

ANNÉE 2023

N°

THÈSE
Pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Mickael AOUN

Présentée et soutenue publiquement le 23 Janvier 2023

Étude des propriétés anti-virulentes et anti-biofilm d'analogues synthétiques de molécules d'origine végétale contre *Pseudomonas aeruginosa* en contexte de mucoviscidose

Président : M. Olivier Grovel, Professeur de Pharmacognosie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Directrice de thèse : Mme Lise Crémet, Maître de Conférences de Bactériologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Membres du jury : Mme Nidia Alvarez Rueda, Maître de Conférences de Parasitologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Jane Davies, Professeure en pneumologie pédiatrique, Imperial College of London, Londres

Remerciements

Pour la réalisation de ce projet, j'ai eu l'immense chance d'être accompagné par une équipe multidisciplinaire, qui a su partager avec moi temps, intérêt, et connaissances pour me permettre de me sentir à l'aise et de fournir un travail scientifique de qualité optimale.

Je tiens donc à remercier toute l'équipe qui m'a entouré, y compris ceux qui travaillaient sur des sujets qui n'étaient pas reliés au mien, à commencer par les doctorants : Ronan Murphy, pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire et protocoles mis en place dans l'équipe, ainsi qu'Alice Collins et Luca Robinson pour m'avoir aidé optimiser mes expérimentations et me guider dans ma démarche scientifique.

Je tiens également à remercier le Dr Laura Nolan, qui m'a accompagné dans la conception expérimentale du test d'éradication de biofilm ainsi que le Dr Luke Allsopp pour avoir pris du temps pour me proposer des ajustements expérimentaux et partager son point de vue scientifique pour guider mon projet.

Ensuite, je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Jane Davies, qui tout au long de ce projet m'a encadré, m'a motivé en partageant son enthousiasme pour le projet et les perspectives qu'il implique cliniquement, m'a confié énormément de responsabilités et m'a permis de confirmer que mon avenir professionnel se devait de mêler à la fois recherche et clinique.

Enfin, un merci particulier à Alecks Cunanan, technicienne de laboratoire qui m'a accompagné dans la réalisation des expériences pendant la majeure partie de mon parcours, et qui m'a donné beaucoup de son temps pour permettre à ce projet d'avancer à la vitesse souhaitée.

Plus important encore, je tiens particulièrement à remercier ma famille, mes parents, mon frère, ma sœur et notre chienne Olie, de m'avoir permis d'être dans d'excellentes conditions tout au long de mes études, et favoriser ainsi mon épanouissement universitaire. De même, je ne pourrai jamais les remercier assez de m'avoir permis d'intégrer l'un des établissements les plus prestigieux du monde pour ce Master, la réussite de cette année et l'aboutissement de ce projet sont également leurs, au vu des sacrifices qu'ils ont dû endurer durant cette même année.

Enfin, je souhaite remercier l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes, qui du fait de la qualité de son enseignement et le suivi des élèves, permet à chaque étudiant de s'épanouir dans une voie qui lui correspond et de bien comprendre les enjeux de ce si beau métier, aux multiples facettes, qui n'a toujours pas fini d'évoluer.

Un dernier merci pour les membres de ce jury de thèse, le Président Olivier Grovel, Mme Lidia Alvarez Rueda pour avoir montré leur intérêt sur ce projet, Mme Jane Davies pour me faire l'honneur de sa présence depuis Londres après tout son accompagnement sur place, et enfin ma directrice de thèse Mme Lise Crémet, pour avoir partagé un grand intérêt avant même le début de ce projet, permettant de garder un niveau motivationnel constant, et enfin de me permettre de vous présenter cette thèse écrite.

Déclaration d'originalité

Je certifie que cette thèse, et les recherches auxquelles elle se réfère, sont le produit de mes propres travaux, menés au cours de mon année de Master du « MSc in Genes, Drugs and Stem Cells-Novel Therapies » à l'Imperial College de Londres. Ces éléments figurent également dans un mémoire publié à l'Imperial College de Londres, intitulé « New drugs for old bugs : Synthetic analogues of plant-based molecules with anti-pseudomonas virulence properties ». Toutes les notions mentionnées ou citations du travail d'autres personnes, publiées ou non, ou de mon propre travail antérieur sont pleinement reconnues conformément aux pratiques de référencement standard de la discipline.

Liste des abréviations

- ASL : airway surface liquid
- BHL : N-butyryl-L-homoserine lactone
- CFU : colony-forming unit
- CLS : colistin
- CF : cystic fibrosis
- CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- eDNA : extracellular DNA (desoxyribonucleic acid)
- ENaC : epithelial sodium channel
- EPS : extracellular polymeric substances
- IL-22 and IL-8 : interleukine-22 and 8, respectively
- IQS : integrated quorum sensing signal (2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde)
- LasA and LasB : elastase A and B, respectively
- MHB : muller hinton broth
- OD : optical density
- OdDHL : N-oxododecanoyl-L-homoserine lactone
- Pa : *Pseudomonas aeruginosa*
- PQS : *Pseudomonas* quinolone signal (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone)
- PIV : protease IV
- PYO : pyocyanin
- QS : quorum sensing
- Rpm : rotations per minute
- TSB : tryptone soy broth

Table des matières

I-	Abstract	9
II-	Introduction	11
A-	Physiopathologie de la mucoviscidose	11
B-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1-	Introduction	15
2-	Facteurs de virulence sécrétés	16
3-	Biofilm	21
4-	Quorum sensing	23
C-	Prise en charge thérapeutique de la mucoviscidose	26
1-	Traitements actuels	26
2-	Perspectives de traitement futures	28
D-	Lien avec le projet réalisé	31
1-	Contexte	31
2-	Hypothèse et objectifs	31
III-	Matériel et Méthodes	33
IV-	Résultats	40
A-	Caractéristiques des souches étudiées	40
1-	Profil de croissance bactérienne	40
2-	Formation de biofilm des souches cliniques étudiées	42
3-	Production de Pyocyanine des souches cliniques étudiées	44
B-	Activité du NBA140 sur le biofilm de Pa	47
1-	Activité du NBA140 sur la formation de biofilm	47
2-	Activité du NBA140 sur un biofilm préformé	49
C-	Activité du NBA2456 sur la production de facteurs de virulence	52
1-	Activité du NBA2456 la production de Pyocyanine	52
2-	Activité du NBA2456 sur l'activité de la protéase IV	54
V-	Discussion	57
VI-	Conclusion et perspectives	65
VII-	Bibliographie	67

Table des figures

Figure 1: Illustration des différents types de mutations affectant CFTR et des approches thérapeutiques associées (5)	11
Figure 2: Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau pulmonaire.	13
Figure 3: Illustration de la synthèse de pyocyanine via la voie de l'acide chorismique (24) ...	18
Figure 4 : Mécanismes redox de production de ROS à partir de PYO (34).....	19
Figure 5 : Étapes du développement du biofilm de Pa (52)	21
Figure 6: Illustration du quorum sensing chez Pa et des 4 différents systèmes et signaux impliqués : OdDHL, IQS, BHL et PQS (63).....	23
Figure 7: Structures moléculaires des signaux impliqués dans la détection du QS de Pa	25
Figure 8: Chronologie de l'évolution des traitements symptomatiques de la mucoviscidose depuis sa première description pathologique et leur relation avec l'espérance de vie	26
Figure 9 : Formule chimique de l'Ajoène (stéréoisomère E) (86)	31
Figure 10: Courbes de croissance bactérienne pour les différentes souches étudiées	41
Figure 11: Évaluation de la formation du biofilm des souches d'intérêt.....	43
Figure 12: Production de pyocyanine des souches d'intérêt.....	46
Figure 13: Formation de biofilm sous traitement avec NBA140	48
Figure 14: Test d'éradication du biofilm après traitement avec NBA140 et/ou colistine (CLS)	50
Figure 15: Production de pyocyanine après traitement avec NBA2456	53
Figure 16: Activité de la protéase IV après traitement avec NBA2456.....	55

Table des tableaux

Tableau 1: Liste de thérapies en cours d'essais cliniques pour la mucoviscidose	30
Tableau 2: Caractéristiques du premier lot de souches utilisées dans nos travaux	34

I- Abstract

La mucoviscidose, aussi dénommée fibrose kystique (*CF : Cystic Fibrosis*) est la maladie autosomique récessive la plus courante en Europe, et bien que l'espérance de vie à la naissance augmente régulièrement pour les patients atteints de CF, elle reste à ce jour une maladie incurable. Elle provient d'une ou plusieurs mutations du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), un canal ionique principalement présent dans les poumons et le système digestif, et qui est impliqué dans l'export des ions chlorure et bicarbonate vers le milieu extracellulaire. Ces mutations peuvent affecter l'activité du canal ou sa localisation, entraînant des manifestations cliniques différentes selon les patients. Dans ce projet, nous nous concentrons sur la composante respiratoire de la pathologie, qui est la plus invalidante et la plus critique quant au pronostic vital du patient. Le canal CFTR joue un rôle dans le maintien de l'hydratation et du pH du liquide de surface des voies respiratoires (ASL). Ce dernier est essentiel au bon fonctionnement du système respiratoire, et agit comme une barrière immunitaire contre les éléments inhalés comme les toxines ou les pathogènes. Un dysfonctionnement du canal CFTR entraîne donc des conséquences importantes sur le fonctionnement du système respiratoire, notamment par la génération d'un contexte inflammatoire et en favorisant l'implantation de bactéries. En effet, les infections sont la cause majeure de détérioration de la fonction respiratoire.

La principale bactérie infectant les patients atteints de mucoviscidose est *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie multirésistante possédant une grande adaptabilité et étant capable d'infecter les patients de manière chronique. Pour ce faire, cet agent pathogène dispose d'une batterie de mécanismes lui permettant de produire des facteurs de virulence responsables de la dégradation de l'épithélium pulmonaire ou encore d'une inflammation. Il a également la

capacité de développer un biofilm, une forme d'agrégation bactérienne se développant à la surface de l'épithélium pulmonaire et créant une barrière réduisant la sensibilité des bactéries aux xénobiotiques et aux défenses immunitaires. Ces mécanismes sont régis par la détection du quorum, correspondant à la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à adapter la synthèse de certains facteurs en fonction de la densité bactérienne.

La prise en charge de la mucoviscidose est aujourd'hui essentiellement symptomatique et repose majoritairement sur la prise d'agents anti-infectieux. Au cours des années 2000, des modulateurs du canal CFTR ont été développés, apportant la possibilité de restaurer partiellement la fonction ou la localisation du canal CFTR, améliorant significativement la qualité de vie des patients.

Dans ce projet, notre équipe a travaillé sur l'évaluation de l'activité de 2 nouveaux composés développés par Neem Biotech Ltd., sur des souches cliniques de patients infectés à différents niveaux de chronicité. Ces composés sont dérivés de l'Ajoene, une molécule extraite de l'ail qui présente des effets anti-virulents contre les *Pseudomonas*. La première étape de ce projet a été de comprendre les différents types de phénotypes de *Pseudomonas aeruginosa* et de tester l'impact des 2 composés sur la production de facteurs de virulence ou la formation de biofilm des souches étudiées. Nous montrons dans ce rapport que les composés testés ne semblent pas exercer d'action sur ces paramètres mais suggérons des pistes possibles à investiguer afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action.

II- Introduction

La mucoviscidose (CF) est une maladie chronique rare d'origine monogénique qui touche notamment les voies respiratoires et digestives. C'est la maladie autosomique récessive la plus fréquemment rencontrée en Europe, affectant environ 1 naissance sur 3 500 (1). C'est pour le moment une maladie toujours incurable, mais l'espérance de vie à la naissance ne cesse d'augmenter et est dorénavant estimée à 50 ans pour une personne née dans les années 2000 au Royaume-Uni (2), pour un âge médian au décès de 28 ans au décès (3).

A- Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose a pour origine une ou plusieurs mutations du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR), codant pour une protéine ayant la fonction de canal anionique appelée CFTR, et qui exporte des ions chlorure et bicarbonate vers le milieu extracellulaire (4).

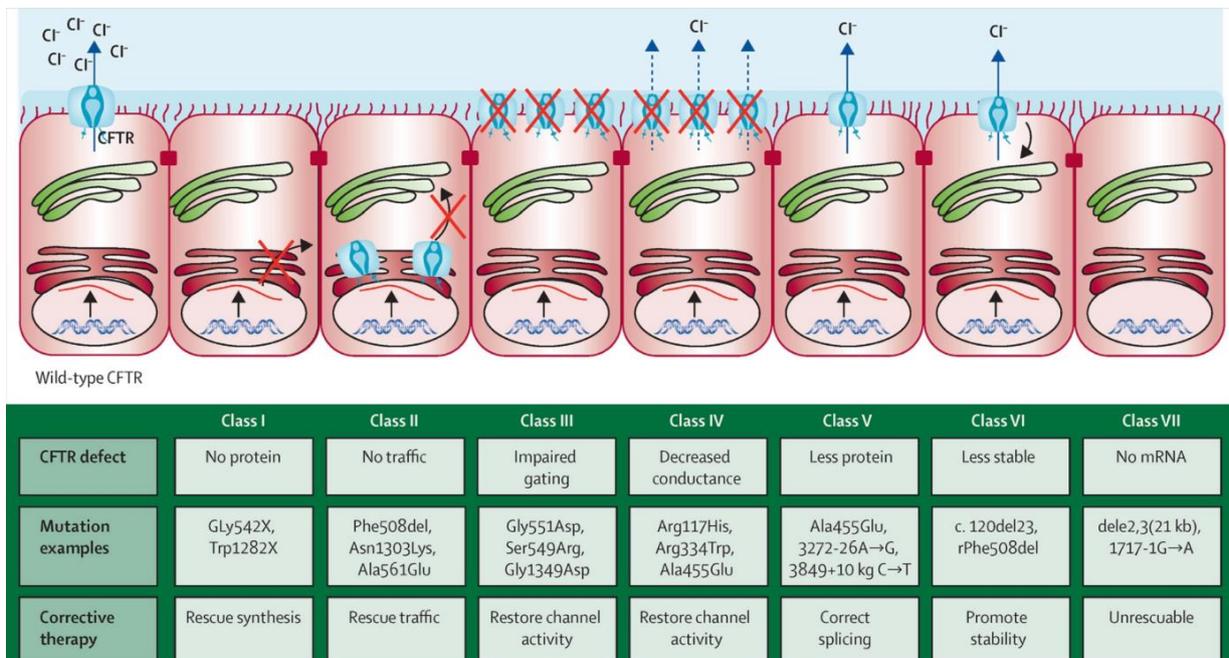


Figure 1: Illustration des différents types de mutations affectant CFTR et des approches thérapeutiques associées (5)

Les mutations affectant CFTR sont classées en différents groupes selon l'impact qu'elles provoquent sur la synthèse, la régulation, le transport ou la stabilité de la protéine CFTR (Fig. 1). Cette classification a permis une nette optimisation de la recherche de nouvelles thérapies selon le type d'effet recherché (6).

Les mutations de classe 1 conduisent à l'absence partielle ou totale d'expression de la protéine CFTR. Il s'agit principalement de mutations non-sens, de délétions ou d'insertions créant un décalage du cadre de lecture de l'ARN messager (ARNm), entraînant une terminaison prématurée des codons et une absence de la protéine au pôle apical des cellules épithéliales (7). Les mutations de classe 2 entraînent un mauvais repliement de la protéine, impactant le trafic intracellulaire de la protéine CFTR vers le pôle apical de la cellule en raison de modifications post-traductionnelles inappropriées (7), ce qui va majoritairement entraîner une dégradation de CFTR par le protéasome. Parmi ces mutations, on retrouve la mutation F508del qui est le variant le plus souvent retrouvé chez les patients avec une prévalence de 80% en Europe (8).

Les mutations de classe 3 conduisent à une régulation défectueuse de l'ouverture du canal malgré sa présence au pôle apical. Il s'agit principalement de mutations faux-sens ciblant les domaines Nucleotide Binding Fold (NBF), permettant de lier l'ATP. Ensuite, les mutations de classe 4 concernent des mutations faux-sens affectant la partie transmembranaire du canal, et par conséquent diminuant la conductance du canal. Le canal permet cependant une faible sortie d'ions à l'ouverture du canal (7).

Les mutations de classe 5 concernent principalement des mutations de sites d'épissage alternatif, affectant la transcription d'une protéine CFTR fonctionnelle, et diminuant la quantité de protéine exprimée au niveau de la membrane (9). Ensuite, la classe 6 concerne les mutations

affectant la stabilité de la protéine CFTR, qui est donc prématurément recyclée et dégradée par les lysosomes. Enfin, la classe 7 a été créée à partir du domaine des modulateurs CFTR, pour lesquels la pharmacothérapie reste encore difficile à contrôler. Il comprend de grandes délétions et mutations dans le cadre de lecture conduisant à une absence d'ARNm et donc d'expression de la protéine CFTR (7).

