	up-regulated	early- VBNC
ybgK	FTT_0222c	FTL_0159	Hydrolase	E-Amino acid transport and metabolism	1,75	up-regulated	late- VBNC
ruvA	FTT_0658	FTL_0932	Holliday junction branch migration protein RuvA	L-Replication, recombination and repair	1,65	up-regulated	late- VBNC
rimM	FTT_0151	FTL_1737	16S rRNA processing protein RimM	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,60	up-regulated	early- VBNC
	FTT_0774	FTL_1451	DUF2237 domain- containing protein	S-Function unknown	1,57	up-regulated	early- VBNC
	FTT_0774	FTL_1451	DUF2237 domain- containing protein	S-Function unknown	1,57	up-regulated	late- VBNC
	FTT_1496c	FTL_0297	Prepilin-type N- terminal cleavage/methylation domain-containing protein	E-Amino acid transport and metabolism	1,57	up-regulated	late- VBNC
	FTT_1001	FTL_1199	ferric uptake regulator family protein	K-Transcription	1,50	up-regulated	early- VBNC
rpmI	FTT_0819	FTL_1405	50S ribosomal protein L35	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,47	up-regulated	late- VBNC
	FTT_1384c	FTL_1129	acetyltransferase domain protein	S-Function unknown	1,38	up-regulated	early- VBNC

	FTT_1611	FTL_0514	toluene tolerance, Ttg2 family protein	S-Function unknown	1,37	up-regulated	early-VBNC
nuoE	FTT_0035	FTL_1826	NADH dehydrogenase I subunit E	C-Energy production and conversion	1,33	up-regulated	early-VBNC
	FTT_0872c	FTL_0373	colicin V production family protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1,33	up-regulated	early-VBNC
	FTT_1136c	FTL_0823	hypothetical lipoprotein	S-Function unknown	1,32	up-regulated	early-VBNC
	no homology	FTL_1136	YCII-related domain protein	S-Function unknown	1,31	up-regulated	early-VBNC
rpmE	FTT_0366	FTL_1303	ribosomal protein L31	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,29	up-regulated	early-VBNC
pilO	FTT_1158c	FTL_0798	Type IV pili glycosylation protein, pilO family	N-Cell motility / U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1,29	up-regulated	early-VBNC
rplT	FTT_0820	FTL_1404	ribosomal protein L20	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,28	up-regulated	early-VBNC
	FTT_1017c	FTL_1073	AIG2-like family protein	S-Function unknown	1,28	up-regulated	early-VBNC
gpsA	FTT_0871	FTL_0372	ketopantoate reductase PanE/ApbA family protein	H-Coenzyme transport and metabolism	1,28	up-regulated	late-VBNC
	FTT_0900	FTL_0420	hypothetical lipoprotein	S-Function unknown	1,28	up-regulated	early-VBNC
	FTT_1441	FTL_0617	ferritin-like domain protein	S-Function unknown	1,26	up-regulated	early-VBNC
ndk	FTT_0373c	FTL_1310	Nucleoside diphosphate kinase	F-Nucleotide transport and metabolism	1,26	up-regulated	early-VBNC
greA	FTT_1313c	FTL_1474	Transcription elongation factor GreA	K-Transcription	1,25	up-regulated	early-VBNC
rpsS	FTT_0329	FTL_0240	ribosomal protein S20	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,25	up-regulated	early-VBNC
	FTT_0166c	FTL_1723	tetratricopeptide repeat family protein	S-Function unknown	1,25	up-regulated	early-VBNC
pyrF	FTT_1648c	FTL_0045	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	F-Nucleotide transport and metabolism	1,24	up-regulated	early-VBNC
pyrF	FTT_1648c	FTL_0046	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	F-Nucleotide transport and metabolism	1,24	up-regulated	late-VBNC
rplS	FTT_0153	FTL_1735	50S ribosomal protein L20	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,24	up-regulated	early-VBNC
	FTT_1109	FTL_1089	linear amide C-N hydrolase,	S-Function unknown	1,24	up-regulated	early-VBNC

			choloyleglycine hydrolase family protein				
trxA	FTT_1445	FTL_0611	Thioredoxin 1	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1,23	up-regulated	early- VBNC
cptB	FTT_1151c	FTL_0804	succinate dehydrogenase assembly factor 2	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1,23	up-regulated	early- VBNC
metK	FTT_0149c	FTL_1739	methionine adenosyltransferase	H-Coenzyme transport and metabolism	1,22	up-regulated	early- VBNC
ftnA	FTT_0652c	FTL_0926	rubrerythrin family protein	C-Energy production and conversion	1,22	up-regulated	early- VBNC
bioD	FTT_0934c	FTL_1275	bethiobiotin synthase	R-General function prediction only	1,22	up-regulated	early- VBNC
rpsF	FTT_1062c	FTL_1024	ribosomal protein S6	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	1,21	up-regulated	early- VBNC
	FTT_1778c	FTL_0105	hypothetical membrane protein	S-Function unknown	1,21	up-regulated	early- VBNC
sufB	FTT_0971	FTL_1230	FeS assembly protein SufB	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,21	down- regulated	late- VBNC
	FTT_1303c	FTL_0411	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,21	down- regulated	early- VBNC
nadA	FTT_1469c	FTL_1390	quinolinate synthetase complex, A subunit	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,21	down- regulated	late- VBNC
prsA	FTT_0674	FTL_0949	ribose-phosphate pyrophosphokinase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,21	down- regulated	late- VBNC
rplB	FTT_0328	FTL_0239	50S ribosomal protein L2	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,21	down- regulated	late- VBNC
relA	FTT_1508c	FTL_0285	GTP pyrophosphokinase	T-Signal transduction mechanisms / F- Nucleotide transport and metabolism	-1,21	down- regulated	late- VBNC
cysS	FTT_1616	FTL_1683	Cysteine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,21	down- regulated	late- VBNC
glgC	FTT_1451c	FTL_0485	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,21	down- regulated	early- VBNC
glgC	FTT_1451c	FTL_0485	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,21	down- regulated	late- VBNC
lipA	FTT_0653	FTL_0927	Lipoyl synthase	S-Function unknown	-1,21	down- regulated	late- VBNC
	FTT_0726c	FTL_1511	glycerophosphoryl diester	I-Lipid transport and metabolism	-1,21	down- regulated	late- VBNC

