

**APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026
CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant**

Formulaire à compléter et déposer par les porteurs du projet de thèse HDR via l'adresse mail suivante :
ed658@univ-amu.fr OU/ET romane.haddadi@univ-amu.fr

MERCI DE METTRE EN SUJET DU MAIL : Concours ED 658 2026 porteur de projet
Ces dossiers seront publiés pour que les candidats postulent.

au plus tard le 3 mars 2026.

INTITULÉ DU PROJET

« Revealing silent antibiotic resistance: real-time detection of drug-induced efflux. »
« Révéler la résistance silencieuse aux antibiotiques : détection en temps réel de l'efflux induit par les médicaments. »

1- Directrice ou directeur de thèse HDR

NOM	BOLLA	Prénom	Jean Michel
Téléphone portable	06 19 57 04 03	Courriel	Jean-michel.bolla@univ-amu.fr

Unité de recherche (UR) de rattachement

Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :	MCT UMR_MD1, Inserm U1261
Nom de l'UR :	Membranes et Cibles Thérapeutiques

Directrice ou directeur de l'UR

Nom	BOLLA	Prénom	Jean Michel
-----	-------	--------	-------------

2- Codirectrice ou codirecteur de thèse, le cas échéant

NOM	BRASSEUR	Prénom	Gaël
Téléphone portable	06 60 83 85 66	Courriel	brasseur@imm.cnrs.fr

Unité de recherche (UR) de rattachement

Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :	LCB CNRS, UMR7283
Nom de l'UR :	Laboratoire de Chimie Bactérienne

Directrice ou directeur de l'UR

Nom	Magalon	Prénom	Axel
-----	---------	--------	------

SPECIALITE : (Rayer les mentions inutiles)

~~Bio-informatique et Génomique~~ / ~~Biochimie Structurale~~ / ~~Biologie du Cancer~~ / ~~Biologie du Développement~~ / ~~Biologie Végétale~~ / ~~Biotechnologie~~ / ~~Immunologie~~ / Microbiologie et interactions hôte-pathogènes / ~~Neurosciences~~

SOUS JURY POUR LE CONCOURS : (Rayer les mentions inutiles)

~~JURY 1 : BIOLOGIE CELLULAIRE~~

~~JURY 2 : MICROBIOLOGIE – GENOMIQUE~~

~~JURY 3 : NEURSOCIENCES~~

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Project description :

Have you ever considered that well-known drugs frequently provided for common chronic diseases may be silently contributing to the antibiotic resistance crisis? Aspirin, ibuprofen, sodium salicylate, and paracetamol are among the world's most widely used drugs for chronic conditions such as cardiovascular disease, arthritis, and persistent pain. Beyond their therapeutic roles, they can **transiently increase the expression of bacterial efflux pumps** [1], molecular machines that expel antibiotics and drive multidrug resistance (MDR). Unlike mutational or enzymatic resistance, this effect is reversible and environment-dependent: efflux expression returns to baseline once the inducer is removed. As a result, routine antibiograms fail to detect it, even though patients on continuous therapy may sustain plasma concentrations sufficient to trigger efflux *in vivo*. This creates a **hidden form of resistance** that emerges during treatment but escapes clinical diagnostics.

The AcrAB-TolC efflux pump in *E. coli* and *Klebsiella* is a key Gram-negative resistance mechanism, expelling various antimicrobials and toxins under tight but environment-sensitive regulation. Salicylates (aspirin metabolites) interact with MarR to activate *marA* transcription, which upregulates *acrAB* and downregulates porins such as OmpF, thereby limiting intracellular drug accumulation. Ibuprofen and paracetamol act through similar pathways, transiently elevating MICs of fluoroquinolones, tetracyclines, and cephalosporins. Our recent published review [1] is the first to compile all known pharmacological inducers of efflux overexpression and their clinical relevance. However, limited data on induction kinetics, concentration thresholds, and the lack of standardized rapid assays hinder accurate diagnosis and lead to underestimation of induced resistance.

Therapeutic plasma levels of sodium salicylate, ibuprofen, and paracetamol overlap with concentrations that induce AcrAB-TolC efflux in Gram-negative bacteria: high-dose aspirin results in 1-2 mM salicylate (threshold 0.5-5 mM), ibuprofen reaches 100-250 μ M, and paracetamol 66-132 μ M. Thus, long-term or repeated use of these drugs can prime efflux-mediated resistance, which dissipates once the drug clears and evades routine diagnostics but may reduce antibiotic efficacy in patients. Despite strong *in vitro* and *in vivo* evidence, data on induction thresholds, kinetics, and clinical impact remain scarce, partly due to slow, non-standardized detection methods. Our work aims to fill this gap by quantifying NSAIDs (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs) and paracetamol-induced AcrAB-TolC expression using advanced efflux detection methods, including **our proprietary** rapid fluorescent probes marketed as **ColorFlux™** and its derivatives [2,3]. In this respect, we employ real-time flow cytometry to provide detailed insights and kinetics data into the induction dynamics under clinically relevant therapeutic conditions.