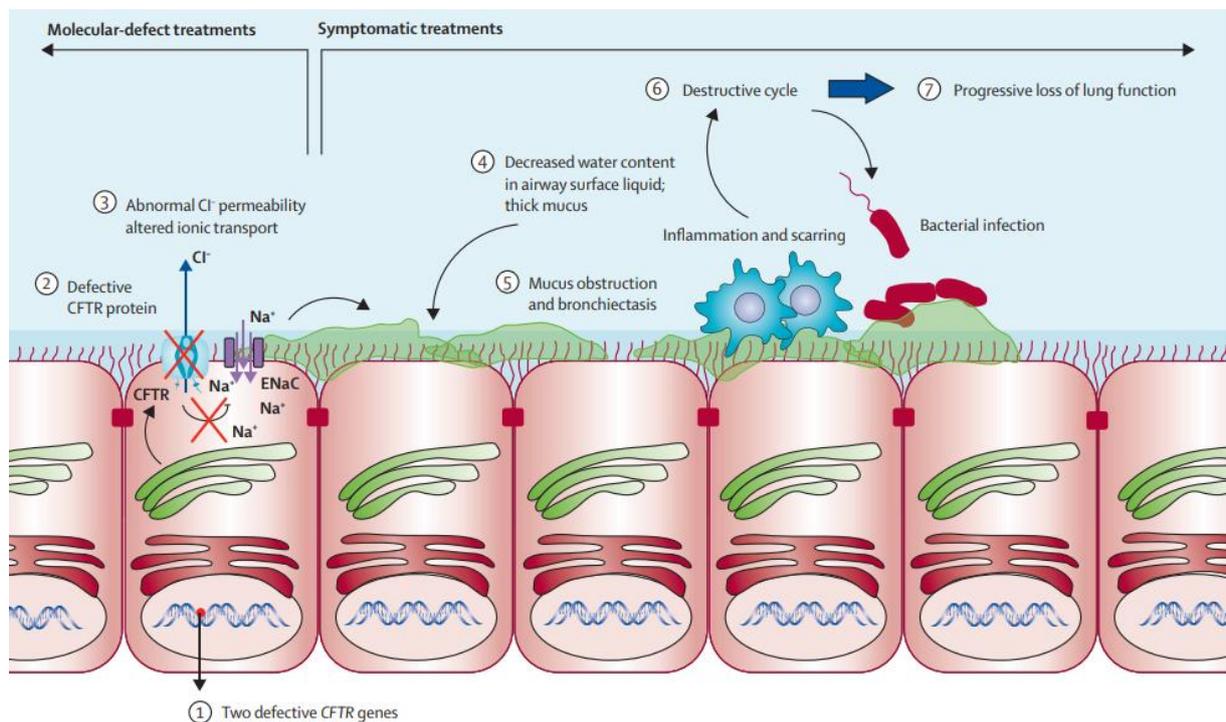


Figure 2: Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau pulmonaire.

La mucoviscidose est causée par une mutation du gène CFTR, qui entraîne une cascade de conséquences pouvant progressivement entraîner une insuffisance respiratoire sévère. Des traitements de la mucoviscidose ont été développés pour cibler chaque paramètre de cette cascade, mais l'arrivée des modulateurs de la mucoviscidose au cours de la dernière décennie nous permet de commencer à traiter la mucoviscidose plus près de son origine (10).

A travers ce dysfonctionnement précédemment expliqué, plusieurs mécanismes, non indépendants, ont été suggérés pour le développement de la maladie pulmonaire de la

mucoviscidose (Fig. 2). Le dysfonctionnement du CFTR entraînerait l'incapacité de sécréter des ions chlorure et bicarbonate dans la lumière des voies respiratoires, ou du moins en quantités efficaces, qui compensent normalement la réabsorption du sodium via le canal sodique épithélial Na^+ (ENaC) (11). Cette réabsorption du sodium sans excrétion des anions chlorure et bicarbonate provoque également une réabsorption d'eau par les cellules épithéliales pulmonaires, entraînant une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes (ASL) (12).

L'ASL est pourtant un élément clé pour le bon fonctionnement du système respiratoire. Plus important encore, il permet l'hydratation du mucus submergeant la barrière mucociliaire qui est essentielle à la réponse immunitaire innée (13). Malheureusement, un mucus déshydraté nuit à sa propre élimination ciliaire ou par la toux, et favorise l'implantation et la colonisation par des pathogènes opportunistes (14), conduisant à une infection aiguë qui peut devenir chronique et représenter un critère de morbidité sévère (15). En parallèle, en réponse à cette agression, l'épithélium va subir une inflammation et une cicatrisation par fibrose, impliquant plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 (16) et l'IL-8 (17) entraînant une dégradation et des lésions pulmonaires pouvant progressivement entraîner une insuffisance respiratoire, la nécessité d'une greffe de poumon et éventuellement la mort (18).

Un autre phénomène pouvant se produire est l'altération du pH de l'ASL. L'altération de la fonction de CFTR entraîne une diminution de la sécrétion de bicarbonates dans la lumière pulmonaire, qui ont normalement un effet basique sur l'équilibre du pH, expliquant l'observation d'un pH de l'ASL plus acide que chez les personnes saines (19). Cette modification du pH de l'ASL peut entraîner plusieurs conséquences. En particulier, il a été démontré que cette diminution du pH diminuait l'activité des peptides antimicrobiens cationiques dans un

modèle porcin de mucoviscidose (20). Dans ce même modèle de mucoviscidose porcine, il a été montré qu'un pH plus acide pouvait entraîner une altération du détachement du mucus de l'épithélium pulmonaire, réduisant l'élimination mucociliaire du mucus (21). Ce phénomène a également été démontré chez la souris (22).

Bien que la mucoviscidose soit une maladie multiorganique complexe, la principale morbidité des patients atteints de mucoviscidose est une perte progressive de la fonction pulmonaire aggravée par l'infection (23), qui entraîne le décès prématuré de plus de 80 % des patients (24). Des épisodes inflammatoires répétés déclenchés par des antigènes bactériens entraînent progressivement des lésions pulmonaires. Bien que les antibiotiques puissent diminuer la fréquence et la durée des exacerbations infectieuses aiguës, la bactérie s'installe de façon permanente et n'est jamais complètement éradiquée des poumons (23).

B- *Pseudomonas aeruginosa*

1- Introduction

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est une bactérie Gram-négative présente de manière ubiquitaire dans le sol et les environnements aquatiques (25). C'est un agent pathogène opportuniste responsable d'un grand nombre d'infections pouvant être très délétères. Pa est principalement présent dans les infections des voies respiratoires, des voies urinaires, du tractus gastro-intestinal, de l'endocardite, des méninges, des yeux ou des oreilles, ainsi que dans les pneumonies associées à la ventilation et d'autres infections nosocomiales (26). C'est un pathogène qui appartient au groupe des pathogènes ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*

spp), regroupant des pathogènes qui présentent une virulence et une multirésistance très importantes (27).

Affectant les 3 quarts des patients atteints de mucoviscidose, Pa est le principal agent pathogène responsable des infections, suivi de *Staphylococcus aureus*, ce qui explique l'amplification des recherches sur cet agent ces dernières décennies (28). Le séquençage a maintenant permis de comprendre le comportement d'une multitude de souches de Pa et de démontrer l'adaptabilité et la polyvalence de ce pathogène, qui sont à l'origine de sa virulence (29). Enfin, ce pathogène est connu pour être résistant à de nombreux antibiotiques, dont les bêta-lactamines, les quinolones et les aminoglycosides (30). Ces mécanismes de résistance peuvent être intrinsèques, illustrés par l'expression de pompes à efflux permettant l'expulsion des antibiotiques du cytoplasme, ou encore par l'expression d'enzymes capables de les inactiver. Ils peuvent également être acquis, grâce à la capacité de réaliser des transferts horizontaux de gènes impliqués dans la résistance ou en réalisant des mutations (31). Enfin, la résistance adaptative implique notamment la capacité à former un biofilm dans les poumons qui va servir de barrière physique de diffusion et limiter la pénétration de l'antibiotique dans le réseau bactérien (32). Ces éléments, associés à la présence éventuelle de bactéries persistantes multirésistantes aux traitements et pouvant également former un biofilm, fait de Pa un agent pathogène capable d'infecter le patient de manière chronique et récurrente (33).

2- Facteurs de virulence sécrétés

Pa possède une grande quantité de facteurs de virulence qui permettent à la bactérie une infection de longue durée et favorisent la chronicité de l'infection (34). Son taux élevé de pathogénicité est notamment lié à son génome très polyvalent, qui lui permet d'adapter son

comportement aux circonstances de son environnement, et par conséquent de réguler la production de ces facteurs de virulence (35).

2.1- Pyocyanine

Parmi les facteurs de virulence sécrétés, l'un des plus caractéristiques est la pyocyanine (PYO). C'est un pigment bleu et composé redox-actif qui fait partie de la famille des phénazines, composés azotés hétérocycliques sécrétés par plusieurs bactéries dont *Pseudomonas* (36). La PYO est produite à partir d'acide chorismique, qui peut être obtenu par plusieurs voies (24) (Fig. 3).

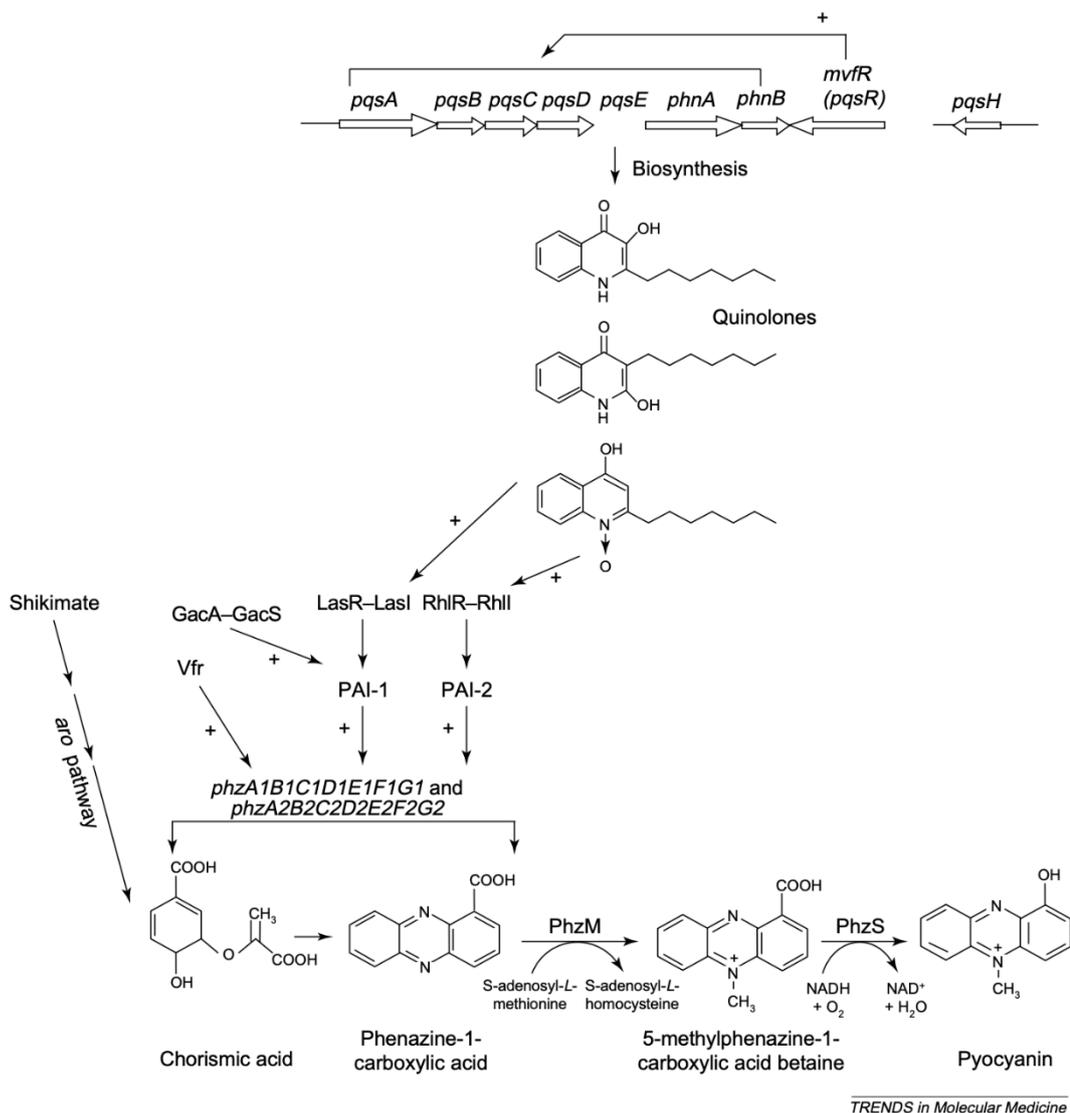


Figure 3: Illustration de la synthèse de pyocyanine via la voie de l'acide chorismique (24)

PYO est synthétisée à partir de l'acide chorismique, qui est un intermédiaire biochimique très important chez les micro-organismes, et peut être lui-même obtenu à partir de différentes voies de biosynthèse, la principale étant la voie du shikimate.

La PYO va entraîner une augmentation du stress oxydatif en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), connues pour favoriser les lésions pulmonaires et les phénomènes inflammatoires (37).

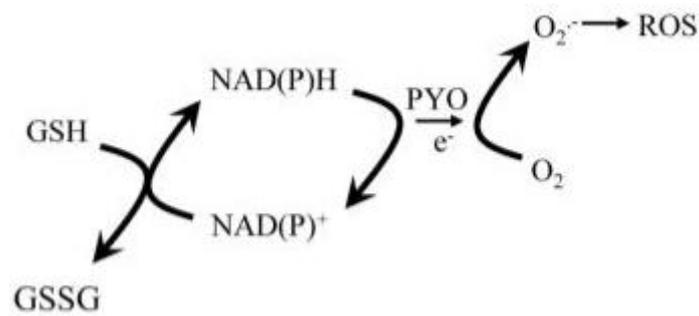


Figure 4 : Mécanismes redox de production de ROS à partir de PYO (34).

PYO est responsable de l'oxydation du NAD(P)H réduit et transfère les électrons obtenus à l'oxygène (O₂), créant des ions superoxydes qui peuvent se lier à d'autres molécules dans le cytoplasme et créer des ROS (GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé).

Ainsi, lors de la réaction avec le NADH ou le NADPH, le produit principal de cette réaction est l'ion superoxyde (O₂⁻), qui se dismute naturellement en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Fig. 4) (34). Il a également été démontré que le PYO est capable d'inhiber l'activité de la catalase, une enzyme antioxydante qui catalyse la dégradation de H₂O₂ en oxygène et en eau (38).

On pense également que PYO provoque une inhibition de l'inhibiteur de l'alpha1-protéinase, dont le rôle physiologique est d'inhiber l'élastase des neutrophiles (NE), ce qui peut alors intensifier les dommages tissulaires induits par cette dernière (39). Il a également été montré que PYO pouvait diminuer la fréquence des battements ciliaires de l'épithélium pulmonaire et par conséquent réduire l'élimination ciliaire de Pa (40).

Enfin, il a été montré que PYO pouvait provoquer une hypersécrétion de mucines par les cellules épithéliales exposées (41). Ces mucines sont des macromolécules glycosylées normalement présentes dans le mucus des voies respiratoires responsables de la défense mucociliaire contre les bactéries et les toxines inhalées (42). Il a été démontré que PYO augmente l'expression de 5 gènes de mucine : MUC20, MUC13, MUC5B, MUC2 et MUC5AC

(41), les trois derniers étant les mucines les plus sécrétées par le système respiratoire humain (43). Cette hypersécrétion, en revanche, n'est plus bénéfique pour le patient puisqu'elle ralentit et rend plus difficile l'élimination efficace du mucus, entraîne une obstruction des voies respiratoires et facilite l'agglomération des bactéries (44).

2.2- Exoenzymes

Les infections à Pa sont responsables d'importantes lésions tissulaires, notamment par la sécrétion d'exoenzymes, dont une protéase alcaline et deux élastases, A (LasA) et B (LasB) (45).

Parmi l'arsenal de molécules sécrétées par Pa, on retrouve également la protéase IV (PIV), une sérine-protéase connue pour dégrader C3, C1q et IgG, impliquée dans la réponse immunitaire, ainsi que le fibrinogène, ce dernier étant impliqué dans la coagulation (46). De plus, PIV a également pour effet de dégrader l'interleukine-22 (IL-22), une cytokine essentielle à la régulation de la défense immunitaire muqueuse et qui limite l'implantation et la prolifération des bactéries (47). En effet, l'IL-22 se lie à un récepteur qui active la voie de signalisation STAT3, conduisant à l'expression de gènes qui codent pour des molécules régénératives et mitogènes (48), mais aussi des peptides antimicrobiens tels que la bêta-défensine 2, la psoriasine (S100A7), la calgranuline C (S100A12) ou encore lipocaline 2 (49)(50).

Enfin, les travaux récents de Guillon et al. ont montré qu'aucune antiprotéase présente dans l'environnement pulmonaire ne semblait inhiber l'activité du PIV, ce qui ferait du PIV un facteur de virulence permettant à Pa d'échapper au système de défense de l'hôte (47).

3- Biofilm

Le biofilm illustre la capacité des micro-organismes à former un agrégat en adhérant les uns aux autres et en se développant sur une surface préexistante, sur laquelle ils vont produire une matrice chargée en substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces EPS peuvent être des protéines, des exopolysaccharides, des métabolites ou encore de l'ADN extracellulaire (eDNA) (51).