			phosphodiesterase family protein				
cadA	FTT_0406	FTL_0476	lysine decarboxylase, inducible	E-Amino acid transport and metabolism	-1,21	down-regulated	early-VBNC
gloA	FTT_1212c	FTL_0732	lactoylglutathione lyase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,21	down-regulated	early-VBNC
htpG	FTT_0356	FTL_0267	Hsp90 family protein	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,22	down-regulated	early-VBNC
msrA	FTT_1797c	FTL_1960	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,22	down-regulated	late-VBNC
glnS	FTT_0448c	FTL_1617	Glutamine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,22	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0086	FTL_1773	Dyp-type peroxidase family protein	S-Function unknown	-1,22	down-regulated	late-VBNC
sufD	FTT_0973	FTL_1228	Fe-S cluster assembly protein	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,22	down-regulated	early-VBNC
parC	FTT_0396	FTL_0462	DNA topoisomerase IV, A subunit	L-Replication, recombination and repair	-1,22	down-regulated	early-VBNC
accD	FTT_0372c	FTL_1309	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	I-Lipid transport and metabolism	-1,22	down-regulated	late-VBNC
rpmC	FTT_0333	FTL_0244	50S ribosomal protein L29	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,22	down-regulated	late-VBNC
tktA	FTT_1369c	FTL_1145	transketolase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,22	down-regulated	late-VBNC
murB	FTT_1304c	FTL_0412	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,22	down-regulated	early-VBNC
tig	FTT_0623	FTL_0891	Trigger factor	S-Function unknown	-1,22	down-regulated	late-VBNC
lpxC	FTT_0189	FTL_1906	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,22	down-regulated	late-VBNC
blaFTU	FTT_0611c	FTL_0879	FTU family class A beta-lactamase	V-Defense mechanisms	-1,22	down-regulated	early-VBNC
tyrS	FTT_0691	FTL_0968	Tyrosine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,22	down-regulated	late-VBNC
sohB	FTT_0459	FTL_1605	protease sohB	S-Function unknown	-1,22	down-regulated	late-VBNC
pyk	FTT_1366c	FTL_1148	pyruvate kinase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,22	down-regulated	late-VBNC

	FTT_0200	FTL_1896	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,22	down-regulated	early-VBNC
bioA	FTT_0938	FTL_1271	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,22	down-regulated	late-VBNC
rplM	FTT_1273	FTL_1187	50S ribosomal protein L13	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,22	down-regulated	late-VBNC
hflB	FTT_1310c	FTL_1464	ATP-dependent metalloprotease	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,22	down-regulated	early-VBNC
aroB	FTT_1154c	FTL_0802	3-dehydroquinate synthase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,22	down-regulated	late-VBNC
glk1	FTT_1295c	FTL_0404	glucose kinase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
pta	FTT_1754	FTL_0016	Phosphate acetyltransferase	C-Energy production and conversion	-1,23	down-regulated	late-VBNC
iglI	FTT_1352 / FTT_1707	FTL_0118 / FTL_0118	FPI, Intracellular growth locus I	S-Function unknown	-1,23	down-regulated	early-VBNC
maeA	FTT_0917	FTL_0438	malic enzyme, NAD binding domain protein	C-Energy production and conversion	-1,23	down-regulated	late-VBNC
relA	FTT_1508c	FTL_0285	GTP pyrophosphokinase	T-Signal transduction mechanisms / F-Nucleotide transport and metabolism	-1,23	down-regulated	early-VBNC
sucD	FTT_0503c	FTL_1554	succinate-CoA ligase, alpha subunit	C-Energy production and conversion	-1,23	down-regulated	late-VBNC
dacB	FTT_1039	FTL_1046	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,23	down-regulated	late-VBNC
purL	FTT_1720c	FTL_1860	phosphoribosylformylglycinamide synthase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
yidC	FTT_0233c	FTL_0178	Preprotein translocase subunit YidC	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,23	down-regulated	late-VBNC
pilB	FTT_1133	FTL_0828	type IV-A pilus assembly ATPase PilB	N-Cell motility / W-Extracellular structures	-1,23	down-regulated	early-VBNC
rpe	FTT_0789	FTL_1432	Ribulose-phosphate 3-epimerase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
ubiB	FTT_1298	FTL_0407	2-polyprenylphenol 6-hydroxylase	T-Signal transduction mechanisms / H-Coenzyme transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC

ribH	FTT_1674	FTL_0075	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
rpsE	FTT_0342	FTL_0253	30S ribosomal protein S5	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,23	down-regulated	late-VBNC
wbtF	FTT_1459c	FTL_0597	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein	I-Lipid transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
ftsI	FTT_0697	FTL_1539	penicillin binding transpeptidase domain protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis / V-Defense mechanisms	-1,23	down-regulated	late-VBNC
fumA	FTT_1600c	FTL_0525	hydrolyase, tartrate alpha subunit/fumarate, Fe-S type domain protein	C-Energy production and conversion	-1,23	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0354	FTL_0265	tcdA/TcdB catalytic glycosyltransferase domain protein	S-Function unknown	-1,23	down-regulated	early-VBNC
argS	FTT_0466c	FTL_1598	Arginine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,23	down-regulated	early-VBNC
glgA	FTT_0416	FTL_0486	glycogen/starch synthase, ADP-glucose type family protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,23	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0266	FTL_0146	ABC transporter family protein	S-Function unknown	-1,23	down-regulated	early-VBNC
spoT	FTT_0808	FTL_1413	RelA/SpoT family protein	T-Signal transduction mechanisms / F-Nucleotide transport and metabolism	-1,23	down-regulated	early-VBNC
wbtM / rfbB	FTT_1450c	FTL_0606	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,24	down-regulated	late-VBNC
fadE	FTT_1529	FTL_0585	acyl-CoA dehydrogenase	I-Lipid transport and metabolism	-1,24	down-regulated	early-VBNC
secY	FTT_0345	FTL_0256	preprotein translocase, SecY subunit	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,24	down-regulated	late-VBNC
pdxS	FTT_0511	FTL_1546	pyridoxal 5'-phosphate synthase, synthase subunit Pdx1	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,24	down-regulated	late-VBNC
hemE	FTT_0047	FTL_1812	uroporphyrinogen decarboxylase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,24	down-regulated	early-VBNC