Description du projet :

Avez-vous déjà pensé que les médicaments bien connus fréquemment prescrits pour traiter les maladies chroniques courantes pourraient contribuer silencieusement à la crise de la résistance aux antibiotiques ? L'aspirine, l'ibuprofène, le salicylate de sodium et le paracétamol font partie des médicaments les plus largement utilisés dans le monde pour traiter les pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, l'arthrite et les douleurs persistantes. Au-delà de leur rôle thérapeutique, ils peuvent augmenter de manière transitoire l'expression des pompes d'efflux bactériennes [1], des machines moléculaires qui expulsent les antibiotiques et favorisent la multirésistance aux médicaments (MDR). Contrairement à la résistance par mutation ou enzymatique, cet effet est réversible et dépend de l'environnement : l'expression de l'efflux revient à son niveau de base une fois que l'inducteur est éliminé. Par conséquent, les antibiogrammes de routine ne permettent pas de la détecter, même si les patients sous traitement continu peuvent maintenir des concentrations plasmatiques suffisantes pour déclencher l'efflux *in vivo*. Cela crée une forme cachée de résistance qui apparaît pendant le traitement mais échappe aux diagnostics.

La pompe d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli* et *Klebsiella* est un mécanisme de résistance clé, expulsant divers antimicrobiens et toxines sous une régulation stricte mais sensible à l'environnement. Les salicylates (métabolites de l'aspirine) interagissent avec MarR pour activer la transcription de *marA*, qui régule à la hausse *acrAB* et à la baisse les porines telles que OmpF, limitant ainsi l'accumulation intracellulaire de médicaments. L'ibuprofène et le

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

paracétamol agissent par des voies similaires, augmentant de manière transitoire les CMI des fluoroquinolones, des tétracyclines et des céphalosporines.

Notre récente revue publiée [1] est la première à compiler tous les inducteurs pharmacologiques connus de la surexpression de l'efflux et leur pertinence clinique. Cependant, les données limitées sur la cinétique d'induction, les seuils de concentration et l'absence de tests rapides standardisés entravent un diagnostic précis et conduisent à une sous-estimation de la résistance induite.

Les concentrations plasmatiques thérapeutiques du salicylate de sodium, de l'ibuprofène et du paracétamol chevauchent les concentrations qui induisent l'efflux AcrAB-TolC chez les bactéries Gram-négatives : une dose élevée d'aspirine entraîne 1 à 2 mM de salicylate (seuil de 0,5 à 5 mM), l'ibuprofène atteint 100 à 250 μ M et le paracétamol 66 à 132 μ M. Ainsi, l'utilisation prolongée ou répétée de ces médicaments peut déclencher une résistance médiée par l'efflux, qui disparaît une fois que le médicament est éliminé et échappe aux diagnostics de routine, mais qui peut réduire l'efficacité des antibiotiques chez les patients. Malgré des preuves solides *in vitro* et *in vivo*, les données sur les seuils d'induction, la cinétique et l'impact clinique restent rares, en partie en raison de méthodes de détection lentes et non standardisées. Nos travaux visent à combler cette lacune en quantifiant l'expression de l'AcrAB-TolC induite par les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) et le paracétamol à l'aide de méthodes avancées de détection de l'efflux, notamment nos sondes fluorescentes rapides exclusives commercialisées sous le nom de ColorFlux™ et ses dérivés [2,3]. Pour cela, nous utilisons la cytométrie en flux en temps réel pour fournir des informations détaillées et des données cinétiques sur la dynamique d'induction dans des conditions thérapeutiques cliniquement pertinentes.

Keywords : Antibiotic resistance; Early detection; Resistance-inducing drugs; Efflux pumps; Diagnosis; Flow cytometry; Clinical strains.

Mots clé : Résistance aux antibiotiques ; Détection précoce ; Médicaments induisant une résistance ; Pompes d'efflux ; Diagnostic ; Cytométrie en flux; Souches cliniques.