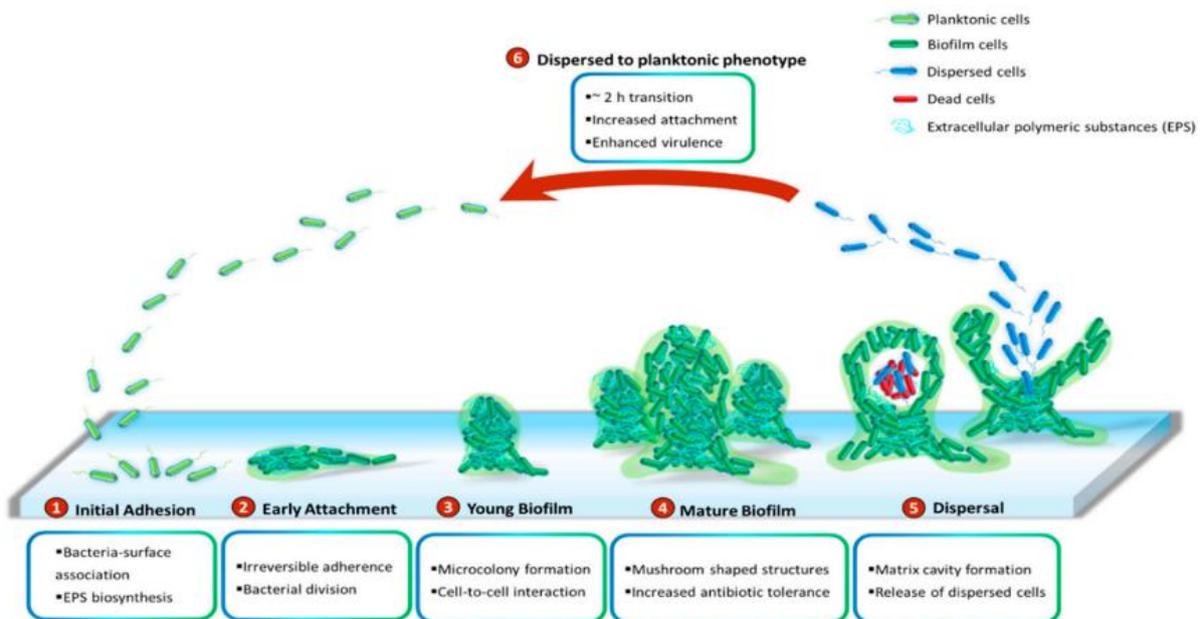


Figure 5 : Étapes du développement du biofilm de Pa (52)

Le développement du biofilm de Pa se déroule en 6 étapes. Après une première période d'attachement à la surface, les bactéries vont se diviser pour former une microcolonie et favoriser les interactions cellule à cellule pour optimiser la robustesse de leur structure. En arrivant à maturité, la structure développe des mécanismes et une morphologie lui permettant d'augmenter sa tolérance aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte. Enfin, la dernière étape consiste à transférer les cellules dispersées dans le milieu afin qu'elles puissent elles-mêmes recréer une microcolonie pouvant former un biofilm.

La formation du biofilm s'organise en plusieurs étapes (Fig. 5). La première consiste en l'adhésion des bactéries au support ou matrice grâce à leurs appendices, tels que leur flagelle ou pili de type IV (53). De plus, le mouvement flagellaire restreint est impliqué dans l'établissement de la motilité de contraction, une forme de motilité associée à la surface (54) et la biosynthèse des exopolysaccharides essentiels à l'association de surface (55). Cette adhérence est à ce stade réversible. C'est lors de la phase 2 que l'adhésion se renforce et devient irréversible, les bactéries amplifient en parallèle le nombre de divisions. Ensuite, la phase 3 consiste en la formation d'une architecture plus structurée, avec l'augmentation des interactions cellule à cellule. On parle de microcolonie (ou jeune biofilm) (52). En phase 4, ces microcolonies se développent en trois dimensions et forment une structure en forme de champignon, caractéristique de la maturation du biofilm. En phase 5, le centre de la structure formera une cavité matricielle par autolyse cellulaire, ce qui permettra la libération des cellules dispersées (56). Enfin, en phase 6 les cellules dispersées transitent pendant environ 2 heures pour passer à un mode de croissance planctonique qui va permettre la colonisation d'autres espaces et ainsi perpétuer le cycle de formation du biofilm (57).

Il a été montré que les microorganismes se développant dans les biofilms étaient moins sensibles à la fois aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte que les bactéries se développant en suspension (58), même pour des souches ne présentant pas ou peu de résistance intrinsèque (59).

Ceci s'explique par la présence de différents états de croissance bactérienne au sein du biofilm. Les bactéries situées à la périphérie étant plus exposées à l'oxygène et aux nutriments présentent un profil d'expression génique élevé, et les bactéries situées à proximité de la surface de formation du biofilm, en son cœur, sont dans un état de croissance dormant (60). Ces dernières

sont appelées cellules persistantes, et montrent une meilleure tolérance à l'exposition aux antibiotiques et la capacité de repousser après exposition aux antibiotiques, ce qui contribue à l'installation de la chronicité de l'infection (61).

Ce phénomène semble réversible, et il s'avère que les bactéries perdant la protection du biofilm redeviennent plus sensibles aux antibiotiques, suggérant que cette capacité n'est liée à aucune génétique et est bien d'origine adaptative (62).

4- Quorum sensing

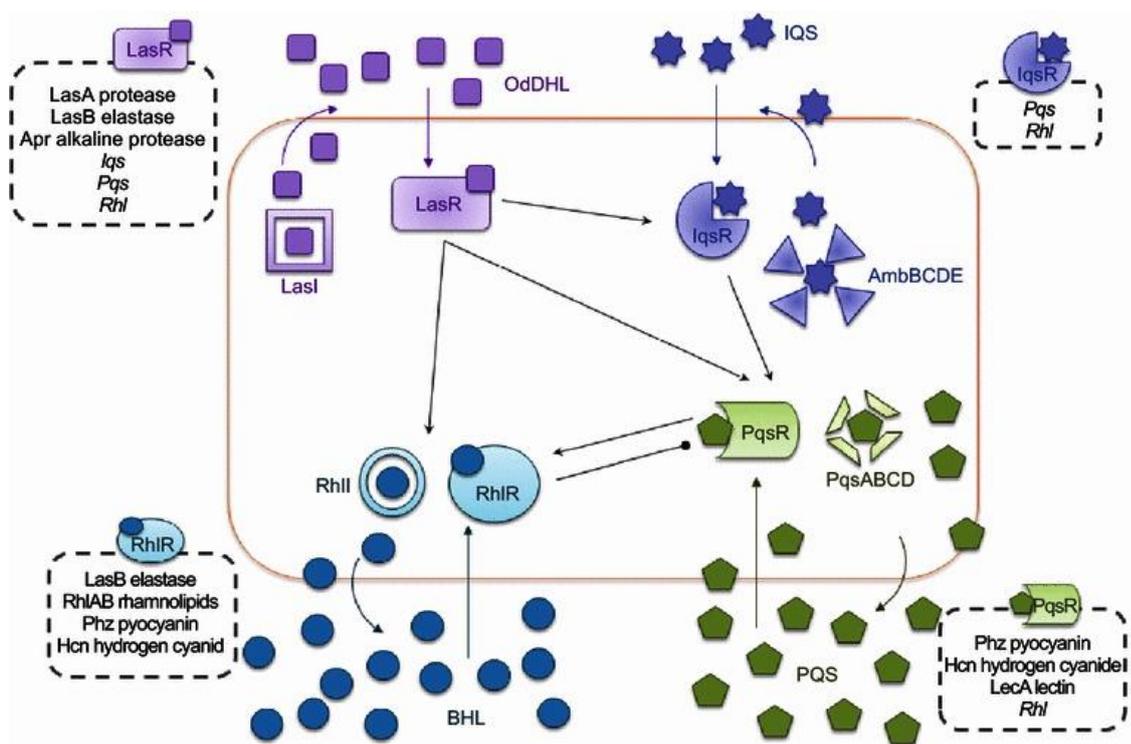


Figure 6: Illustration du quorum sensing chez Pa et des 4 différents systèmes et signaux impliqués : OdDHL, IQS, BHL et PQS (63)

La détection de quorum, ou quorum sensing (QS) est un mécanisme de communication entre bactéries qui leur permet d'interagir et de modifier l'expression de certains de leurs gènes en réponse à des variations de densité bactérienne et de la composition des espèces microbiennes dans l'environnement (64). Parmi ces gènes, on retrouve des gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence ou la formation de biofilm (Fig. 6) (65).

Le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* est un mécanisme complexe impliquant divers systèmes. Il implique de nombreux régulateurs, qui sont des groupes de gènes qui peuvent être régulés par la même molécule (66). Le système LasI/LasR est au sommet de la hiérarchie de ces voies, et permet, par son activation par sa propre molécule OdDHL (N-oxododécanyl-L-homosérine lactone) la formation d'un complexe LasR-OdDHL se liant sur les promoteurs de gènes cibles (67) et activant la transcription d'éléments également impliqués dans la virulence et le QS, notamment en activant le système RhI (68) (Fig. 6). Ce dernier est le deuxième système QS prédominant et produit un signal N-butyryl-L-homosérine lactone (BHL), capable d'interagir avec RhIR. Ces deux systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR sont des régulateurs de la transcription qui régulent l'expression d'environ 10 % du génome de Pa (correspondant à environ 300 gènes) (69), ce qui explique l'intérêt de leur étude en recherche pour comprendre la virulence et l'adaptabilité de Pa.

Un troisième élément impliqué dans le QS de Pa est le *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), correspondant à la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone. Il s'avère que c'est un système également régulé par LasR-OdDHL (70), qui conduit à la transcription de pqsABCD, lui-même à l'origine de la formation de PQS, qui va alors se lier à PqsR et sera impliqué dans la production de facteurs de virulence comme le PYO, l'élastase ou encore les rhamnolipides. C'est aussi un système qui est régulé à la baisse par le système RhII/RhIR (71).

Enfin, un quatrième signal a été récemment découvert et s'est avéré capable d'intégrer des signaux de stress environnemental dans le réseau QS (72). Il s'agit du système QS intégré (IQS), dont la molécule signal est le 2-(2-hydroxyphényl)-thiazole-4-carbaldéhyde. Il est impliqué dans la stimulation de la production de signaux PQS et par conséquent de BHL, ainsi que dans l'expression de facteurs de virulence tels que PYO, l'élastase et les rhamnolipides (63). Les structures moléculaires de ces quatre signaux sont présentées dans la figure 7.

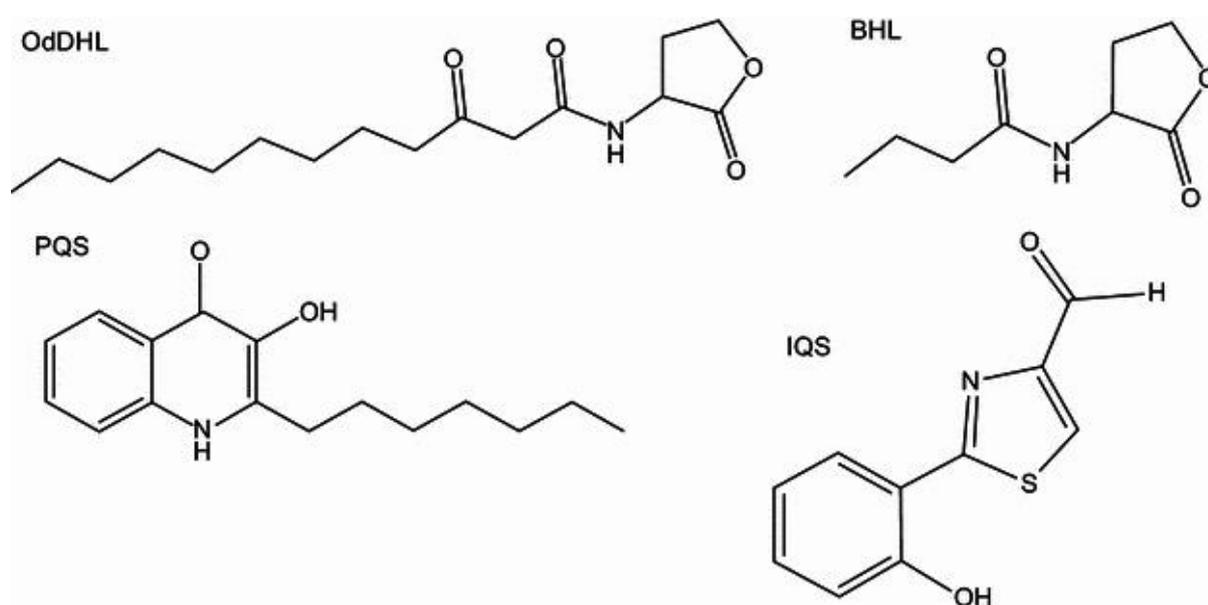


Figure 7: Structures moléculaires des signaux impliqués dans la détection du QS de Pa

N-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (OdDHL), N-butyryl-L-homoserine lactone (BHL), 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS ; *Pseudomonas* Quinolone Signal) et 2-(2-hydroxyphényl)-thiazole-4-carbaldéhyde (IQS ; Integrated Quorum Sensing Signal) (63)

C- Prise en charge thérapeutique de la mucoviscidose

1- Traitements actuels

1.1- Traitements des symptômes et des conséquences associées

La prise en charge de la mucoviscidose dépend, dans une certaine mesure, de chaque patient. En effet, la prise en charge symptomatique des complications associées représente une part importante du schéma thérapeutique (Fig. 8), la mucoviscidose étant une maladie chronique pour laquelle aucun traitement curatif n'est encore disponible. L'élément critique à gérer est la potentielle infection pulmonaire, qui se fait par la prise d'antibiotiques pouvant être administrés par différentes voies (orale, inhalée ou intraveineuse), comme l'azithromycine, la ciprofloxacine ou la tobramycine, cette dernière ayant montré de réels bénéfices sur l'infection chronique à Pa (73).

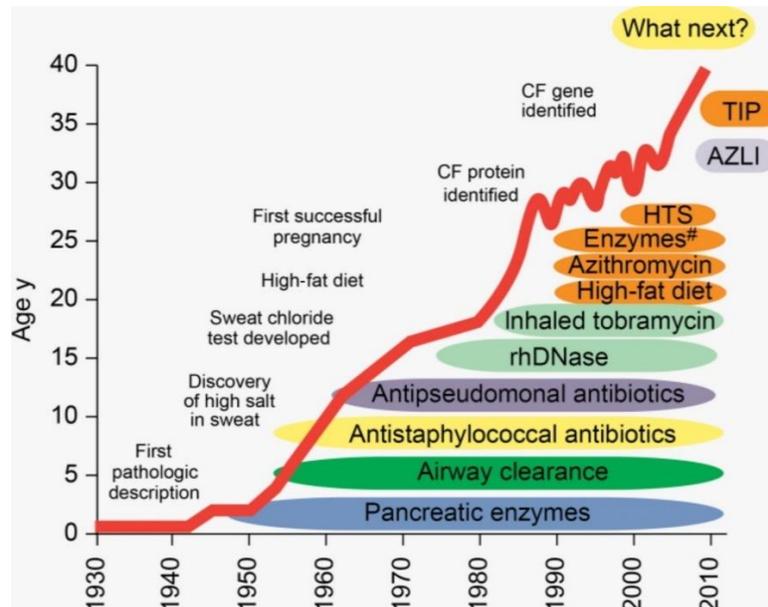


Figure 8: Chronologie de l'évolution des traitements symptomatiques de la mucoviscidose depuis sa première description pathologique et leur relation avec l'espérance de vie

(rhDNase : désoxyribonucléase humaine recombinante ; HTS : solution saline hypertonique inhalée ; AZLI : solution d'aztréonam pour inhalation, TIP : poudre pour inhalation de tobramycine) (5)

Bien que l'inflammation soit une caractéristique de la mucoviscidose, peu d'anti-inflammatoires efficaces sont utilisés de façon routinière. Ils sont généralement administrés sous forme d'anti-inflammatoires non stéroïdiens inhalés, de corticostéroïdes inhalés ou de corticostéroïdes systémiques spécialement pour les patients atteints d'une maladie fongique allergique (74). De plus, l'azithromycine peut également être utilisée pour son effet anti-inflammatoire et son effet inhibiteur sur les furines, des sérine-protéases qui aggravent l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose (75,76).

Enfin, il est également possible de réduire la viscosité de l'ASL par l'administration pulmonaire de dornase alfa, une désoxyribonucléase humaine recombinante (rhDNase) responsable de la dégradation de l'eDNA et contribuant fortement à l'amincissement du mucus (77), des solutions salines hypertoniques ou de l'agent osmotique mannitol (78).