murF	FTT_0422	FTL_0492	UDP-N--acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanyl ligase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,24	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0704	FTL_1532	Uncharacterized protein	S-Function unknown	-1,24	down-regulated	late-VBNC
deaD	FTT_1471c	FTL_1392	ATP-dependent RNA helicase DeaD	L-Replication, recombination and repair	-1,24	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1094c	FTL_1108	Cytosol aminopeptidase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,24	down-regulated	early-VBNC
guaA	FTT_1019c	FTL_1071	GMP synthase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,24	down-regulated	late-VBNC
rplA	FTT_0141	FTL_1747	50S ribosomal protein L1	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,24	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1540c	FTL_0571	Hypothetical protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,24	down-regulated	late-VBNC
iglD	FTT_1356c / FTT_1711c	FTL_0114 / FTL_1160	Intracellular growth locus	S-Function unknown	-1,24	down-regulated	early-VBNC
pepN	FTT_1793c	FTL_1956	aminopeptidase N	E-Amino acid transport and metabolism	-1,24	down-regulated	late-VBNC
glgP	FTT_0417	FTL_0487	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,24	down-regulated	early-VBNC
ftsK	FTT_1635	FTL_1705	DNA translocase FtsK	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-1,24	down-regulated	early-VBNC
coaBC	FTT_1147c	FTL_0808	phosphopantothenoylcy steine decarboxylase / phosphopantothenate--cysteine ligase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,25	down-regulated	early-VBNC
ans	FTT_0803	FTL_1418	asparaginase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,25	down-regulated	late-VBNC
gcvPA	FTT_0409	FTL_0479	cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme family protein	E-Amino acid transport and metabolism	-1,25	down-regulated	late-VBNC
gatA	FTT_0020	FTL_1842	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, A subunit	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,25	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1043	FTL_1042	domain amino terminal to FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,25	down-regulated	late-VBNC

pyrD	FTT_1647c	FTL_0046	diyrorotate dehydrogenase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,25	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1214c	FTL_0730	HAD hydrolase, IIB family protein	S-Function unknown	-1,25	down-regulated	late-VBNC
panB	FTT_1389	FTL_0674	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,25	down-regulated	late-VBNC
pilQ	FTT_1156c	FTL_0800	Type IV pilus secretin PilQ family protein	W-Extracellular structures	-1,25	down-regulated	early-VBNC
aroA	FTT_0588	FTL_0852	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,25	down-regulated	late-VBNC
rpsM	FTT_0347	FTL_0258	30S ribosomal protein S13	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,26	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1637c	FTL_1707	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,26	down-regulated	early-VBNC
ubiB	FTT_1298	FTL_0407	2-polyprenylphenol 6-hydroxylase	T-Signal transduction mechanisms / H-Coenzyme transport and metabolism	-1,26	down-regulated	early-VBNC
metN	FTT_1124	FTL_0838	Methionine import ATP-binding protein MetN	E-Amino acid transport and metabolism	-1,26	down-regulated	early-VBNC
wbtM / rfbB	FTT_1450c	FTL_0606	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,26	down-regulated	early-VBNC
lepA	FTT_1678c	FTL_0071	elongation factor 4	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,26	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0874c	FTL_0375	pilZ domain protein	N-Cell motility	-1,26	down-regulated	late-VBNC
mtnN	FTT_0397	FTL_0463	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	F-Nucleotide transport and metabolism / H-Coenzyme transport and metabolism	-1,26	down-regulated	late-VBNC
glnS	FTT_0448c	FTL_1617	Glutamine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,26	down-regulated	early-VBNC
hisS	FTT_0052	FTL_1807	Histidine--tRNA ligase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,26	down-regulated	late-VBNC
tolR	FTT_0838	FTL_0332	protein TolR	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,26	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1534c	FTL_0579	nicotinate phosphoribosyltransferase family protein	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,26	down-regulated	late-VBNC

argS	FTT_0466c	FTL_1598	Arginine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,26	down-regulated	late-VBNC
sthA	FTT_0684c	FTL_0960	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,26	down-regulated	early-VBNC
trpE	FTT_1802c	FTL_1966	Anthranilate synthase component 1	E-Amino acid transport and metabolism / H-Coenzyme transport and metabolism	-1,27	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1305c	FTL_0413	EPSP synthase family protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,27	down-regulated	early-VBNC
galT	FTT_1475	FTL_1396	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,27	down-regulated	early-VBNC
lptD	FTT_0467	FTL_1597	LPS-assembly protein LptD	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,27	down-regulated	late-VBNC
tpiA	FTT_0080	FTL_1780	triose-phosphate isomerase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,27	down-regulated	late-VBNC
hisS	FTT_0052	FTL_1807	Histidine--tRNA ligase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,27	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0676	FTL_0951	CBS domain protein	S-Function unknown	-1,27	down-regulated	early-VBNC
hslV	FTT_0688c	FTL_0965	ATP-dependent protease HslVU, peptidase subunit	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,27	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0994c	FTL_1207	4Fe-4S iron sulfur cluster binding s, NifH/frxC family protein	S-Function unknown	-1,27	down-regulated	late-VBNC
atpG	FTT_0063	FTL_1796	ATP synthase F1, gamma subunit	C-Energy production and conversion	-1,28	down-regulated	early-VBNC
recN	FTT_0886	FTL_0389	DNA repair protein RecN	L-Replication, recombination and repair	-1,28	down-regulated	late-VBNC
iglH	FTT_1350 / FTT_1705	FTL_0120 / FTL_1166	Intracellular growth locus H	S-Function unknown	-1,28	down-regulated	early-VBNC
rplN	FTT_0335	FTL_0246	50S ribosomal protein L14	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,28	down-regulated	late-VBNC
urvA	FTT_1312c	FTL_1473	excinuclease ABC subunit A	L-Replication, recombination and repair	-1,28	down-regulated	late-VBNC
rlmKL	FTT_0923	FTL_1287	23S rRNA m(2)G2445 methyltransferase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,28	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0385	FTL_0451	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,28	down-regulated	early-VBNC