Theme / Field / Context:

The long-standing, silent epidemic known as antimicrobial resistance (AMR) has grown to be a serious public health emergency. Selective pressures brought on by overuse or improper use of antibiotics have accelerated the rise of AMR bacteria.^[4] AMR and its substantial social and economic repercussions have been the subject of serious deliberations at the World Health Organisation (WHO), G7, and G20 summits.^[5] Despite significant breakthroughs in medical technology, detecting and characterizing infections can take several days. As a result, practitioners are required to start empiric antibiotic treatment, which is typically broad-spectrum. This may not only increase the risk of over-drug exposure (i.e., microbiome dysbiosis) but also aggravate the ongoing AMR crisis.^[6] Controlling overuse of antimicrobials requires regular "review and revise" of patients with the goal of de-escalation (i.e. switching to "narrower spectrum" agents and/or reducing the number of drugs prescribed, etc.). Therefore, providing rapid and reliable diagnostic results can assist in "review and revise" and is a significant way for microbiology laboratories to contribute to antimicrobial stewardship.^[7] The PHG Foundation and Health Action International (HAI) most recently declared in 2023 that combating antibiotic resistance can greatly benefit from the development and broad application of more precise and quick diagnostic tests.^[8] In 2019, the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) issued a similar statement.

Although, antibacterial resistance is developed through various mechanisms, increased active efflux of drugs is of particular importance, especially as a single type of multidrug (MDR) efflux pump can induce resistance to multiple drugs simultaneously, resulting in an MDR phenotype. Bacterial efflux pumps contribute to antibiotic resistance and play an important role in fundamental bacterial physiology (regulation of pH, transport of toxins, etc.) and pathogenicity.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Thème / Domaine / Contexte :

L'épidémie silencieuse et persistante connue sous le nom de résistance aux antimicrobiens (RAM) est devenue une grave urgence de santé publique. Les pressions sélectives exercées par la surutilisation ou l'utilisation inappropriée des antibiotiques ont accéléré la prolifération des bactéries résistantes aux antimicrobiens [4]. La RAM et ses répercussions sociales et économiques considérables ont fait l'objet d'importantes délibérations lors des sommets de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), du G7 et du G20. [5] Malgré des progrès significatifs dans le domaine des technologies médicales, la détection et la caractérisation des infections peuvent prendre plusieurs jours. Par conséquent, les praticiens sont tenus de commencer un traitement antibiotique empirique, généralement à large spectre. Cela peut non seulement augmenter le risque de surexposition aux médicaments (c'est-à-dire la dysbiose du microbiome), mais aussi aggraver la crise actuelle de la RAM. [6] Pour contrôler la surutilisation des antimicrobiens, il est nécessaire de suivre régulièrement les patients dans le but de réduire la prescription (c'est-à-dire passer à des agents à « spectre plus étroit » et/ou réduire le nombre de médicaments prescrits, etc). Par conséquent, la fourniture de résultats diagnostiques rapides et fiables peut faciliter l'«examen et la révision» et constitue un moyen important pour les laboratoires de microbiologie de contribuer à la gestion des antimicrobiens.[7] La PHG Foundation et Health Action International (HAI) ont récemment déclaré en 2023 que la lutte contre la résistance aux antibiotiques pouvait grandement bénéficier du développement et de l'application à grande échelle de tests diagnostiques plus précis et plus rapides.[8] En 2019, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a publié une déclaration similaire. Bien que la résistance aux antibiotiques se développe par divers mécanismes, l'augmentation de l'efflux actif des médicaments revêt une importance particulière, d'autant qu'un seul type de pompe à efflux (MDR) peut induire une résistance à plusieurs médicaments simultanément, entraînant un phénotype MDR. Les pompes à efflux bactériennes contribuent à la résistance aux antibiotiques et jouent un rôle important dans la physiologie bactérienne fondamentale (régulation du pH, transport des toxines, etc.) et la pathogénicité.

Method:

The project is divided in **three work packages**:

WP1: Mode of Induction & Threshold Concentrations: This WP aims to determine how aspirin, ibuprofen, paracetamol, and selected antibiotics/biocides induce AcrAB-TolC activity and affect porin production, noting that some antibiotics (e.g., β -lactams) enter bacteria via porins. MICs will be measured **on *E. coli* (AG100 series including mutants $\pm$ pumps, $\pm$ porins) and *K. pneumoniae* reference strains and mutants**, as well as 10 clinical isolates each, across prophylactic and therapeutic ranges of inducers, using **MCT's Bac-Screen platform**. Porin and AcrAB-TolC protein levels will be quantified using **our antibody collection** [9,10]. Strains with diverse phenotypes, including porin loss and efflux overexpression, are available in **our strains library** [5]. This will provide precise concentration thresholds for each inducer and comparative induction profiles across isolates.