1.2- Approche pharmacologique du dysfonctionnement du CFTR

La seule approche qui vise à tenter de rectifier la fonction CFTR est l'utilisation de modulateurs CFTR, des médicaments voués soit à augmenter l'activité du CFTR situé en surface (potentiateurs), soit à corriger son emplacement dans la cellule (correcteurs). Le premier développé a été l'Ivacaftor (Kalydeco®), particulièrement utile pour les défauts de gating de classe III comme la mutation G551D (79), et permet d'augmenter le temps d'ouverture du canal CFTR, puis de restaurer partiellement les flux ioniques et améliorer la qualité de vie, la masse corporelle ainsi que certains paramètres respiratoires, comme le VEMS (volume expiratoire maximal par seconde). Même si cette mutation ne concerne qu'une minorité de patients, l'Ivacaftor a l'avantage de pouvoir être prescrit chez le très jeune enfant (> 4 mois) (80).

Un second est le Lumacaftor, qui a cette fois un spectre d'action sur la mutation F508del, retrouvée chez plus de 70% des patients atteints de mucoviscidose en Europe (6). Il restaure le transport de CFTR vers le pôle apical de la cellule mais sans restaurer significativement sa fonction (81). D'autre part, son association avec l'Ivacaftor (Orkambi®) a permis de restaurer non seulement le transport du canal vers la membrane mais également sa fonction, en augmentant le temps d'ouverture du canal, permettant d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients (82).

Fin 2018, une association entre un autre modulateur, le Tezacaftor, et l'Ivacaftor a été commercialisée (Symkevi®), permettant de concurrencer l'Orkambi® et de réduire certains effets indésirables respiratoires (83).

Ce dernier a ouvert la voie à une nouvelle combinaison appelée Kaftrio®, associant le Tezacaftor et l'Ivacaftor ainsi qu'un nouveau composé, l'Elexacaftor (VX-455). Il a été approuvé par l'agence médicale européenne (EMA) fin 2020 et s'annonce très prometteur, avec déjà une amélioration de la stabilité et du transport du CFTR atteignant au mieux jusqu'à 60 à 70% de son fonctionnement physiologique chez des personnes non atteintes mucoviscidose (84).

2- Perspectives de traitement futures

L'avenir de la thérapie est vaste. Une première approche consisterait à trouver des modulateurs capables de corriger un panel plus large de mutations, et qui puissent être administrés à des patients très jeunes pour limiter le risque de développement de complications et de facteurs aggravants au cours du temps.

La plupart des essais cliniques en cours portent principalement sur des composés ou des stratégies antimicrobiennes, dans le but de redonner de meilleures conditions de vie au patient mais aussi d'améliorer l'absorption des médicaments administrés par inhalation, qui représente aujourd'hui un véritable fléau (85). Le tableau ci-dessous résume certaines stratégies actuellement en phases d'études cliniques (Tableau 1).

Study	Official Title	Treatment	Galenic form	Phase
IGNITE	Assessment of the efficacy of IV gallium (Ga) to improve pulmonary function as measured by a 5% or greater relative improvement in forced expiratory volume in one second (FEV1) from baseline to Day 28.	Drug : Ga nitrate Placebo : 0.9% NaCl	IV	II
AP-PA02	A Phase 1b/2a, Multi-Center, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Single and Multiple Ascending Dose Study to Evaluate the Safety and Tolerability of AP-PA02 Multi-Phase Therapeutic Candidate for Inhalation in Subjects With Cystic Fibrosis and Chronic Pulmonary Pseudomonas Aeruginosa (Pa) Infection	Drug : AP-PA02 Placebo : inactive isotonic solution	Inhalation	I/II
BX004-A	A Phase 1b/2a, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Evaluate Nebulized Bacteriophage Treatment in Outpatient Adult Cystic Fibrosis (CF) Subjects With Chronic Pseudomonas Aeruginosa (PsA) Pulmonary Infection	Drug : PX004-A Placebo : vehicle buffer	Inhalation	I/II
SPI-1005	A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety and Efficacy of SPI-1005 in Cystic Fibrosis (CF) Patients With Acute Pulmonary Exacerbation (APE) Receiving IV Tobramycin at Risk for Ototoxicity	Drug : SPI-1005 Ebselen 200, 400 or 600 mg Placebo	Oral	II
AR-501 (Panaecin™)	A Phase 1/2a Randomized, Double-Blind, Two-Part, Dose-Ascending, Multicenter Study of the Safety and PK of AR-501 (Gallium Citrate), Administered Via Inhalation, in Healthy Adult and P. Aeruginosa Infected Cystic Fibrosis Subjects.	Drug : AR-501 Placebo	Inhalation	I/II
ALX-009	Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Study of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics After Single Ascending Doses or Multiple Ascending Doses of OSCN-, bLF or ALX-009 in Healthy Male and CF and Non-CF Bronchiectasis Patients	Drug : OSCN-, bLF or ALX-009 (combination of both) Placebo : 0.9% NaCl	Inhalation	I
SNSP113	A Multiple-Site, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose (SAD) Study to Assess the Safety and Tolerability of Inhaled SNSP113 in Healthy Male Subjects (Part A) and Subjects With Stable Cystic Fibrosis (Part B)	Drug : SNSP113 Placebo	Inhalation	I
LungFit™ GO	A Pilot Study to Assess the Effect of Intermittent Inhaled Nitric Oxide on the Treatment of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Lung Infection in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients	Device : LungFit™	Inhalation	II
Galicaftor/Navocafator/ ABBV-119	A Phase 2 Study of Galicaftor/Navocafator/ABBV-119 Combination Therapy in Subjects With Cystic Fibrosis Who Are Homozygous or Heterozygous for the F508del Mutation	Drug : Galicaftor/Navocafator/ABBV-119 Placebo	Oral	II
BC-3781 (Lefamulin)	A Phase 1, Open-Label, Randomized, Crossover Study to Assess the Safety and Pharmacokinetics Following Single Doses of Oral and Intravenous Xenleta (Lefamulin) in Adult Patients With Cystic Fibrosis	Drug : Lefamulin	Oral / IV	I
AIR001	Phase I/II Study of Inhaled Sodium Nitrite as an Antimicrobial for Pseudomonas Infection in Cystic Fibrosis	Drug : Sodium nitrite (46 or 80 mg)	Inhalation	I/II

Tableau 1: Liste de thérapies en cours d'essais cliniques pour la mucoviscidose

Liste non exhaustive d'essais cliniques actifs ciblant différentes approches, des modulateurs aux antimicrobiens, utilisant différentes voies d'administration, mettant en évidence la complexité du traitement de la mucoviscidose (IV : intraveineuse, OSCN- : Hypothiocyanite, bLF : lactoferrine bovine). Tableau obtenu à partir de mon mémoire de Master, dont les références sont mentionnées plus haut. Données obtenues à partir de Clinicaltrials.gov

D- Lien avec le projet réalisé

1- Contexte

Le projet qui a été mené durant ces 6 mois est le fruit d'une collaboration entre notre laboratoire et Neem Biotech Ltd., une société spécialisée dans la recherche d'agents antimicrobiens et qui a passé plusieurs années à étudier les caractéristiques bactériennes qui conduisent à la résistance et leur virulence.

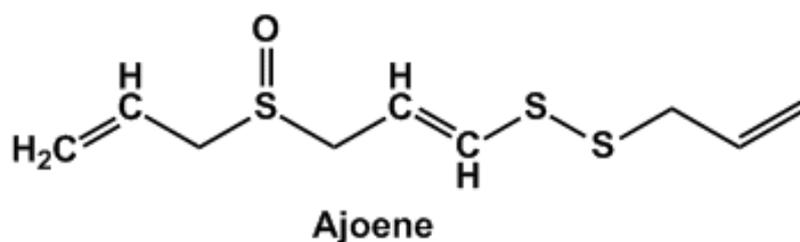


Figure 9 : Formule chimique de l'Ajoène (stéréoisomère E) (86)

Après s'être concentrés sur l'Ajoène (Fig. 9), un composé organo-soufré dérivé de l'ail dont il a été démontré qu'il réprimait certains facteurs de virulence clés régulés par QS chez Pa, cela à partir de l'inhibition d'un petit ARN régulateur (87), ils ont développé 3 composés pour lesquels nous avons dû évaluer l'efficacité sur des souches cliniques de Pa issues de patients infectés atteints de mucoviscidose. Ces composés sont les NBA134, NBA140 et NBA2456. Comme ils ont été développés récemment et uniquement testés sur des souches de laboratoire, nous n'avons que très peu d'informations à leur sujet.

2- Hypothèse et objectifs

La pertinence de ce projet était en effet de tester ces composés sur des souches cliniques, ce qui permettrait de traduire les données obtenues sur des souches de laboratoires à une échelle plus

clinique, et ainsi avoir une meilleure représentativité de ce qui se pourrait se passer cliniquement chez les patients atteints de mucoviscidose.

Pour chacun d'entre eux, et en fonction des résultats préliminaires obtenus après avoir testé leurs composés sur des souches de laboratoire, il a été proposé de tester leur activité sur la capacité à éradiquer un biofilm préexistant en association avec des antibiotiques, ainsi que la capacité à moduler le QS pour NBA134, empêcher la formation de biofilm pour NBA140 ainsi que la capacité d'influencer la production de facteurs de virulence pour NBA2456. L'objectif principal étant de valider le statut potentiel de candidat-médicaments pour ces composés dans le ciblage de la virulence de Pa. Un objectif recherché est la potentialisation de l'activité des antibiotiques, permettant de réduire les doses administrées en clinique et de limiter l'apparition de la résistance bactérienne.

III- Matériel et Méthodes

Milieux de culture

La poudre de Mueller Hinton Broth (MHB) (70192) a été dissoute dans de l'eau à une concentration de 21 g/L et a été obtenue chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

La poudre Oxoid Tryptone Soy Broth (TSB) (CM0129) a été dissoute dans de l'eau à une concentration de 30 g/L et a été obtenue auprès de Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Réactifs, solvants, tampons et composés :

Le tris-HCl (BP153-500) et l'éthanol absolu (20821.330) ont été achetés chez Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA). Le NaOH (S5881), HCl 37 % (258148), chloroforme (34854-M), DMSO (D8418), cristal violet 1 % (V5265), pyocyanine (P0046) et l'acétate de N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide (T6140) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Les trois composés d'intérêt, NBA134, NBA140 et NBA2456 ont été obtenus sur demande directement auprès de Neem en fonction du besoin, du fait de leur faible disponibilité.

Bactéries

Les souches ont été obtenues à partir du référentiel du Strategic Research Centre (SRC) for Pseudomonas, financé par la CF Trust et résidant au NHLI (National Heart and Lung Institute). Des isolats ont été fournis par le laboratoire de microbiologie du Royal Brompton Hospital à partir de cultures de sécrétions respiratoires une fois tous les tests cliniques effectués. Les isolats bactériens cliniques ont ensuite été inoculés dans des cryotubes (Prolab Diagnostics, Microbank™) et conservés à -80°C.

Strain	Acute/Chronic	Colistin sensitivity
GA-065	Chronic	Sensitive
GA-072	Acute	Sensitive
GA-294	Chronic	Sensitive
GA-422	Chronic	Resistant
GA-461	Acute	Sensitive
GA-490	Acute	Sensitive
GA-550	Acute	Sensitive
GA-750	Acute	Sensitive
GA-899	Acute	Sensitive
GA-982	Chronic	Sensitive

Tableau 2: Caractéristiques du premier lot de souches utilisées dans nos travaux

(Tableau issu du mémoire de Master mentionné plus haut)

Un autre lot de souches a été inclus dans nos dosages, contenant les souches : 1, 2, 3, 7, 8, 11, 13, 14, 17, 19, 20, 22, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 38, 39, 41, 43, 53, 54, 60, 63, 64, 66, 68, pour lesquels nous n'avons pas de données équivalentes sur la chronicité de l'infection et la sensibilité à la colistine.

Croissance nocturne

Avant chaque expérience, les souches ont été incubées à 37°C sur un agitateur tournant à 200 rotations par minute (rpm) dans des tubes contenant 5 mL de Muller Hinton Broth (MHB) ou Tryptone Soy Broth (TSB) pendant 16 à 20 heures. Ils ont ensuite été centrifugés à 3900 tours/min à température ambiante (21°C), le milieu de culture a été retiré et du milieu frais a été ajouté. La densité optique à 600 nm (OD600) a ensuite été mesurée pour évaluer la densité bactérienne, une OD de 0,05 correspondant à 5×10^7 unités formant colonie (CFU)/mL.

Profil de croissance bactérienne

Les souches ont été cultivées pendant la nuit dans du MHB en suivant la méthode de croissance nocturne mentionnée ci-dessus, puis des échantillons de 200 µL de solution bactérienne dans du MHB ont été disposés dans une plaque à 96 puits non traitée à une densité de 5×10^7 CFU/mL, et la OD600 a été mesurée toutes les 30 minutes pendant 18 heures. Chaque condition a été réalisée en 6 réplicats techniques et 2 réplicats biologiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes des OD600 dans le temps, accompagnées de leur erreur standard de la moyenne (SEM) correspondante.

Formation de biofilm

Les souches ont été cultivées pendant la nuit dans du MHB en suivant la méthode de croissance nocturne mentionnée ci-dessus, puis des échantillons de 100 µL de solution bactérienne dans du MHB ont été disposés dans une plaque à 96 puits non traitée, à une densité de 5×10^7 CFU/mL. Après 24 heures, la croissance planctonique (bactéries en suspension) a été éliminée en faisant basculer énergiquement la plaque dans un récipient, puis les puits ont été rincés 3 fois à l'eau et laissés à sécher. Une fois secs, les puits ont été colorés avec 125 µL (de manière à recouvrir tout le biofilm formé à la surface des 100 µL) de Crystal Violet 0,1% pendant 15 minutes sur un agitateur numérique à 30 rpm. Les puits ont ensuite été rincés 3 fois à l'eau et laissés sécher 2 à 4 heures sous hotte. Enfin, le biofilm coloré a été solubilisé dans 200 µL d'éthanol absolu à 99 % pendant 30 minutes, et la OD550 a été mesurée. Chaque condition a été réalisée en 6 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes d'OD550, accompagnées de leur erreur standard de la moyenne correspondante.

Inhibition de biofilm

Les souches ont été cultivées pendant la nuit suivant la méthode de croissance nocturne mentionnée ci-dessus dans du Tryptone Soy Broth (TSB), un milieu plus riche en nutriments que le MHB afin d'optimiser la croissance et éventuellement la production de biofilm. Ensuite, 100 μL de solution bactérienne dans du TSB ont été disposés dans une plaque à 96 puits non traitée, à une densité de 5×10^7 CFU/mL en présence de 0, 12.5, 25, 50, 75 ou 100 μM de NBA140 correspondant à 0,33 % de DMSO par condition. Après 24 heures, la croissance planctonique a été éliminée en faisant basculer énergiquement la plaque dans un récipient et les échantillons ont été traités comme mentionné pour le test de formation de biofilm. Chaque condition a été réalisée en 3 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques. Les données d'inhibition relative du biofilm sont présentées par un ratio de moyennes d'OD550 normalisées à la condition non traitée, accompagnées de leur erreur standard de la moyenne correspondante.

Eradication de biofilm

Suivant le même principe que le test de formation de biofilm, 100 μL de solution bactérienne dans du TSB ont été disposés dans une plaque à 96 puits non traitée, à une densité de 5×10^7 CFU/mL sans traitement. Après 24 heures, la croissance planctonique a été éliminée en retournant énergiquement la plaque sous la hotte dans un récipient vide (pour éviter les éclaboussures et une contamination croisée), puis la plaque a été laissée à sécher. Par la suite, les conditions ont été traitées pendant 24 heures avec 125 μL de TSB contenant 0, 34.125, 68.25, 136.5, 273, 546 ou 767.92 μM de NBA140 seul ou en association avec 42.5 ou 64.5 $\mu\text{g/mL}$ de Colistine (CLS), un antibiotique de la classe des polymyxines, correspondant à 2,56 % de DMSO par condition. Après traitement, les puits ont été rincés et traités comme mentionné dans le test de formation de biofilm. Chaque condition a été réalisée en 3 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques. Les données d'éradication relative du biofilm sont présentées par un

ratio de moyennes d'OD550 normalisées à la condition non traitée, accompagnées de leur erreur standard de la moyenne correspondante.

Mesure de la production de PYO

Les souches ont été cultivées pendant une nuit dans du TSB en suivant la méthode de croissance nocturne ci-dessus. Puis elles ont été incubées dans 1,2 mL de TSB à une densité de 5×10^7 CFUF/mL à 37°C pendant 16 heures sur un agitateur tournant à 200 rpm. Chaque tube a ensuite été centrifugé à 3900 rpm pendant 10 minutes à température ambiante (21°C), et 1 mL de surnageant stérile a été récupéré puis transféré dans un Eppendorf de 2 ml. Ensuite, 600 µL de Chloroforme ont été ajoutés pour créer un mélange biphasique dans lequel la pyocyanine sera diluée dans la phase organique chloroforme, située en dessous. La phase aqueuse supérieure a ensuite été retirée à l'aide d'une pipette et 200 µL de HCl 0,2 M ont été ajoutés pour transférer la pyocyanine dans la phase aqueuse supérieure après passage au vortex. Enfin, 100 µL de la phase aqueuse ont été transférés dans une plaque à 96 puits non traitée avec des tissus et la OD a été mesurée à 386 nm. Le tracé d'une courbe standard sur une fenêtre de 0 à 160 µg/mL de PYO a permis de calculer la concentration massique de PYO correspondante. Chaque condition a été réalisée en 3 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes de OD386 accompagnées de leur erreur standard de la moyenne correspondante.