	FTT_1726	FTL_1867	peptidase U32 family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,28	down-regulated	early-VBNC
pabB	FTT_0945	FTL_1262	aminodeoxychorismate synthase, component I	Q-Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-1,28	down-regulated	early-VBNC
apaH	FTT_0470	FTL_1594	Diadenosine tetraphosphatase	T-Signal transduction mechanisms	-1,28	down-regulated	early-VBNC
gshA	FTT_0367c	FTL_1304	glutamate--cysteine ligase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,28	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1539c	FTL_0572	Uncharacterized protein	S-Function unknown	-1,28	down-regulated	late-VBNC
ccmA	FTT_1782c	FTL_1947	heme ABC exporters, ATP binding protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,28	down-regulated	late-VBNC
alaS	FTT_1096c	FTL_1106	alanyl-tRNA biosynthesis	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,29	down-regulated	early-VBNC
carB	FTT_1664	FTL_0029	carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	E-Amino acid transport and metabolism / F-Nucleotide transport and metabolism	-1,29	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0609	FTL_0877	peptidase, M24 family protein	S-Function unknown	-1,29	down-regulated	early-VBNC
lepA	FTT_1678c	FTL_0071	elongation factor 4	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,29	down-regulated	late-VBNC
dxs	FTT_1018c	FTL_1072	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	I-Lipid transport and metabolism	-1,29	down-regulated	early-VBNC
fabG	FTT_1375	FTL_1139	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	I-Lipid transport and metabolism	-1,29	down-regulated	late-VBNC
ilvE	FTT_0251	FTL_0131	branched-chain amino acid aminotransferase	E-Amino acid transport and metabolism / H-Coenzyme transport and metabolism	-1,29	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1424c	FTL_0637	lactamase_B domain-containing protein	S-Function unknown	-1,29	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1693c	FTL_1717	Uncharacterized protein	S-Function unknown	-1,29	down-regulated	late-VBNC
infA	FTT_0966	FTL_1236	translation initiation factor IF-1	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,30	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0592	FTL_0856	carbonic anhydrase family protein	P-Inorganic ion transport and metabolism	-1,30	down-regulated	late-VBNC
trkA	FTT_0969c	FTL_1232	trkA-N domain protein	P-Inorganic ion transport and metabolism	-1,30	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0913	FTL_0434	Hypothetical protein	S-Function unknown	-1,30	down-regulated	late-VBNC

	FTT_1280c	FTL_1180	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system, EIIA 2 family protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,30	down-regulated	late-VBNC
rplJ	FTT_0142	FTL_1746	ribosomal L10 family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,30	down-regulated	late-VBNC
sufC	FTT_0972	FTL_1229	FeS assembly ATPase SufC	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,30	down-regulated	late-VBNC
nuoI	FTT_0039	FTL_1822	NADH-quinone oxidoreductase, chain I family protein	C-Energy production and conversion	-1,30	down-regulated	late-VBNC
ssb	FTT_1752	FTL_0014	single-stranded DNA-binding protein	L-Replication, recombination and repair	-1,3	down-regulated	early-VBNC
lolA	FTT_1636	FTL_1706	Outer membrane lipoprotein chaperone LolA	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,3	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1149c	FTL_0806	APC family permease	E-Amino acid transport and metabolism	-1,30	down-regulated	early-VBNC
glsA	FTT_0195c	FTL_1900	Glutaminase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,30	down-regulated	early-VBNC
def1	FTT_0403	FTL_0473	polypeptide deformylase family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,31	down-regulated	early-VBNC
yrbI	FTT_1027c	FTL_1062	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase KdsC	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis / R-General function prediction only	-1,31	down-regulated	early-VBNC
aroA	FTT_0588	FTL_0852	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,31	down-regulated	early-VBNC
atpG	FTT_0063	FTL_1796	ATP synthase F1, gamma subunit	C-Energy production and conversion	-1,31	down-regulated	late-VBNC
omp26	FTT_1542c	FTL_0569	Hypothetical protein	S-Function unknown	-1,31	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0610	FTL_0878	DNA/RNA non-specific endonuclease family protein	L-Replication, recombination and repair	-1,31	down-regulated	late-VBNC
coaBC	FTT_1147c	FTL_0808	phosphopantothenoyl cysteine decarboxylase / phosphopantothenate--cysteine ligase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,31	down-regulated	late-VBNC
rpmG	FTT_1604	FTL_0521	ribosomal protein L33	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,31	down-regulated	late-VBNC