WP2: Kinetics of Induction via Fluorescent Probes & Flow Cytometry (in collaboration with Dr G. Brasseur LCB Marseille): The aim of this WP is to define the onset, magnitude, and reversibility of efflux induction. Since induction is short-lived once the inducer is removed, we will capture the complete kinetics. Using ColorFlux™ derivatives, probe accumulation will be monitored for 30 minutes, followed by flow cytometry with single-cell resolution and precise quantification using millions of cells [11]. Comparisons of wild-type, AcrAB-deficient, and overproducing strains will show the inducer's effect, and NSAID combinations will be tested for synergistic or antagonistic interactions. This will generate real-time kinetic curves and quantify efflux velocities under therapeutic conditions.

WP3: Efflux vs Membrane Permeability (in collaboration with Dr G. Brasseur LCB Marseille): The objective of this WP is to separate efflux activity from porin-mediated permeability. We will compare probe uptake in isogenic *E. coli* (AG100 series $\pm$ pumps, $\pm$ porins) and *K. pneumoniae* mutants, assessing compound transport with and without inducers to clarify the relative contributions of efflux and permeability.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Méthode :

Le projet est divisé en **trois étapes** :

Étape 1 : Mode d'induction et concentrations seuils : cette étape vise à déterminer comment l'aspirine, l'ibuprofène, le paracétamol et certains antibiotiques/biocides induisent l'activité de AcrAB-TolC et affectent la production de porines, en tenant compte du fait que certains antibiotiques (par exemple les β -lactamines) pénètrent dans les bactéries via les porines. Les CMI seront mesurées sur des souches de référence et des mutants d'*E. coli* (série AG100, y compris les mutants $\pm$ pompes, $\pm$ porines) et de *Klebsiella*, ainsi que sur 10 isolats cliniques chacun, dans les gammes prophylactiques et thérapeutiques des inducteurs, à l'aide de la plateforme Bac-Screen du laboratoire MCT. Les niveaux de protéines porines et AcrAB-TolC seront quantifiés à l'aide de notre collection d'anticorps [9,10]. Des souches présentant divers phénotypes, notamment la perte de porines et la surexpression d'efflux, sont disponibles dans notre souchothèque [5]. Cela permettra d'obtenir des seuils de concentration précis pour chaque inducteur et des profils d'induction comparatifs entre les isolats.

Étape 2 : Cinétique de l'induction via des sondes fluorescentes et cytométrie en flux (en collaboration avec le Dr G. Brasseur, LCB Marseille) : L'objectif de cette étape est de définir le début, l'ampleur et la réversibilité de l'induction de l'efflux. L'induction étant de courte durée une fois l'inducteur retiré, nous capturerons la cinétique complète. À l'aide de dérivés ColorFlux™, l'accumulation des sondes sera surveillée pendant 30 minutes, puis suivie d'une cytométrie en flux avec une résolution unicellulaire et une quantification précise à partir de millions de cellules [11]. Des comparaisons entre des souches de type sauvage, déficientes en AcrAB et surproductrices montreront l'effet de l'inducteur, et des combinaisons d'AINS seront testées pour détecter des interactions synergiques ou antagonistes. Cela permettra de générer des courbes cinétiques en temps réel et de quantifier les vitesses d'efflux dans des conditions thérapeutiques.

Étape 3 : Efflux vs perméabilité membranaire (en collaboration avec le Dr G. Brasseur LCB Marseille) : L'objectif est de séparer l'activité d'efflux de la perméabilité médiée par les porines. Nous comparerons l'absorption de la sonde dans des mutants isogéniques d'*E. coli* (série AG100 $\pm$ pompes, $\pm$ porines) et de *Klebsiella*, en évaluant le transport des composés avec et sans inducteurs afin de clarifier les contributions relatives de l'efflux et de la perméabilité.

Bibliography:

- [1] Novelli, M.; **Bolla, J.M.** *Antibiotics*, **2024**, *13*. DOI: 10.3390/antibiotics13060501.
- [2] Patil, M.; Munteanu, T.; **Brasseur, G.**; Ferreira, C.; Costa, S.S.; Couto, I.; Athar, M.; Asunis, E.; Vargiu, A.V.; Viveiros, M.; DiGiorgio, C.; Brunel, F.; Raimundo, J.M.; Camplo, M.; Siri, O.; **Bolla, J.M.** *Adv Healthc Mater*, **2025**, *14*. DOI: 10.1002/adhm.202404145.
- [3] Brunel, F.; Krykun, Serhii; Patil, M.; Camplo, M.; **Bolla, J.-M.**; Raimundo, J.-M.; Garzino, F.; Granotel, E. WO2023139263A1, Composés de Phenazine Pour Mesurer l'efflux Bactérien, July 27, **2023**.
- [4] M. Bassetti, S. S. Kanj, P. Kiratisin, C. Rodrigues, D. Van Duin, M. V. Villegas, Y. Yu, *JAC-Antimicrobial Resistance* **2022**, *4*, DOI 10.1093/jacamr/dlac089.
- [5] S. Tejpar, S. Rogers Van Katwyk, L. Wilson, S. J. Hoffman, *BMJ Global Health* **2022**, *7*, DOI 10.1136/bmjgh-2021-008159.
- [6] G. D. Kaprou, I. Bergšpica, E. A. Alexa, A. Alvarez-Ordóñez, M. Prieto, *Antibiotics* **2021**, *10*, DOI 10.3390/antibiotics10020209.
- [7] P. Morency-Potvin, D. N. Schwartz, R. A. Weinstein, *Clinical Microbiology Reviews* **2017**, *30*, DOI 10.1128/CMR.00066-16.
- [8] H. A. International, "Lack of diagnostic use hampering fight against antimicrobial resistance" 2023.
- [9] Masi, M.; Vergalli, J.; Ghai, I.; Barba-Bon, A.; Schembri, T.; Nau, W.M.; Lafitte, D.; Winterhalter, M.; Pagès, J.M. *Commun Biol*, **2022**, *5*. DOI: 10.1038/s42003-022-04035-y.
- [10] Ferrand, A.; Vergalli, J.; Bosi, C.; Pantel, A.; Pagès, J.M.; Davin-Regli, A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2023**, *78*. DOI: 10.1093/jac/dkad122.
- [11] Dargham, T.; Aguilera-Correa, J.J.; Avellan, R.; Mallick, I.; Celik, L.; Santucci, P.; **Brasseur, G.**; Poncin, I.; Point, V.; Audebert, S.; Camoin, L.; Daher, W.; Cavalier, J.F.; Kremer, L.; Canaan, S. *mBio*, **2025**, *16*. DOI: 10.1128/mbio.01475-24.

**APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026
CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant**

Scientific, material, and financial conditions of the research project:

This project will be carried out in the MCT (Membrane and Therapeutic Targets) UMR_MD1 laboratory, Inserm U1261 (<https://mct-aixmarseille.fr>), in collaboration with the LCB (Laboratory of Bacterial Chemistry), UMR-CNRS 7283 (<https://lcb.cnrs.fr>). These two units are associated with the IM2B University Institute (<https://institut-im2b.univ-amu.fr/fr>).

For several years, these two laboratories have been developing the analysis of chemical compounds that are substrates for antibiotic efflux pumps in bacteria (2).

The MCT laboratory is fully equipped to carry out all the microbiology experiments included in this project, with a collection of over 3,000 strains from partner hospitals and laboratories. The LCB will contribute its expertise in flow cytometry with a new spectral sorter instrument. The research will be funded from our own resources.

Conditions scientifiques, matérielles et financières du projet de recherche :

Ce projet sera mené au sein du laboratoire MCT (Membrane et Cibles thérapeutiques) UMR_MD1, Inserm U1261 (<https://mct-aixmarseille.fr>), en collaboration avec le LCB (Laboratoire de Chimie Bactérienne), UMR-CNRS 7283 (<https://lcb.cnrs.fr>). Ces deux unités sont associées à l'Institut universitaire IM2B (<https://institut-im2b.univ-amu.fr/fr>).

Depuis plusieurs années, ces deux laboratoires développent l'analyse des composés chimiques qui sont des substrats pour les pompes d'efflux d'antibiotiques chez les bactéries (2).

Le laboratoire MCT est entièrement équipé pour réaliser toutes les expériences microbiologiques incluses dans ce projet, avec une collection de plus de 3 000 souches provenant d'hôpitaux et de laboratoires partenaires. Le LCB apportera son expertise en cytométrie en flux avec un nouvel instrument de tri spectral. La recherche sera financée par nos propres ressources.

Required profile and skills:

The candidate must have a solid background in microbiology, specifically bacteriology, with knowledge of organic chemistry if possible.

We are looking for a motivated individual who is interested in both fundamental and applied research, given that this project aims to follow a valorisation process.

Profil et compétences requis :

Le candidat doit avoir une solide formation en microbiologie, plus particulièrement en bactériologie, et si possible des connaissances en chimie organique.

Nous recherchons une personne motivée qui s'intéresse à la fois à la recherche fondamentale et à la recherche appliquée, étant donné que ce projet vise à suivre un processus de valorisation.