Inhibition de production de PYO

Suivant le même principe que le test de production de pyocyanine, les souches ont cette fois été incubées dans 1,2 mL de TSB à une densité de 5×10^7 UFC/mL à 37°C pendant 16 heures sur un agitateur tournant à 200 rpm en présence de 0, 12,5, 25, 50, 75 ou 100 µM de NBA2456, correspondant à 0,33 % de DMSO. Après traitement, les tubes ont été centrifugés et le

surnageant a été traité comme mentionné pour le test de production de pyocyanine. Chaque condition a été réalisée en 3 répétitions techniques et 3 répétitions biologiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes accompagnées de leur erreur-type de moyenne correspondante.

Protease IV activity assay

Suivant le même principe que le test d'inhibition de la pyocyanine, les souches ont été incubées dans 1,2 mL de TSB à une densité de 5×10^7 CFU/mL à 37°C pendant 16 heures sur un agitateur tournant à 200 rpm, en présence de 0, 12.5, 25, 50, 75 ou 100 μ M de NBA2456, correspondant à 0,33 % de DMSO. Après traitement, les tubes ont été centrifugés à 3900 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante (21°C), et 10 μ L de surnageant stérile ont été collectés et transférés dans une plaque à 96 puits non traitée. Par la suite, nous avons préparé une solution de substrat de 0,233 μ M de sel d'acétate de N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide dans une solution tampon Tris HCl à pH 8. Ensuite, 90 μ L de cette solution de substrat ont été ajoutés aux 10 μ L de surnageant. Les plaques ont ensuite été incubées à 30°C dans le lecteur de plaques en utilisant une agitation constante type « mean corner well » tournant à 200 tr/min, et l'OD à 405 nm de chaque puits a été mesurée toutes les 2 minutes pendant 30 minutes. Une augmentation de l'absorbance traduit une augmentation de la dégradation du substrat et permet de se rapprocher de l'activité protéase IV des souches Pa. Chaque condition a été réalisée en 3 réplicats techniques et 3 réplicats biologiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes de OD405 au cours du temps.

Statistiques

Les données ont été analysées à l'aide de GraphPad Prism 9 (CA, USA). Le test de normalité de Shapiro-Wilk a été effectué sur tous les ensembles de données pour déterminer si la

distribution des données était paramétrique ou non paramétrique. Étant donné que les valeurs de certaines souches n'étaient pas distribuées de manière paramétrique, les tests de significativité statistique ont été réalisés à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Pour le test d'éradication du biofilm, une analyse ANOVA à deux facteurs a été utilisée, suivie du test de comparaison multiple de Tukey. L'hypothèse nulle a été rejetée à $p < 0,05$.

IV- Résultats

A- Caractéristiques des souches étudiées

1- Profil de croissance bactérienne

Pour commencer notre travail, nous avons voulu comprendre les schémas de croissance des souches étudiées. La durée de traitement par les composés préconisés par le Neem étant de 16 heures pour un mode de croissance planctonique, la connaissance de l'état de croissance de nos souches nous permet de vérifier la cohérence d'un traitement dans cet intervalle de temps.

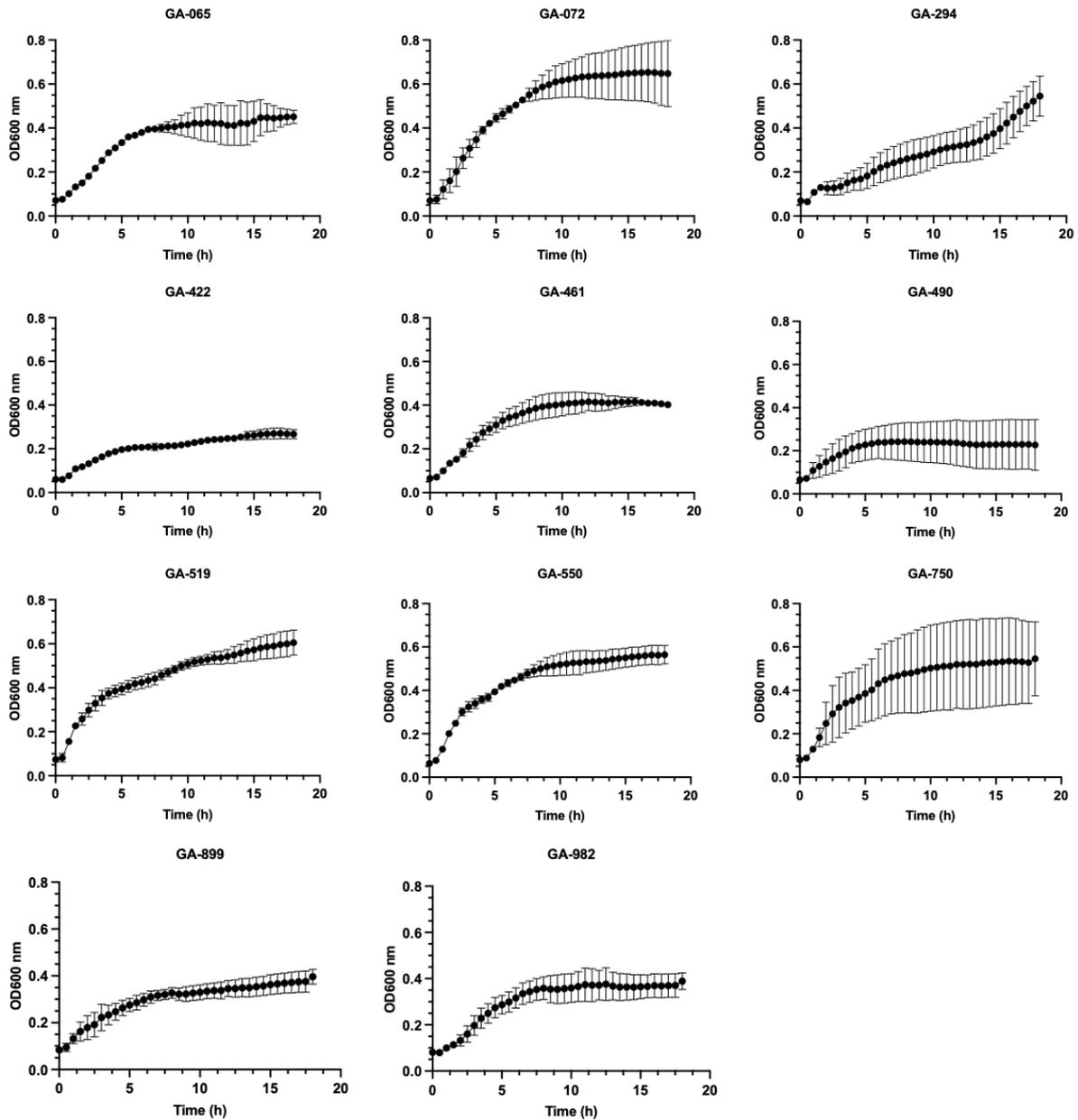


Figure 10: Courbes de croissance bactérienne pour les différentes souches étudiées

Les profils de croissance des différentes souches étudiées attestent de la variabilité de croissance entre les différentes souches mais aussi entre les différents réplicats biologiques (n=2). La OD600 a été mesurée toutes les 30 minutes pendant 18 heures, les valeurs sont tracées en tant que moyennes de chaque point de temps \pm SEM.

Les données de croissance bactérienne (Fig. 10) n'ont été obtenues qu'à titre indicatif pour prédire le comportement des souches dans le milieu d'étude, ici le MHB. On observe pour

chaque souche un profil comparable à ceux obtenus dans la littérature, avec une phase de croissance exponentielle sur les 5 à 10 premières heures, avant d'arriver à une phase stationnaire où la densité bactérienne semble être maximale, sauf pour GA-294 dont la densité semble encore augmenter. On peut alors observer une grande variabilité entre la croissance des différentes souches étudiées, avec par exemple une OD600 de $0,651 \pm 0,139$ pour GA-072 après 16 heures (correspondant approximativement à $6,51 \times 10^8$ CFU/mL) et une OD600 de $0,268 \pm 0,024$ pour le GA-422 après 16 heures (correspondant approximativement à $2,68 \times 10^8$ CFU/mL). De même, il s'avère qu'au sein d'une même souche on peut observer une certaine variabilité de croissance entre réplicats biologiques, comme le suggèrent les souches GA-490 et GA-750.

2- Formation de biofilm des souches cliniques étudiées

Par la suite, nous avons voulu sélectionner les souches qui présenteraient les caractéristiques recherchées pour chaque expérience. Nous avons commencé par évaluer la capacité de nos souches à former un biofilm en 24 heures.

Compte tenu de la variabilité des souches observées au préalable lors des tests de croissance ainsi que de leur phénotype observé sur gélose, nous avons décidé d'étendre le nombre de souches étudiées pour maximiser les chances d'avoir des souches qui produisent une quantité intéressante de biofilm et être plus susceptibles d'observer une modification de cette production après traitement. On remarque dans un premier temps une grande variabilité de la capacité de production de biofilm entre les différentes souches (Fig 11).

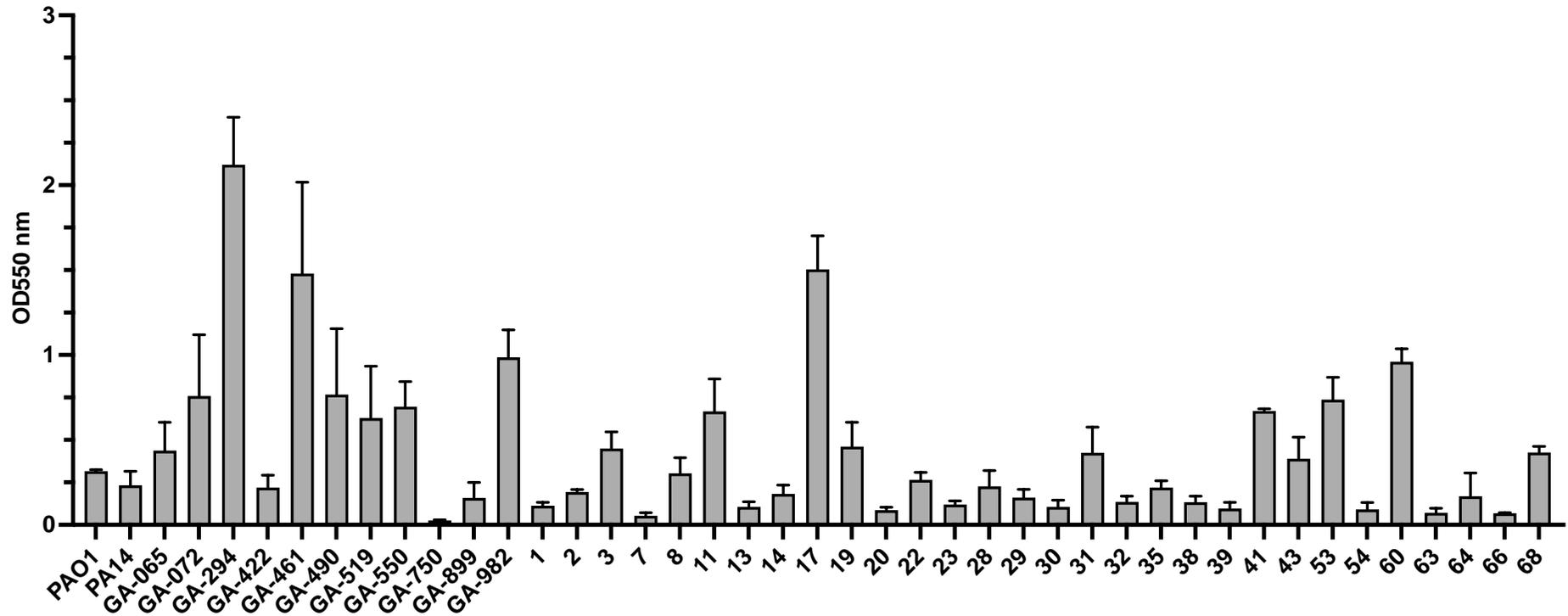


Figure 11: Évaluation de la formation du biofilm des souches d'intérêt

La capacité des différentes souches à former un biofilm a été évaluée par une coloration au cristal violet à 0,1 %. La OD550 a été mesurée après 24 heures de croissance et les valeurs correspondent à la moyenne des réplicats biologiques (n=3) ± SEM.

PAO1 est une souche de laboratoire de référence utilisée lors des études de biofilm et servira donc de référence pour attester de la capacité intéressante des souches cliniques à former un biofilm. Nous remarquons qu'un grand nombre de souches semblent produire très peu ou pas de biofilm, mais que certaines souches semblent produire une plus grande quantité de biofilm que PAO1 ($0,316 \pm 0,009$), comme la souche 11 ($0,668 \pm 0,191$), 17 ($1,504 \pm 0,197$) (Fig. 10), 60 ($0,961 \pm 0,075$) ou encore GA-294 ($2,120 \pm 0,280$).

À la suite de cette expérience, et après avoir considéré les données de croissance observées et les phénotypes observés en laboratoire, nous avons décidé de retenir la souche de laboratoire PAO1 comme référence pour nos prochains tests de biofilm, en raison de la qualité de sa documentation dans la littérature et sa meilleure capacité à former un biofilm sur une surface naïve (88). Nous avons également retenu les souches cliniques GA-072, GA-294, GA-982, 11, 17, 41, 53 et 60 comme étant les souches produisant une quantité de biofilm intéressante.

3- Production de Pyocyanine des souches cliniques étudiées

Suivant le même processus, nous avons ensuite tenté d'évaluer la production de PYO de nos souches, également dans le but de ne sélectionner que les souches qui pourraient présenter un intérêt pour l'étude des facteurs de virulence. Après 16 heures, la PYO produite a été extraite du milieu de culture.

Nous avons de nouveau observé de grandes différences entre les souches. Concernant les souches de laboratoire, nous observons que PA14 semble produire des concentrations élevées de PYO ($38,18 \pm 3,69 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 12) en comparaison à PAO1. On note que certaines souches

semblent se démarquer avec une concentration en pyocyanine très élevée dans le milieu de culture, notamment les souches 19 ($72,41 \pm 0,73 \mu\text{g/mL}$) et GA-294 ($73,10 \pm 0,612 \mu\text{g/mL}$).

Suite à ce dosage, et compte tenu du phénotype observé au laboratoire sur gélose, nous avons décidé de sélectionner les souches PA14 comme souche de laboratoire de référence, ainsi que les souches cliniques GA-065, GA-294, GA-982, 11, 17, 19, 20, 43, 53 et 66 pour les tests d'évaluation de la production des facteurs de virulence.

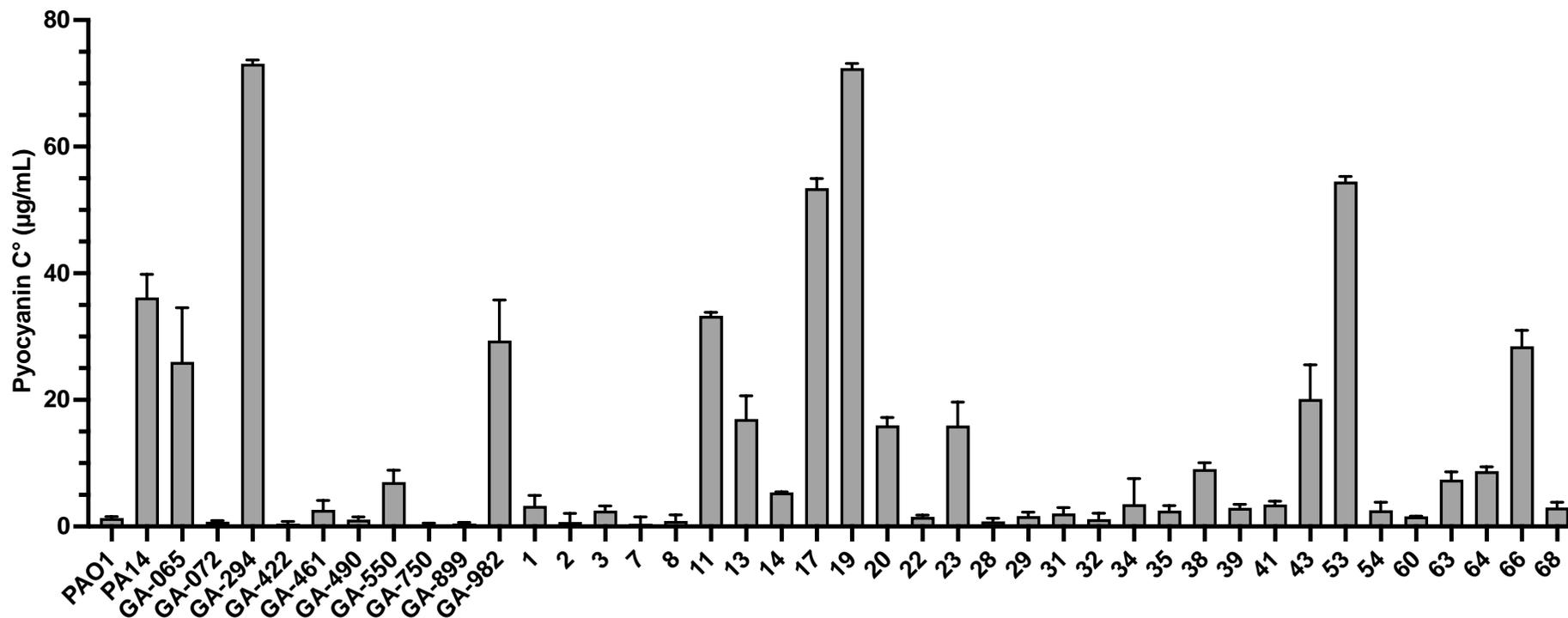


Figure 12: Production de pyocyanine des souches d'intérêt

La capacité des souches à synthétiser la PYO a été évaluée par extraction au chloroforme du milieu de culture (TSB). La OD550 a été mesurée après 24 heures de croissance et les valeurs correspondent à la moyenne des réplicats biologiques (n=3) ± SEM.