pepN	FTT_1793c	FTL_1956	aminopeptidase N	E-Amino acid transport and metabolism	-1,32	down-regulated	early-VBNC
rpmB	FTT_1603	FTL_0522	ribosomal protein L28	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,32	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0474	FTL_1590	DNA-binding protein	S-Function unknown	-1,32	down-regulated	late-VBNC
rnhB	FTT_1278c	FTL_1182	ribonuclease HII	L-Replication, recombination and repair	-1,32	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0665c	FTL_0939	Aldolase_II domain-containing protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,32	down-regulated	late-VBNC
serS	FTT_1332	FTL_1493	Serine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,33	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0474	FTL_1590	DNA-binding protein	S-Function unknown	-1,33	down-regulated	early-VBNC
tolB	FTT_0840	FTL_0334	Protein TolB	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-1,33	down-regulated	early-VBNC
rplF	FTT_0340	FTL_0251	ribosomal protein L6	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,33	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1726	FTL_1867	peptidase U32 family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,33	down-regulated	late-VBNC
ffh	FTT_0964c	FTL_1239	signal recognition particle protein	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,33	down-regulated	late-VBNC
wbtC	FTT_1462c	FTL_0594	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein	S-Function unknown	-1,33	down-regulated	late-VBNC
lpnB	FTT_0904	FTL_0424	putative tul4	S-Function unknown	-1,33	down-regulated	late-VBNC
trhO	FTT_1085	FTL_1118	rhodanese-like domain protein	S-Function unknown	-1,33	down-regulated	late-VBNC
urvA	FTT_1312c	FTL_1473	excinuclease ABC subunit A	L-Replication, recombination and repair	-1,33	down-regulated	early-VBNC
pdpC	FTT_1354 / FTT_1709	FTL_0116 / FTL_1162	Pathogenicity determinant protein C	S-Function unknown	-1,33	down-regulated	early-VBNC
aroG	FTT_0963c	FTL_1240	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,34	down-regulated	late-VBNC
waaY	FTT_1236	FTL_0708	Glycosyltransferase family 4 protein	S-Function unknown	-1,34	down-regulated	late-VBNC
pigR	FTT_0383	FTL_0449	pathogenicity island gene regulator	S-Function unknown	-1,34	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0970	FTL_1231	FeS assembly SUF system regulator	S-Function unknown	-1,34	down-regulated	late-VBNC

mltA	FTT_1271	FTL_1189	mltA specific insert domain protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,34	down-regulated	early-VBNC
murA	FTT_1305c	FTL_0413	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,35	down-regulated	late-VBNC
rpmD	FTT_0343	FTL_0254	ribosomal protein L30	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,35	down-regulated	late-VBNC
iglB	FTT_1358c / FTT_1713c	FTL_0112 / FTL_1158	intracellular growth locus subunit B	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,35	down-regulated	early-VBNC
ftsI	FTT_0697	FTL_1539	penicillin binding transpeptidase domain protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis / V-Defense mechanisms	-1,36	down-regulated	early-VBNC
ccmA	FTT_1782c	FTL_1621	heme ABC exporter, ATP-binding protein CcmA	L-Replication, recombination and repair	-1,36	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0106c	FTL_1671	efflux transporter, RND family, MFP subunit	V-Defense mechanisms	-1,36	down-regulated	late-VBNC
dxr	FTT_1574c	FTL_0534	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	I-Lipid transport and metabolism	-1,36	down-regulated	late-VBNC
pdpB	FTT_1345 / FTT_1700	FTL_0125 / FTL_1171	Pathogenicity determinant protein B	S-Function unknown	-1,37	down-regulated	early-VBNC
ubiG	FTT_1590c	FTL_1638	3-demethylubiquinone-9 3-O-methyltransferase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,37	down-regulated	late-VBNC
pepA	FTT_1318c	FTL_1479	Probable cytosol aminopeptidase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,37	down-regulated	late-VBNC
sthA	FTT_0684c	FTL_0960	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,37	down-regulated	late-VBNC
polA	FTT_0111	FTL_1666	DNA polymerase I	L-Replication, recombination and repair	-1,37	down-regulated	early-VBNC
xseA	FTT_1190c	FTL_0754	OB-fold nucleic acid binding domain protein	L-Replication, recombination and repair	-1,38	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0484	FTL_1579	DUF2147 domain-containing protein	S-Function unknown	-1,38	down-regulated	early-VBNC
fadD2	FTT_1528	FTL_0586	AMP-binding enzyme family protein	I-Lipid transport and metabolism	-1,38	down-regulated	early-VBNC
fdxA	FTT_1764c	FTL_0089	ferredoxin-1	C-Energy production and conversion	-1,38	down-regulated	late-VBNC

recN	FTT_0886	FTL_0389	DNA repair protein RecN	L-Replication, recombination and repair	-1,39	down- regulated	early- VBNC
mpl	FTT_0438	FTL_0508	L-alanyl-gamma-D- glutamyl-meso- diaminopimelate ligase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,39	down- regulated	late- VBNC
galE	FTT_0791	FTL_1430	UDP-glucose 4- epimerase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,39	down- regulated	late- VBNC
	FTT_1094c	FTL_1108	Cytosol aminopeptidase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,39	down- regulated	late- VBNC
	FTT_0891	FTL_0393	PAP2 superfamily protein	S-Function unknown	-1,40	down- regulated	early- VBNC
phoH	FTT_0617c	FTL_0885	PhoH family protein	T-Signal transduction mechanisms	-1,40	down- regulated	early- VBNC
murB	FTT_1304c	FTL_0412	UDP-N- acetylenolpyruvoylgluc osamine reductase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,40	down- regulated	late- VBNC
	FTT_0956c	FTL_1247	2'-5' RNA ligase family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,40	down- regulated	late- VBNC
lpxE	FTT_0891	FTL_0393	PAP2 superfamily protein	S-Function unknown	-1,40	down- regulated	late- VBNC
galT	FTT_1475	FTL_1396	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,40	down- regulated	late- VBNC
urvB	FTT_1199c	FTL_0745	excinuclease ABC subunit B	L-Replication, recombination and repair	-1,41	down- regulated	early- VBNC
metG	FTT_1290	FTL_0444	Methionine--tRNA ligase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,41	down- regulated	late- VBNC
rsmG	FTT_1687c	FTL_0059	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,41	down- regulated	late- VBNC
pilQ	FTT_1156c	FTL_0800	Type IV pilus secretin PilQ family protein	W-Extracellular structures	-1,41	down- regulated	late- VBNC
cmk	FTT_0559c	FTL_1017	Cytidylate kinase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,41	down- regulated	late- VBNC
pyrC	FTT_1660c	FTL_0033	amidohydrolase family protein	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,42	down- regulated	early- VBNC
manB	FTT_1447c	FTL_0609	phosphoglucomutase/ph osphomannomutase, alpha/beta/alpha domain III family protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,42	down- regulated	early- VBNC
	FTT_1322	FTL_1483	insulinase family protein	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,42	down- regulated	early- VBNC

	FTT_1421	FTL_0640	Putative zinc-/iron-chelating domain protein	S-Function unknown	-1,42	down-regulated	late-VBNC
cydB	FTT_0278c	FTL_0188	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	C-Energy production and conversion	-1,42	down-regulated	late-VBNC
sspA	FTT_0458	FTL_1606	stringent starvation protein A	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,42	down-regulated	late-VBNC
glgP	FTT_0417	FTL_0487	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,42	down-regulated	late-VBNC
pyrH	FTT_0315	FTL_0226	Uridylate kinase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,42	down-regulated	late-VBNC
mldD	FTT_1610	FTL_0515	Outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MldD	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,43	down-regulated	late-VBNC
nuoC	FTT_0033	FTL_1828	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	C-Energy production and conversion	-1,43	down-regulated	late-VBNC
lptE	FTT_0991	FTL_1211	LPS-assembly lipoprotein LptE	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,43	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0443	FTL_1623	Aluminium activated malate transporter family protein	S-Function unknown	-1,44	down-regulated	late-VBNC
atpC	FTT_0065	FTL_1794	ATP syntase F1, epsilon subunit	C-Energy production and conversion	-1,44	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1239	FTL_0705	hypothetical membrane protein	S-Function unknown	-1,44	down-regulated	early-VBNC
pdpA	FTT_1344 / FTT_1699	FTL_0126 / FTL_1172	Pathogenicity determinant protein	S-Function unknown	-1,45	down-regulated	early-VBNC
def1	FTT_0403	FTL_0473	polypeptide deformylase family protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,45	down-regulated	late-VBNC
alaS	FTT_1096c	FTL_1106	alanyl-tRNA biosynthesis	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,45	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0910	FTL_04230	GDSL-like lipase/acylhydrolase family protein	S-Function unknown	-1,45	down-regulated	late-VBNC
cyoA	FTT_0281	FTL_0191	ubiquinol oxidase, subunit II	C-Energy production and conversion	-1,45	down-regulated	late-VBNC
dxs	FTT_1018c	FTL_1072	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	I-Lipid transport and metabolism	-1,45	down-regulated	late-VBNC
fslA	FTT_0029c	FTL_1832	iucA/iucC family protein	P-Inorganic ion transport and metabolism	-1,46	down-regulated	late-VBNC

engD	FTT_0679c	FTL_0955	GTP-dependent nucleic acid-binding protein	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,46	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1747	FTL_0009	OmpH family outer membrane protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,46	down-regulated	late-VBNC
ispD	FTT_0711	FTL_1525	2-C-methyl-D-erythritol 4 phosphate cytidylyltransferase	I-Lipid transport and metabolism	-1,47	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1538c	FTL_0573	curli production assembly/transport component CsgG family protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,47	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0732	FTL_1384	chorismate mutase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,47	down-regulated	late-VBNC
rnr	FTT_1553c	FTL_0556	ribonuclease R	K-Transcription	-1,48	down-regulated	early-VBNC
dacB1	FTT_1039	FTL_1509	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,48	down-regulated	early-VBNC
tolB	FTT_0840	FTL_0334	Protein TolB	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-1,48	down-regulated	late-VBNC
cbs	FTT_1287	FTL_1174	Cystathionine beta-synthase (Cystein synthase)	E-Amino acid transport and metabolism	-1,50	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1246	FTL_0698	mannosyl-glycoendo-beta-N-acetylglucosaminidase family protein	S-Function unknown	-1,50	down-regulated	early-VBNC
hflX	FTT_0631	FTL_0899	GTPase HflX	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,50	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1064	FTL_1021	histidine phosphatase super family protein	S-Function unknown	-1,50	down-regulated	early-VBNC
pyrB	FTT_1665	FTL_0028	Aspartate carbamoyltransferase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,50	down-regulated	late-VBNC
nuoA	FTT_0031	FTL_1830	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	C-Energy production and conversion	-1,50	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0389	FTL_0455	acetyltransferase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,50	down-regulated	late-VBNC
proC	FTT_1559c	FTL_0549	Pyrroline-5-carboxylate reductase	E-Amino acid transport and metabolism	-1,50	down-regulated	late-VBNC

	FTT_1633c	FTL_1703	Amino-acid permease	E-Amino acid transport and metabolism	-1,50	down-regulated	late-VBNC
ispE	FTT_0271	FTL_0151	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CMK)	I-Lipid transport and metabolism	-1,50	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0645c	FTL_0918	Bax inhibitor-1/YccA family protein	S-Function unknown	-1,50	down-regulated	late-VBNC
	no homology	FTL_0767	ubiE/COQ5 methyltransferase family protein	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,51	down-regulated	early-VBNC
udp	FTT_1326	FTL_1487	Uridine phosphorylase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,51	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1424c	FTL_0637	lactamase_B domain-containing protein	S-Function unknown	-1,52	down-regulated	late-VBNC
prfB	FTT_0191	FTL_1904	Peptid chain release factor 2	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,52	down-regulated	late-VBNC
rpmA	FTT_0773	FTL_1452	50S ribosomal protein L27	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,53	down-regulated	late-VBNC
pilC	FTT_1134	FTL_0827	Type IV pili polytopic inner membrane protein	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,53	down-regulated	late-VBNC
dnaG	FTT_1036c	FTL_1049	DNA primase	L-Replication, recombination and repair	-1,55	down-regulated	late-VBNC
ppiC	FTT_1472c	FTL_1393	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,55	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1746	FTL_0008	signal peptide peptidase SppA	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,56	down-regulated	late-VBNC
rnr	FTT_1553c	FTL_0556	ribonuclease R	K-Transcription	-1,57	down-regulated	late-VBNC
mleA	FTT_1609	FTL_0516	ABC transporter permease	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,57	down-regulated	late-VBNC
rlmKL	FTT_0923	FTL_1287	23S rRNA m(2)G2445 methyltransferase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,57	down-regulated	early-VBNC
bamA / YeaT	FTT_1573c	FTL_0535	Outer membrane protein assembly factor BamA	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,58	down-regulated	early-VBNC
murE	FTT_0420	FTL_0490	UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,58	down-regulated	early-VBNC