B- Activité du NBA140 sur le biofilm de Pa

1- Activité du NBA140 sur la formation de biofilm

Après avoir sélectionné les souches d'intérêt, l'étape suivante consistait à étudier NBA140 pour ses impacts sur la formation (prévention) ou l'éradication (traitement) des biofilms produits par nos souches. Pour commencer, nous nous sommes d'abord concentrés sur l'évaluation de l'impact de NBA140 sur la formation de biofilm. Étant donné que les souches présentes des capacités de formation de biofilm différentes, nous avons normalisé les valeurs par rapport à la condition non traitée (0 μ M) par souci de représentativité (Fig. 13).

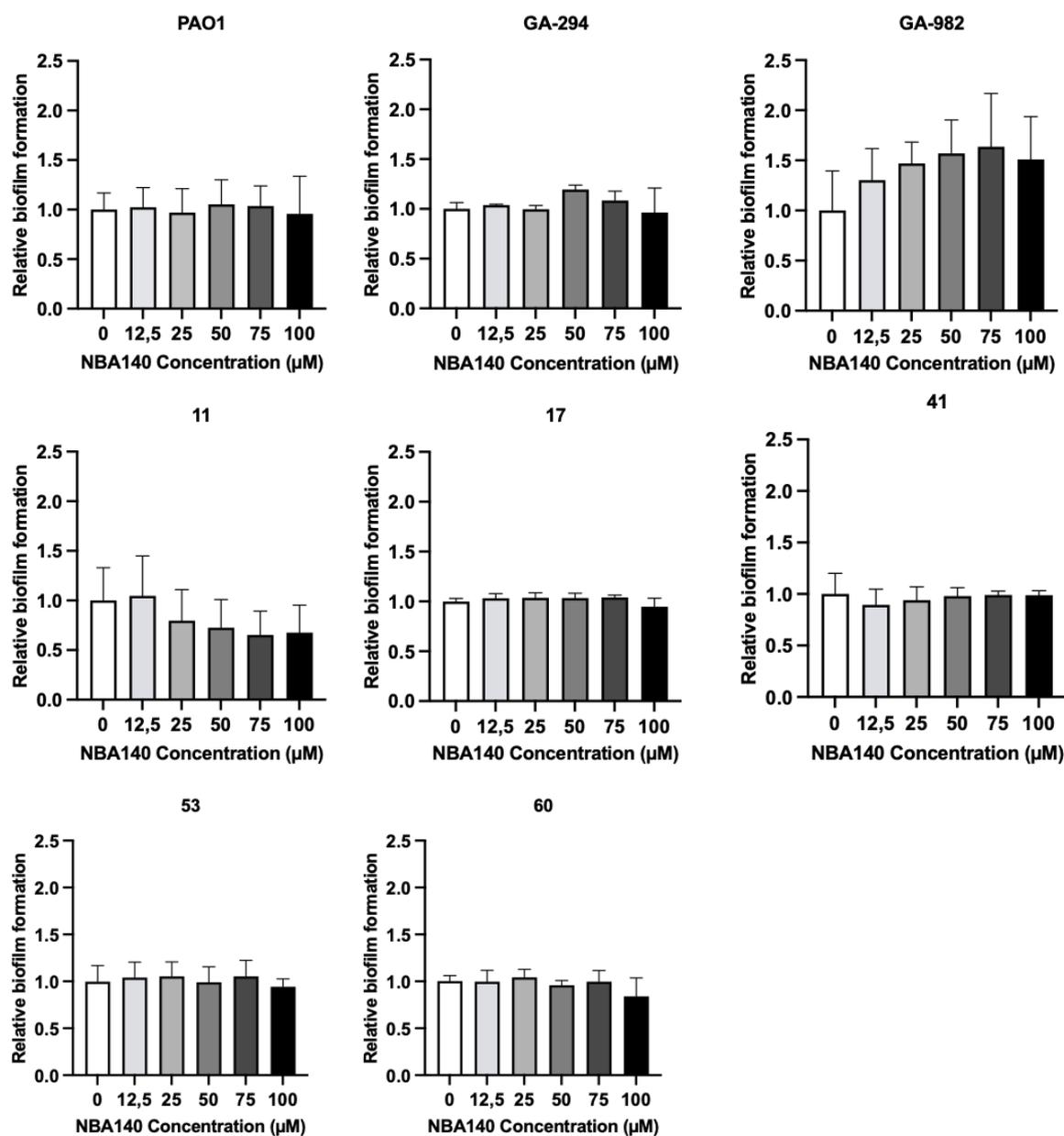


Figure 13: Formation de biofilm sous traitement avec NBA140

Les souches ont été traitées par des concentrations de NBA140 allant de 0 à 100 μM , et les résultats relatifs sont présentés sous forme de rapports des moyennes du biofilm formé par rapport à la condition non traitée (0 μM) ($n = 3$) \pm SEM. En raison d'irrégularités dans la croissance et le comportement de la souche GA-072, nous avons décidé de la retirer du lot de souches à tester pour ce test. Les données ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn car certaines souches n'ont pas montré de distribution normale. Aucune différence significative n'a été rencontrée.

On n'observe aucune tendance à un impact du composé sur la capacité des souches étudiées à former un biofilm et l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre les différentes concentrations de traitement. La seule souche pour laquelle on aurait pu noter une tendance visuelle apparente vers une diminution en présence de concentrations croissantes de composé était 11 ($0,797 \pm 0,312$ à $25 \mu\text{g/mL}$; $0,653 \pm 0,239$ à $75 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 13) mais elle n'est statistiquement pas significative.

2- Activité du NBA140 sur un biofilm préformé

Par la suite, nous avons administré du NBA140 pendant 24 heures sur un biofilm lui-même préformé pendant 24 heures, en association avec différentes concentrations de colistine (CLS). L'objectif était multiple, nous cherchions à comparer les différentes concentrations de traitement entre elles et étions également curieux de savoir si l'ajout de NBA140 pouvait améliorer l'efficacité de CLS. Cependant, nous n'observons à nouveau aucune différence significative entre ces différents paramètres.

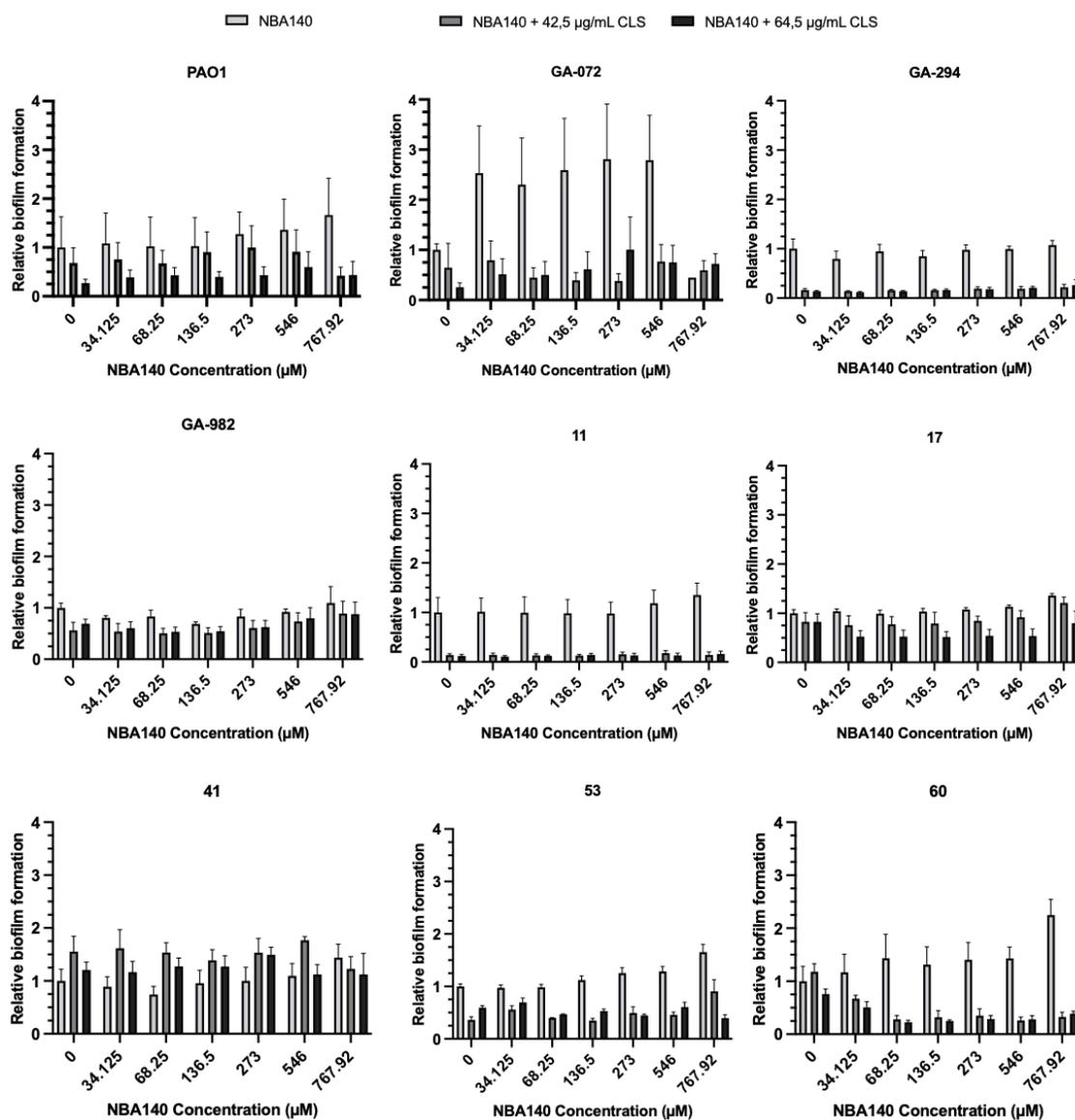


Figure 14: Test d'éradication du biofilm après traitement avec NBA140 et/ou colistine (CLS)

Après 24h de croissance, le surnageant contenant les bactéries planctoniques a été éliminé et le biofilm a été traité avec des concentrations de NBA140 allant de 0 à 767,92 µM, en combinaison avec 42,5 ou 64,5 µg/mL de colistine (CLS). Les résultats sont présentés sous forme de rapports des moyennes du biofilm formé par rapport à la condition non traitée (0 µM de NBA140) ($n = 3$) \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse ANOVA à deux facteurs, suivie du test de comparaison multiple de Tukey. L'impact de l'augmentation de la concentration de NBA140 a été comparé entre chacune des trois conditions antibiotiques (0, 42,5 et 64,5 µg/mL) et chaque condition a également été comparée à celle non traitée (NBA140 à 0 µM). Aucune différence significative n'a été trouvée.

En revanche, pour certaines souches, nous avons noté une tendance apparente à l'augmentation de la production de biofilm après traitement avec des concentrations élevées de NBA140 seul (Fig. 14). Cela semble être le cas pour PAO1 (jusqu'à $1,666 \pm 0,752$ à $767,92 \mu\text{M}$ NBA140), GA-072 ($2,791 \pm 0,892$ à $546 \mu\text{M}$ NBA140), 53 ($1,6533 \pm 0,148$ à $767,92 \mu\text{M}$ NBA140) et 60 ($2,250 \pm 0,294$ à $767,92 \mu\text{M}$ NBA140) mais sans être statistiquement significative.

De plus, il semble que la CLS seul soit capable de détruire le biofilm préexistant sans exposition au NBA140 pour les souches GA-294 ($0,162 \pm 0,028$ et $0,138 \pm 0,014$ à $42,5$ et $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS, respectivement) et 11 ($0,135 \pm 0,028$ et $0,120 \pm 0,031$ à $42,5$ et $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS, respectivement). De même, nous semblons observer une tendance à un effet dose-dépendant de CLS pour les souches PAO1, 17 et 60, confirmant la sensibilité des souches au CLS mais aussi sa capacité à pénétrer et dégrader le biofilm par elle-même.

Enfin, on note une tendance visuelle à un effet du NBA140 sur l'efficacité du CLS pour la souche 60. En effet, une diminution progressive de la formation de biofilm est observée pour les deux doses de CLS jusqu'à une concentration de NBA140 de $68,25 \mu\text{M}$, après quoi l'éradication du biofilm semble être également efficace, mais là encore l'analyse statistique n'a montré aucune significativité ($1,178 \pm 0,152$ et $0,759 \pm 0,094$ à respectivement $42,5$ et $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS sans NBA140 versus $0,328 \pm 0,074$ et $0,390 \pm 0,035$ à respectivement $42,5$ et $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS avec $68,25 \mu\text{M}$ NBA140).

Cette tendance apparente a été observée en PAO1 pour une concentration de NBA140 de $767,92 \mu\text{M}$, ce qui semble amener l'association avec $42,5$ ou $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS à un niveau d'efficacité comparable ($0,684 \pm 0,309$ et $0,270 \pm 0,078$ à $42,5$ et $42,5$ et $64,5 \mu\text{g/mL}$ de CLS

sans NBA140 versus $0,421 \pm 0,175$ et $0,437 \pm 0,277$ à 42,5 et 64,5 $\mu\text{g/mL}$ de CLS respectivement avec 767,92 μM de NBA140).

C- Activité du NBA2456 sur la production de facteurs de virulence

1- Activité du NBA2456 la production de Pyocyanine

Après avoir traité nos souches pendant 16 heures avec des concentrations de NBA2456 allant de 0 à 100 μM , nous avons extrait et quantifié le PYO du milieu de culture (Fig. 15).

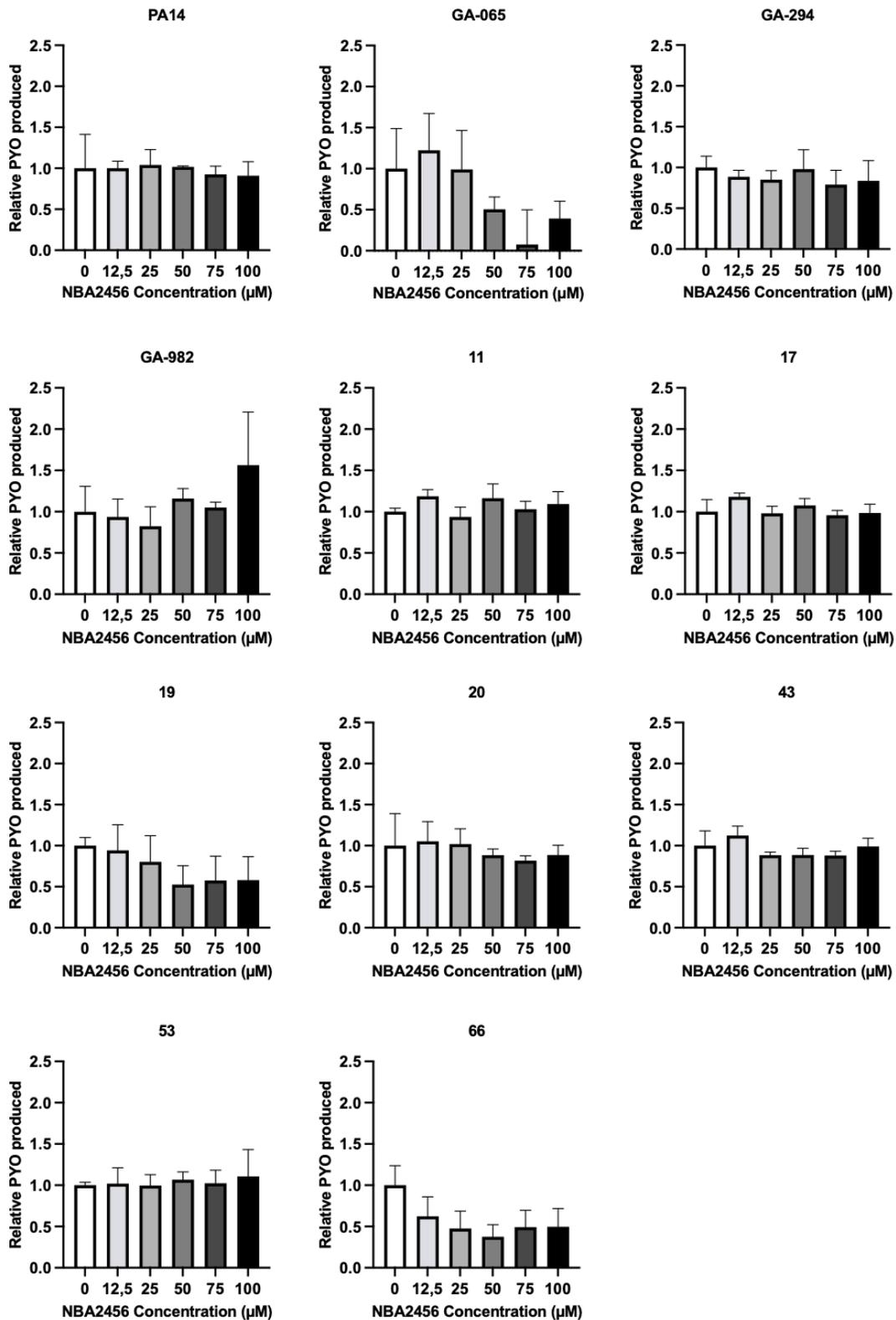


Figure 15: Production de pyocyanine après traitement avec NBA2456

Les souches ont été traitées pendant 16 heures à des concentrations de NBA2456 allant de 0 à 100 μM, et les résultats relatifs présentés sont les rapports des moyennes de la concentration de PYO produite

par rapport à la condition non traitée (0 μ M) (n = 3) \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn car certaines souches n'ont pas montré de distribution normale. Aucune signification statistique n'a été trouvée.