lpcC	FTT_1235c	FTL_0709	Glycosyl transferase groupe 1 family protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,58	down- regulated	early- VBNC
	FTT_1633c	FTL_1703	amino acid transporter	E-Amino acid transport and metabolism	-1,59	down- regulated	early- VBNC
	FTT_0289c	FTL_0199	DUF3568 family protein	S-Function unknown	-1,59	down- regulated	late- VBNC
pgeF	FTT_0608	FTL_0876	peptidoglycan editing factor PgeF	S-Function unknown	-1,60	down- regulated	late- VBNC
sufD	FTT_0973	FTL_1228	Fe-S cluster assembly protein SufD	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,60	down- regulated	late- VBNC
	FTT_1322	FTL_1483	insulinase family protein	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-1,61	down- regulated	late- VBNC
vgrG	FTT_1347 / FTT_1702	FTL_0123 / FTL_1169	Valine-glycine repeat protein G (FPI)	S-Function unknown	-1,61	down- regulated	early- VBNC
murE	FTT_0420	FTL_0490	UDP-N- acetylmuramoyl-L- alanine-D-glutamate-- 2,6-diaminopimelate ligase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,62	down- regulated	late- VBNC
	FTT_0981	FTL_1218	PAC domain-containing protein	S-Function unknown	-1,63	down- regulated	early- VBNC
lysR	FTT_0492c	FTL_1568	Transcriptional regulator, lysR family	K-Transcription	-1,63	down- regulated	early- VBNC
	FTT_0291	FTL_0201	DUF58 domain- containing protein	S-Function unknown	-1,63	down- regulated	early- VBNC
	FTT_1479c	FTL_1400	Trm112 family protein ?	S-Function unknown	-1,63	down- regulated	late- VBNC
lysR	FTT_0492c	FTL_1568	LysR family transcriptional regulator	K-Transcription	-1,63	down- regulated	late- VBNC
	FTT_0243	FTL_0168	regulator of chromosome condensation	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-1,63	down- regulated	early- VBNC
rsfS	FTT_1100	FTL_1100	Ribosome silencing factor	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,64	down- regulated	late- VBNC
uvrD	FTT_0121	FTL_1656	exodeoxyribonuclease V subunit gamma	L-Replication, recombination and repair	-1,64	down- regulated	late- VBNC
ssb	FTT_1752	FTL_0014	single-stranded DNA- binding protein	L-Replication, recombination and repair	-1,64	down- regulated	late- VBNC
udp	FTT_1326	FTL_1487	Uridine phosphorylase	F-Nucleotide transport and metabolism	-1,65	down- regulated	late- VBNC

	FTT_0928c	FTL_1282	glycoside hydrolase family 3 protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,65	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0200	FTL_1896	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,65	down-regulated	late-VBNC
	no homology	FTL_0767	Class I SAM-dependent methyltransferase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,66	down-regulated	late-VBNC
mutS	FTT_1499	FTL_0294	DNA mismatch repair protein MutS	L-Replication, recombination and repair	-1,67	down-regulated	early-VBNC
pth	FTT_0680c	FTL_0956	Peptidyl-tRNA hydrolase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,67	down-regulated	early-VBNC
hflX	FTT_0631	FTL_0989	GTPase HflX	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,67	down-regulated	late-VBNC
rpmF	FTT_1371	FTL_1143	50S ribosomal protein L32	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,67	down-regulated	late-VBNC
ompH	FTT_1572c	FTL_0536	OmpH family outer membrane protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,68	down-regulated	late-VBNC
iglF	FTT_1348 / FTT_1703	FTL_0122 / FTL_1168	Intracellular growth locus F	S-Function unknown	-1,69	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1303c	FTL_0411	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,69	down-regulated	late-VBNC
ispD	FTT_0711	FTL_1525	2-C-methyl-D-erythritol 4 phosphate cytidylyltransferase	I-Lipid transport and metabolism	-1,69	down-regulated	late-VBNC
yajC	FTT_1116c	FTL_0847	preprotein translocase subunit YajC	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-1,70	down-regulated	late-VBNC
blaFTU	FTT_0611c	FTL_0879	FTU family class A beta-lactamase	V-Defense mechanisms	-1,70	down-regulated	late-VBNC
	no homology	FTL_0665	FMN-binding glutamate synthase family protein	S-Function unknown	-1,73	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1137c	FTL_0822	uncharacterized protein	S-Function unknown	-1,75	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1591	FTL_1637	lipoprotein VacJ	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,75	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0484	FTL_1579	DUF2147 domain-containing protein	S-Function unknown	-1,76	down-regulated	late-VBNC
lpxH	FTT_0436c	FTL_0506	UDP-2,3-diacylglucosamine diphosphatase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,76	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1092c	FTL_1110	uncharacterized protein	S-Function unknown	-1,77	down-regulated	early-VBNC

mnmA / trmU	FTT_1677c	FTL_0072	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,77	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0014c	FTL_1852	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,77	down-regulated	late-VBNC
	no homology	FTL_0814	PRC-barrel domain-containing protein	S-Function unknown	-1,79	down-regulated	early-VBNC
	pas de tula	FTL_0814	PRC-barrel domain-containing protein	S-Function unknown	-1,79	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1041	FTL_1044	Acyl-CoA thioesterase	I-Lipid transport and metabolism	-1,80	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0743	FTL_1370	DUF2797 domain-containing protein	S-Function unknown	-1,81	down-regulated	late-VBNC
dacB	FTT_1039	FTL_1046	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,82	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0243	FTL_0168	hypothetical protein / regulator	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-1,83	down-regulated	late-VBNC
	no homology	FTL_0491	DUF4156 domain-containing protein	S-Function unknown	-1,83	down-regulated	late-VBNC
gmhA / lpcA	FTT_1681c	FTL_0068	SIS domain-containing protein	G-Carbohydrate transport and metabolism	-1,83	down-regulated	late-VBNC
folC	FTT_0371c	FTL_1308	bifunctional folylpolyglutamate synthase / dihydrofolate synthase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,83	down-regulated	late-VBNC
lptF	FTT_1319	FTL_1480	LPS export ABC transporter permease LptF	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-1,83	down-regulated	late-VBNC
panB	FTT_1389	FTL_0674	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	H-Coenzyme transport and metabolism	-1,84	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0385	FTL_0451	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,86	down-regulated	late-VBNC
ttcA1	FTT_1042	FTL_1043	tRNA ² -thiocytidine(32) synthetase TtcA	J-Translation, ribosomal structure and biogenesis	-1,89	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0257	FTL_0138	Ribonuclease II family protein	L-Replication, recombination and repair	-1,92	down-regulated	early-VBNC

phoH	FTT_0617c	FTL_0885	PhoH family protein	T-Signal transduction mechanisms	-1,95	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1637c	FTL_1707	hypothetical protein	S-Function unknown	-1,95	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1586c	FTL_1641	DUF 4282 domain-containing protein	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1097	FTL_1105	uncharacterized protein	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	early-VBNC
	FTT_1507	FTL_0286	DUF4124 domain-containing protein	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0453c	FTL_1612	ChbG/HpnK family deacetylase	G-Carbohydrate transport and metabolism	-2,00	down-regulated	early-VBNC
trkH	FTT_1638	FTL_1708	Trk system potassium uptake protein	P-Inorganic ion transport and metabolism	-2,00	down-regulated	early-VBNC
rpoZ	FTT_0703	FTL_1533	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	K-Transcription	-2,00	down-regulated	late-VBNC
ubiK	FTT_0045	no homology	Ubiquinone biosynthesis accessory factor UbiK	H-Coenzyme transport and metabolism	-2,00	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1160c	FTL_0796	putative type IV pili	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-2,00	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1137c	FTL_0822	hypothetical protein	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1064	no homology	histidine-type phosphatase	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1507	FTL_0286	DUF4124 domain-containing protein	S-Function unknown	-2,00	down-regulated	late-VBNC
yrbI	FTT_1027c	FTL_1062	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase KdsC	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis / R-General function prediction only	-2,04	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0237c	FTL_0174	uncharacterized protein	S-Function unknown	-2,06	down-regulated	early-VBNC
minE	FTT_1607	FTL_0518	cell division topological specificity factor MinE	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-2,07	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0794	FTL_1427	HAD-IB family phosphatase	H-Coenzyme transport and metabolism	-2,10	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1608	FTL_0517	ABC transporter ATP-binding protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,11	down-regulated	late-VBNC

grxA	FTT_0533c	FTL_0985	glutaredoxin	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,13	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0793	FTL_1428	ABC transporter ATP-binding and membrane protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,14	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0981	FTL_1218	PAS fold family protein	S-Function unknown	-2,17	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0056c	FTL_1803	MFS transporter	S-Function unknown	-2,17	down-regulated	late-VBNC
lptF	FTT_1319	FTL_1480	Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,20	down-regulated	early-VBNC
lpcC	FTT_1235c	FTL_0709	glycosyltransferase family 4 protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,23	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1095c	FTL_1107	TolC family protein FtlC	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,23	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1404	FTL_0659	Cell division protein	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-2,29	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0257	FTL_0138	RNB domain-containing ribonuclease	L-Replication, recombination and repair	-2,30	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1334c	FTL_1494	Rotein	S-Function unknown	-2,32	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1160c	FTL_0796	putative type IV pili	U-Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-2,33	down-regulated	early-VBNC
feoA	FTT_1403c	FTL_0660	FeoA domain-containing protein	P-Inorganic ion transport and metabolism	-2,33	down-regulated	late-VBNC
pilE6	FTT_1314c	FTL_1475	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing	S-Function unknown	-2,33	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0267	FTL_0147	uncharacterized protein	S-Function unknown	-2,40	down-regulated	early-VBNC
trkH	FTT_1638	FTL_1708	potassium transporter	P-Inorganic ion transport and metabolism	-2,40	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1586c	FTL_1641	DUF 4282 domain-containing protein	S-Function unknown	-2,42	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0859c	FTL_0358	hypothetical protein	S-Function unknown	-2,43	down-regulated	late-VBNC

slyB	FTT_0211c	FTL_1939	outer membrane lipoprotein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,43	down-regulated	late-VBNC
ddl	FTT_0185	FTL_1910	D-alanine--D-alanine ligase family protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis / R-General function prediction only	-2,44	down-regulated	late-VBNC
cptB	FTT_1151c	FTL_0804	succinate dehydrogenase assembly factor 2	O-Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,44	down-regulated	late-VBNC
lptC	FTT_1026c	FTL_1063	LPS export ABC transporter periplasmic protein LptC	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,44	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0793	FTL_1428	ABC transporter, ATP-binding and membrane protein	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,50	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0148	FTL_1740	fatty acid desaturase	I-Lipid transport and metabolism	-2,50	down-regulated	late-VBNC
MinE	FTT_1607	FTL_0518	cell division topological specificity factor	D-Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-2,51	down-regulated	early-VBNC
	FTT_0359	FTL_1293	Helix-turn-helix domain protein	S-Function unknown	-2,53	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0291	FTL_0201	DUF58 domain-containing protein	S-Function unknown	-2,60	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0148	FTL_1740	fatty acid desaturase	I-Lipid transport and metabolism	-2,65	down-regulated	early-VBNC
cspC	FTT_0391c	FTL_0457	Cold-shock protein	K-Transcription	-2,80	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1092c	FTL_1110	hypothetical protein	S-Function unknown	-2,92	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1097	FTL_1105	hypothetical protein	S-Function unknown	-3,00	down-regulated	late-VBNC
lola	FTT_1636	FTL_1706	Outer membrane lipoprotein chaperone LolA	M-Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,06	down-regulated	late-VBNC
	FTT_0237c	FTL_0174	hypothetical protein	S-Function unknown	-3,08	down-regulated	late-VBNC
	FTT_1037c	FTL_1048	GatB/YqeY domain-containing protein	S-Function unknown	-5,88	down-regulated	late-VBNC