Ici encore, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les différentes concentrations testées pour chaque souche. Cependant, nous notons qu'une tendance à une réduction dose-dépendante de la production de PYO semble se manifester pour certaines souches, comme pour GA-065 (0,393 \pm 0,211 à 100 μ M), 19 (0,523 \pm 0,228 à 50 μ M) et 66 (0,377 \pm 0,145 à 50 μ M), ce qui nécessiterait d'autres répétitions pour confirmer.

2- Activité du NBA2456 sur l'activité de la protéase IV

Suivant les mêmes bases que pour le dosage de PYO, nous avons soumis les souches étudiées à un traitement au NBA2456, et exposé le milieu de culture à un substrat de la protéase IV, l'acétate de N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide, pour pouvoir approximer son niveau de présence dans l'environnement à travers son activité.

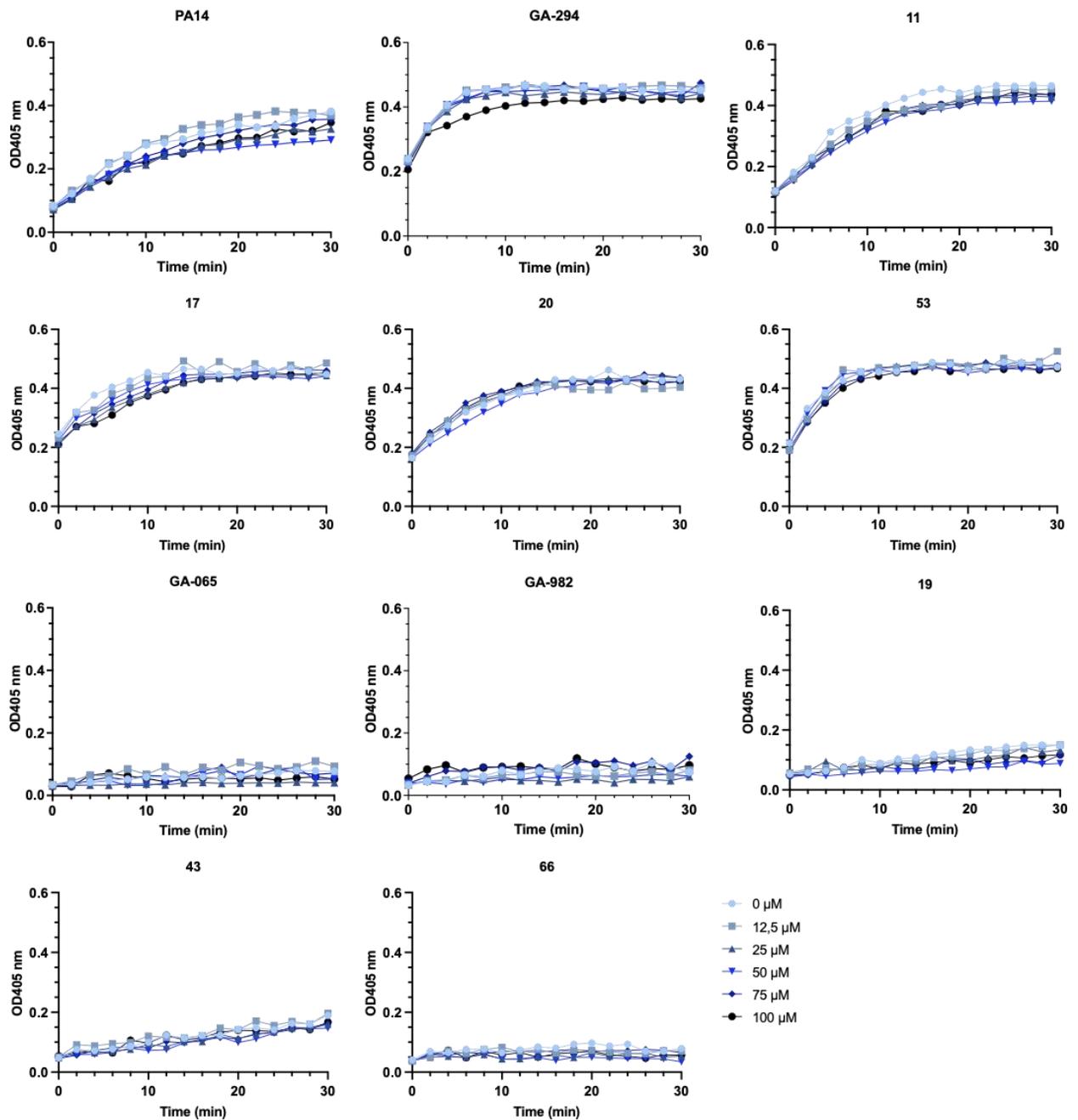


Figure 16: Activité de la protéase IV après traitement avec NBA2456

Les souches ont été traitées pendant 16 heures à des concentrations de NBA2456 allant de 0 à 100 μM , et l'activité de la protéase IV a été mesurée en exposant du milieu de culture au sel d'acétate de N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide pendant 30 minutes. Les résultats présentés sont des moyennes de chaque point de temps OD405 nm ($n=3$; $n=2$ pour PA14) \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse ANOVA à deux facteurs suivie du test post-hoc de comparaison multiple de Tukey. Aucune significativité statistique n'a été trouvée.

Nous n'avions aucune donnée préalable sur la production de protéase IV par les souches sélectionnées. On peut observer pour certaines souches une superposition de signaux « plats », suggérant que le substrat n'ait pas été dégradé et que ces souches produisent peu (ou pas) de protéase IV (Fig. 16). Ceci a été observé pour les souches GA-065, GA-982, 19, 43 et 66.

En revanche, on remarque que PA14 et les autres isolats cliniques partagent un profil d'activité enzymatique caractéristique avec une première phase exponentielle correspondant à la consommation de substrat et une phase de plateau correspondant à l'arrêt de la réaction enzymatique, attestant soit de la consommation totale de substrat ou de la déplétion enzymatique. Ensuite, on remarque que les valeurs maximales obtenues pour les souches ayant produit la protéase IV, PA14 ($0,461 \pm 0,057$), GA-294 ($0,468 \pm 0,027$), 11 ($0,467 \pm 0,011$), 17 ($0,468 \pm 0,022$), 20 ($0,462 \pm 0,017$), 53 ($0,489 \pm 0,025$) (Fig 16), semblent être dans la même fourchette, suggérant plutôt l'hypothèse d'une consommation totale de substrat.

De plus, l'analyse statistique n'a pas révélé de différence significative entre les différentes concentrations pour chaque point de temps, ce qui semble en accord avec la superposition des courbes observées et qui suggère que NBA2456 n'ait aucun effet sur la production de protéase IV.

V- Discussion

Ce projet portait sur la composante infectieuse de la mucoviscidose. Nous avons pu tester l'activité de deux agents sur une potentielle activité anti-virulente de *Pseudomonas aeruginosa*. Certaines des souches cliniques étudiées ici faisaient partie de différents projets de notre laboratoire depuis un certain temps et certaines données étaient disponibles sur la chronicité de l'infection ou la résistance aux antibiotiques. Cependant, nous n'avons pas cette information pour le deuxième lot de souches ajoutées après les tests de profil de croissance bactérienne (nommées souches 1-68). Connaître ce type de paramètre aurait pu permettre d'émettre plus de corrélations avec le comportement observé des souches et potentiellement améliorer la prévisibilité du comportement en fonction de la chronicité de l'infection.

La réalisation de ce projet tout en étant externe à Neem Biotech Ltd a créé quelques contraintes. Premièrement, pour des raisons de confidentialité, aucune information ne nous avait été communiquée sur le mécanisme d'action connu ou supposé de chaque composé. De même, nous ne connaissions pas les propriétés générales, la structure ou encore les caractéristiques physicochimiques de ces composés. Ces paramètres sont très importants en pharmacologie pour aider à optimiser les designs expérimentaux et connaître ces informations en amont aurait pu nous aider à mieux anticiper et prédire certains effets. De plus, chacun des composés n'était disponible qu'en très petite quantité et nous était livré par petites quantités (de l'ordre du milligramme) au besoin, ce qui nous obligeait à travailler sur des échantillons de très petite taille et limitait le nombre d'expériences réalisées. De plus, les résultats préliminaires qu'ils ont obtenus sur des souches de laboratoire ne nous ont pas été partagés, et aucun article n'a encore été publié concernant ces composés, ce qui aurait été très intéressant et aurait permis de vérifier la reproductibilité des expériences entre différents laboratoires et différentes souches de Pa.

Ceci est d'autant plus marquant que les souches de laboratoire avec lesquelles nous avons travaillé, PAO1 et PA14, n'ont montré aucune réponse significative aux composés testés alors que nous savons que PAO1 était l'une des souches qu'ils avaient testées dans leur laboratoire.

D'un point de vue expérimental, il a été compliqué d'obtenir une cohérence dans les différentes expériences tout au long du projet en raison de la grande variabilité des profils de croissance des souches comme mentionné précédemment. Ces différences de croissance impactent en conséquence la quantité de facteurs de virulence produits et disponibles dans le milieu, ce qui consomme du temps et conduit à la répétition des expériences un grand nombre de fois.

Parmi les facteurs de virulence étudiés, nous avons accordé une importance particulière à PYO, dont de plus en plus de mécanismes de virulence sont élucidés *in vivo* (89). Par ailleurs, les recherches s'accélèrent pour développer des méthodes de diagnostic précoce des infections de la sphère respiratoire, et PYO s'avère être l'un des marqueurs ciblés dans le diagnostic. S'agissant d'un métabolite spécifique de Pa, sa détection permettrait non seulement de diagnostiquer une infection à Pa mais aussi d'établir un critère de virulence de la souche infectant le patient (90).

Concernant l'évaluation de la production de PYO de nos souches cliniques, nous nous sommes appuyés sur un protocole fourni par Neem Biotech Ltd, qui semble être une méthodologie de référence pour la quantification du PYO produit, combinant une extraction au chloroforme suivie d'une analyse spectroscopique (91). Nous notons que les 3 souches sélectionnées pour ce test appartenant au premier lot d'isolats cliniques (GA-065, GA-294 et GA-982) sont toutes issues d'infections chroniques. Les souches d'infections aiguës de ce lot ne semblent pas produire de PYO ou très peu. Bien que la chronicité de l'infection à Pa soit souvent corrélée à

la formation de biofilm, et que la littérature ne documente pas de lien spécifique entre PYO et la chronicité de l'infection, il serait intéressant de connaître la chronicité de l'infection des souches issues du deuxième lot (1 à 68), afin de recouper ces observations et formuler des hypothèses quant à une éventuelle corrélation.

Bien que ce test n'ait pas révélé de différence significative dans la production de PYO après traitement avec NBA2456, nous avons observé graphiquement une tendance à une diminution dose-dépendante de la production de PYO pour les souches GA-065, 19 et 66. Compte tenu du faible nombre de réplicats biologiques ($n = 3$), il pourrait être intéressant de répéter cette expérience sur ces 3 souches pour confirmer cette tendance et approfondir le mécanisme d'action dans le cas où NBA2456 s'avérerait efficace sur celles-ci.

Comme mentionné précédemment, PYO peut être produite et activée via différentes voies, et après 16 heures de traitement, les souches sont dans une période de densité bactérienne maximale, ce qui augmente les chances d'interaction cellule à cellule par QS. Cependant, plusieurs signaux QS sont responsables d'une activation de la production de PYO, c'est le cas de PQS et BHL, qui s'autorégulent également entre eux. Nous supposons donc que voir une inhibition de la production de PYO impliquerait également une inhibition de ces deux signaux QS, ce qui ne semble pas être le cas. Suivant ce même raisonnement, il est possible que même si NBA2456 avait inhibé une voie de biosynthèse PYO, les souches Pa aient contourné cette inhibition en utilisant une autre voie de biosynthèse (63).

Suivant une méthodologie similaire à la quantification de PYO, nous avons mesuré l'activité du PIV produit après traitement avec NBA2456, en nous appuyant également sur un protocole fourni par Neem Biotech Ltd, consistant à exposer le surnageant de culture contenant le PIV à

un substrat (acétate de N-(p- Tosyl)-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide). Bien que la PIV seule soit encore très peu investiguée en recherche, les publications trouvées soutiennent également la méthode que nous avons utilisée (46).

Concernant l'activité de PIV, nous avons également pu observer que NBA2456 n'exerçait aucune modification significative de l'activité PIV sur la gamme de concentration testée (0 à 100 μ M), suggérant une activité PIV comparable entre chaque condition. Cependant, quelques commentaires doivent être émis concernant la configuration de l'expérience. En effet, bien que les cinétiques observées pour certaines souches suggèrent une activité de PIV, nous ne disposons pas de témoin positif permettant d'attester que l'activité observée est uniquement due à la présence de PIV ni même d'évaluer le niveau d'efficacité de PIV. Malheureusement, il n'y a actuellement aucune PIV synthétique disponible sur le marché, et la seule façon de l'obtenir est de la purifier nous-mêmes, comme décrit par Engel et al. Une autre suggestion serait de tester le PIV en présence d'un inhibiteur pour vérifier la spécificité de l'interaction enzyme-substrat. En revanche, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de PIV mais la N-p-tosyl-L-chlorométhyl cétone (90184, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) a été décrite comme permettant une perte totale d'activité du PIV et pourrait donc être intéressante (46). Enfin, pour approcher le comportement de PIV chez l'homme de manière plus représentative, il aurait probablement été plus pertinent de mesurer l'activité enzymatique à 37°C plutôt qu'à 30°C comme le suggèrent Caballero et al (92).

Enfin, il est probable que les conditions expérimentales n'aient pas permis de constater une inhibition. Si une inhibition n'est pas totale, elle peut être partielle, auquel cas on s'attendrait à une réduction de la production de PIV plus qu'à une inhibition complète. Comme mentionné lors de l'interprétation des résultats, le fait que l'activité maximale mesurée soit similaire pour

les souches ayant produit du PIV, nous estimons que tout le substrat a été consommé, suggérant que le milieu réactionnel contient encore une quantité d'enzyme qui n'a pas réagi. Il aurait été pertinent d'augmenter la quantité de substrat jusqu'à ce qu'il soit administré en excès pour être certain d'avoir consommé la totalité de PIV présente dans le milieu réactionnel et par conséquent tirer une conclusion plus représentative de la réalité (93).

Ces deux facteurs de virulence n'ont été mesurés qu'après traitement avec NBA2456 seul, et aucun effet significatif n'a été observé. Il semble que les protocoles mis en place n'aient pas permis de montrer une quelconque efficacité de ce composé pour réduire la production de ces facteurs de virulence pour des doses de 0 à 100 μM .

Dans une seconde partie du projet, nous avons pu constater que les isolats cliniques avaient tous des capacités différentes à former un biofilm. Pour mesurer la quantité de biofilm formé, nous avons utilisé la méthode de coloration au cristal violet, qui est une technique largement utilisée pour mesurer la formation de biofilm par les bactéries (94). Nous souhaitions initialement administrer NBA140 en prophylaxie lors de la culture de bactéries pour évaluer l'intérêt potentiel du composé dans la prévention de la formation de biofilm. Cependant, nous avons constaté que NBA140 n'inhibait pas la formation de biofilm sur la gamme de concentration testée (0 à 100 μM).

Par la suite, nous avons testé des concentrations plus élevées de NBA140 allant de 0 à 767,92 μM sur des biofilms préformés par nos souches cliniques, pour compenser au mieux les phénomènes de la tolérance liée au biofilm et augmenter les chances de pénétration du composé. Cette administration a été dans certains cas associée à celle de la colistine à forte concentration (pour les mêmes raisons), à 42,5 ou 64,5 $\mu\text{g/mL}$. L'idée n'était pas seulement de voir si le

NBA140 pouvait perturber le biofilm formé, mais aussi d'étudier un effet synergique potentiel du NBA140 et du CLS.

Parmi les souches du premier lot sélectionnées pour les dosages de biofilm, on retrouve les souches d'infections chroniques GA-294 et GA-982, ainsi que GA-072, issues d'une infection aiguë. Ces trois souches sont connues pour être sensibles à CLS à des concentrations inférieures à 4 µg/mL, et les résultats obtenus dans ce test traduisent une augmentation de la résistance aux antibiotiques des souches se développant dans un biofilm (59). En effet, si le biofilm de GA-294 semblait être inhibé par la présence de fortes concentrations de CLS, cette tendance est moins prononcée pour les souches GA-072 et GA-982, si on compare à la condition non traitée. Enfin, nous avons observé une tendance apparente de l'application de NBA140 à faible concentration à potentialiser l'effet du CLS dans la souche 60, mais sans significativité statistique. Il serait intéressant de répéter l'expérience afin d'augmenter la taille de l'échantillon et de vérifier cette tendance.

Le choix d'analyser l'impact de NBA140 sur un biofilm préformé par coloration au cristal violet a été fait afin d'être cohérent dans les méthodes expérimentales utilisées. Cependant, si cette méthode semble intéressante pour mesurer la formation de biofilm pendant une période donnée, le traitement du biofilm introduit certaines variabilités expérimentales. En effet, après la formation du biofilm, le milieu de culture contenant la pousse planctonique est retiré par retournement mais n'est pas rincé, afin de limiter les risques de contamination par d'autres pathogènes voire de contamination croisée entre puits. Un nombre variable de bactéries en croissance planctonique peut donc persister dans chaque condition et contribuer à la formation d'un nouveau biofilm.

Neem Biotech Ltd a suggéré d'utiliser une autre méthode pour étudier l'éradication du biofilm. En effet, des inoculateurs de biofilm MBEC (minimum biofilm eradication concentration) Assay® (Innovotech, Edmonton, AB, Canada) ont été développés et consistent en la combinaison d'une plaque de 96 puits et d'un couvercle auquel sont accrochés des pyramides de pegs (glycanes). Ce seront les points d'attache et de croissance du biofilm, ce qui permettra de le transférer intégralement directement sur une nouvelle plaque contenant les différents traitements à tester (95). Une étude protéomique sur PAO1 de type sauvage a montré que les réponses bactériennes et la formation de biofilms sont spécifiques au matériau servant de support (96). De ce fait, il serait possible d'observer des différences entre la capacité de base de nos souches à former un biofilm via cette méthode, notre méthode de formation de biofilm sur matrice plastique et cette méthode utilisant des pyramides de pegs.

Il est difficile de prédire quelle concentration de composé ou d'antibiotique peut réussir à pénétrer le biofilm, sachant qu'il existe des biofilms plus ou moins robustes, et qu'au sein d'un biofilm on trouve des bactéries avec différents niveaux de tolérance aux xénobiotiques (97,98).

Enfin, les observations de ces résultats sont interprétées pour un faible nombre de répétitions biologiques (n=3), réduisant la puissance de l'analyse et augmentant la marge d'erreur des résultats (99). Cependant, bien que la répétition des expériences apporte plus de puissance statistique et une meilleure fiabilité des résultats, les quelques tendances observées avec des effets intéressants ne représentent qu'une infime partie des conditions testées dans ce projet. Il est très peu probable, au vu des résultats présentés, que des effets significatifs des composés soient observés pour la plupart des souches si l'on répète ces expériences plusieurs fois. Dans le contexte où un objectif majeur est de réduire les quantités d'antibiotiques administrées au patient, administrer à un patient un composé qui n'agirait que sur certaines souches ne présente

pas d'intérêt majeur et ne devrait pas passer de nombreuses étapes dans les phases de développement clinique.

VI- Conclusion et perspectives

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, ses manifestations cliniques sont très variables d'un patient à l'autre. Pour cause, les différentes mutations possibles du gène CFTR affectent différemment le liquide de surface des voies respiratoires, ce qui crée un contexte inflammatoire et augmente le risque d'implantation et prolifération bactériennes. Le principal agent d'infection est le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Les travaux menés au cours de ce projet ont permis dans un premier temps de mettre en évidence la grande variabilité des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* infectant les patients atteints de mucoviscidose à travers la caractérisation d'une quarantaine d'isolats provenant de différents patients et niveaux de chronicité de l'infection. Ce phénomène est un élément clé dans la prise en charge du volet infectieux de la maladie. L'étude réalisée nous a permis de conclure que le NBA140 n'était pas efficace sur la capacité à inhiber la formation de biofilm ou à éradiquer un biofilm préexistant et que le NBA2456 n'était pas efficace pour réduire la production de pyocyanine pour des intervalles de concentration imposés par Neem. Nous avons pu suggérer des améliorations concernant l'évaluation de l'activité enzymatique de la protéase IV après traitement avec NBA2456 et suggérer une autre méthode pour étudier l'impact des composés sur le biofilm préformé. Ces données ont été présentées à Neem Biotech Ltd. et des essais de contrôle de qualité des composés qui nous ont été envoyés ainsi que de leurs différents lots vont être réalisés au cours de l'année 2023, afin de n'attribuer ces résultats non concluants qu'à la non-efficacité des composés. En parallèle, nous allons leur transmettre des échantillons de nos souches de laboratoire PAO1 et PA14, pour qu'ils puissent tenter de reproduire leurs résultats préliminairement obtenus. Il est en effet possible d'observer une certaine variabilité entre différents isolats d'une même souche bactérienne. Par la suite, notre équipe poursuivra et terminera les travaux par l'évaluation de l'impact de NBA2456 et NBA134 sur un biofilm

préexistant sur la base de nos travaux sur NBA140. Nous rediscuterons ensemble plus en détail ces résultats dans leur globalité afin que Neem Biotech Ltd. puisse poursuivre les travaux et ainsi optimiser la recherche de nouveaux candidats-médicaments à activité antivirulente chez Pseudomonas.

VII- Bibliographie

1. Mehta G, Macek M, Mehta A, European Registry Working Group. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* déc 2010;9 Suppl 2:S5-21.
2. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003. *Eur Respir J.* 1 mars 2007;29(3):522-6.
3. ECFS Patient Registry. :139.
4. Kerem BS, Zielenski J, Markiewicz D, Bozon D, Gazit E, Yahav J, et al. Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1990;87(21):8447-51.
5. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109(5):893-9.
6. Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med.* 27 avr 2017;15:84.
7. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl.* 17 mai 2003;361(9370):1671-6.
8. Marson FA de L, Bertuzzo CS, Ribeiro MÂG de O, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis,. *J Bras Pneumol Publicação Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia.* 2013;39(3):306-16.
9. Kerem E, Kerem B. The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* nov 1995;1(6):450-6.
10. Boeck KD, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 1 août 2016;4(8):662-74.
11. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med.* 2007;58:157-70.
12. Garland AL, Walton WG, Coakley RD, Tan CD, Gilmore RC, Hobbs CA, et al. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 oct 2013;110(40):15973-8.
13. Bruscia EM, Bonfield TL. Innate and Adaptive Immunity in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med.* mars 2016;37(1):17-29.
14. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell.* 23 déc 1998;95(7):1005-15.
15. Starner TD, McCray PB, American College of Physicians, American Physiological Society. Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann Intern Med.* 6 déc 2005;143(11):816-22.

16. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol.* nov 2018;53(S3):S30-50.
17. Reeves EP, Williamson M, O'Neill SJ, Grealley P, McElvaney NG. Nebulized hypertonic saline decreases IL-8 in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juin 2011;183(11):1517-23.
18. Vallières E, Elborn JS. Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *Adv Genomics Genet.* 21 oct 2014;4:161-72.
19. Abou Alaiwa MH, Beer AM, Pezzulo AA, Launspach JL, Horan RA, Stoltz DA, et al. Neonates with cystic fibrosis have a reduced nasal liquid pH; a small pilot study. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* juill 2014;13(4):373-7.
20. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature.* 4 juill 2012;487(7405):109-13.
21. Hoegger MJ, Fischer AJ, McMenimen JD, Ostedgaard LS, Tucker AJ, Awadalla MA, et al. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science.* 15 août 2014;345(6198):818-22.
22. Shah VS, Meyerholz DK, Tang XX, Reznikov L, Abou Alaiwa M, Ernst SE, et al. Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. *Science.* 29 janv 2016;351(6272):503-7.
23. Goldberg JB, Pier GB. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol.* nov 2000;8(11):514-20.
24. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 1 déc 2004;10(12):599-606.
25. Tümmler B, Bosshammer J, Breitenstein S, Brockhausen I, Gudowius P, Herrmann C, et al. Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Behring Inst Mitt.* févr 1997;(98):249-55.
26. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* nov 2016;37(11):1288-301.
27. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539.
28. Surette MG. The Cystic Fibrosis Lung Microbiome. *Ann Am Thorac Soc.* janv 2014;11(Supplement 1):S61-5.
29. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol.* 2011;2:150.
30. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* août 2000;3(4):247-55.

31. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* août 2011;19(8):419-26.
32. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* nov 2003;5(13):1213-9.
33. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* déc 2010;192(23):6191-9.
34. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* févr 2013;21(2):73-81.
35. de Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 29 nov 2021;22(23):12892.
36. Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* mai 2010;86(6):1659-70.
37. Causer AJ, Shute JK, Cummings MH, Shepherd AI, Gruet M, Costello JT, et al. Circulating biomarkers of antioxidant status and oxidative stress in people with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Redox Biol.* mai 2020;32:101436.
38. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 1 oct 2017;398(10):1095-108.
39. Britigan BE, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun.* mars 1999;67(3):1207-12.
40. Munro NC, Barker A, Rutman A, Taylor G, Watson D, McDonald-Gibson WJ, et al. Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. juill 1989;67(1):316-23.
41. Rada B, Gardina P, Myers TG, Leto TL. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas* pyocyanin. *Mucosal Immunol.* mars 2011;4(2):158-71.
42. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* janv 2006;86(1):245-78.
43. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:405-29.
44. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.* 5 avr 2012;18(4):509-19.
45. Suter S. The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* déc 1994;150(6 Pt 2):S118-122.

46. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from *Pseudomonas aeruginosa* *. J Biol Chem. 3 juill 1998;273(27):16792-7.
47. Guillon A, Brea D, Morello E, Tang A, Jouan Y, Ramphal R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* proteolytically alters the interleukin 22-dependent lung mucosal defense. Virulence. 28 oct 2016;8(6):810-20.
48. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. J Biol Chem. 13 sept 2002;277(37):33676-82.
49. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. Eur J Immunol. mai 2006;36(5):1309-23.
50. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. Nat Med. mars 2008;14(3):275-81.
51. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. sept 2002;8(9):881-90.
52. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci. 17 nov 2020;21(22):E8671.
53. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mol Microbiol. oct 2003;50(1):61-8.
54. Alarcon I, Evans DJ, Fleiszig SMJ. The Role of Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa* Exit from and Translocation of Corneal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. mai 2009;50(5):2237-44.
55. Hickman JW, Harwood CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. Mol Microbiol. juill 2008;69(2):376-89.
56. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathog. mars 2009;5(3):e1000354.
57. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed Res Int. 2015;2015:759348.
58. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet Lond Engl. 14 juill 2001;358(9276):135-8.
59. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol IJMM. juill 2002;292(2):107-13.
60. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol. mars 2008;6(3):199-210.

61. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357-72.
62. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2003;47(1):317-23.
63. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* janv 2015;6(1):26-41.
64. Scoffone VC, Trespidi G, Chiarelli LR, Barbieri G, Buroni S. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. *Int J Mol Sci.* 13 avr 2019;20(8):1838.
65. Deng Y, Wu J, Tao F, Zhang LH. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev.* 12 janv 2011;111(1):160-73.
66. Liu B, Zhou C, Li G, Zhang H, Zeng E, Liu Q, et al. Bacterial regulon modeling and prediction based on systematic cis regulatory motif analyses. *Sci Rep.* 15 mars 2016;6(1):23030.
67. Schuster M, Greenberg EP. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics.* 22 août 2007;8:287.
68. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 sept 1999;96(20):11229-34.
69. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol IJMM.* avr 2006;296(2-3):73-81.
70. Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* 24 févr 2006;311(5764):1113-6.
71. Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 déc 2001;98(25):14613-8.
72. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol.* mai 2013;9(5):339-43.
73. Moss RB. Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis. *Chest.* janv 2002;121(1):55-63.
74. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2007;176(10):957-69.
75. Stanton BA, Hampton TH, Ashare A. SARS-CoV-2 (COVID-19) and cystic fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 1 sept 2020;319(3):L408-15.
76. Ornatowski W, Poschet JF, Perkett E, Taylor-Cousar JL, Deretic V. Elevated furin levels in human cystic fibrosis cells result in hypersusceptibility to exotoxin A-induced cytotoxicity. *J Clin Invest.* nov 2007;117(11):3489-97.

77. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr.* déc 2001;139(6):813-20.
78. Robinson M, Regnis JA, Bailey DL, King M, Bautovich GJ, Bye PT. Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 1996;153(5):1503-9.
79. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juin 2013;187(11):1219-25.
80. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelman WE, Sawicki GS, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med.* févr 2016;4(2):107-15.
81. Kopeikin Z, Yuksek Z, Yang HY, Bompadre SG. Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities of F508del-CFTR channels. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* sept 2014;13(5):508-14.
82. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 29 oct 2015;373(18):1783-4.
83. Paterson SL, Barry PJ, Horsley AR. Tezacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med.* 2 janv 2020;14(1):15-30.
84. Capurro V, Tomati V, Sondo E, Renda M, Borrelli A, Pastorino C, et al. Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment. *Int J Mol Sci.* 17 mai 2021;22(10):5262.
85. Sriramulu DD, Lünsdorf H, Lam JS, Römling U. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol.* juill 2005;54(Pt 7):667-76.
86. Pharmacognosy and Health Benefits of Garlic | Notes | PharmaXChange.info [Internet]. 2014 [cité 21 déc 2022]. Disponible sur: <https://pharmaxchange.info/2014/01/pharmacognosy-and-health-benefits-of-garlic/>
87. Jakobsen TH, Warming AN, Vejborg RM, Moscoso JA, Stegger M, Lorenzen F, et al. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Sci Rep.* 29 août 2017;7(1):9857.
88. Kasetty S, Katharios-Lanwermyer S, O'Toole GA, Nadell CD. Differential Surface Competition and Biofilm Invasion Strategies of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and PAO1. *J Bacteriol.* 25 oct 2021;203(22):e0026521.
89. Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann HS, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am J Pathol.* déc 2009;175(6):2473-88.
90. Žukovskaja O, Agafilushkina S, Sivakov V, Weber K, Cialla-May D, Osminkina L, et al. Rapid detection of the bacterial biomarker pyocyanin in artificial sputum using a SERS-active silicon nanowire matrix covered by bimetallic noble metal nanoparticles. *Talanta.* 1 sept 2019;202:171-7.

91. El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bialy HA, Omara AMA. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sci*. 1 janv 2015;8(1):36-48.
92. Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, O'Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem*. mars 2001;290(2):330-7.
93. Rami Tzafiriri A, Edelman ER. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. *J Theor Biol*. 21 avr 2007;245(4):737-48.
94. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp JoVE*. 30 janv 2011;(47):2437.
95. Grimus V, Coraça-Huber DC, Steixner SJM, Nagl M. Activity of N-Chlorotaurine against Long-Term Biofilms of Bacteria and Yeasts. *Antibiotics*. 22 juill 2021;10(8):891.
96. Guilbaud M, Bruzaud J, Bouffartigues E, Orange N, Guillot A, Aubert-Frambourg A, et al. Proteomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Adhering to Solid Surfaces. *Front Microbiol*. 2017;8:1465.
97. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 28 juin 2017;27(6):1053-64.
98. Fernández-Gómez P, Figueredo A, López M, González-Raurich M, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A. Heterogeneity in biofilm formation and identification of biomarkers of strong biofilm formation among field isolates of *Pseudomonas* spp. *Food Res Int Ott Ont*. oct 2021;148:110618.
99. Dumas-Mallet E, Button KS, Boraud T, Gonon F, Munafò MR. Low statistical power in biomedical science: a review of three human research domains. *R Soc Open Sci*. févr 2017;4(2):160254.

Nom – Prénoms : Aoun Mickael

Titre de la thèse :

Etude des propriétés anti-virulentes et anti-biofilm d'analogues synthétiques de molécules d'origine végétale contre *Pseudomonas aeruginosa* en contexte de mucoviscidose

Résumé de la thèse :

Dans cette thèse, je présente les travaux réalisés sur deux analogues synthétiques de l'Ajoène, un composé antibactérien retrouvé dans l'ail. L'objectif de ce projet était d'évaluer la capacité de ces composés à impacter la formation de biofilm ainsi que la production de facteurs de virulence de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées en contexte de mucoviscidose.

MOTS CLÉS

ANALOGUES SYNTHETIQUES, ANALYSE *IN VITRO*, ANTIVIRULENCE, SOUCHES CLINIQUES, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, MUCOVISCIDOSE

JURY

PRESIDENT : M. Olivier Grovel, Professeur de Pharmacognosie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

ASSESEURS : Mme Lise Crémet, Maître de Conférences de Bactériologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Nidia Alvarez Rueda, Maître de Conférences de Parasitologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Jane Davies, Professeure en pneumologie pédiatrique, Imperial College of London, Londres