

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 10 juillet 2023
Par M. Camberlein Virgyl**

**L'Elastase LasB : une cible attractive pour lutter
contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa***

Membres du jury :

Président : Pr. DEPREZ Benoit, Professeur des Universités, Laboratoire U1177,
Faculté de Pharmacie de Lille

Directeur, conseiller de thèse : Pr. DEPREZ-POULAIN Rebecca, Docteur en
Pharmacie, Professeur des Universités, Laboratoire U1177, Faculté de Pharmacie
de Lille

Membre extérieur : Dr. ALCAIDE-VEREZ, Docteur en Pharmacie, Pharmacien
d'officine, Pharmacie des Glacis à Dunkerque

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81

Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27

Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85

M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de ce jury : Pr. Benoit Deprez, Pr. Rebecca Deprez-Poulain et Dr. Raphaëlle Alcaïde-Verez, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Au Pr. Benoit Deprez :

Je tiens tout d'abord à vous remercier d'avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie également de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, de m'avoir suivi, guidé, fait grandir tout au long de mes études de pharmacie. Ce fût un réel plaisir d'avoir pu apprendre au sein de vos côtés. Je pense qu'il n'y avait pas meilleure personne pour présider ce jury.

Au Pr. Rebecca Deprez-Poulain :

Rebecca, merci de m'avoir donné l'opportunité d'avoir pu évoluer tant scientifiquement qu'humainement au sein du laboratoire à Lille, de m'avoir suivi de la 2ème année jusqu'à aujourd'hui. Je tiens également à te remercier de m'avoir aidé toutes ces années, de m'avoir poussé à viser l'excellence dans tout ce que j'entreprenais, et surtout de m'avoir poussé à terminer cette thèse ! Je te serais éternellement reconnaissant pour ton soutien indéfectible, pour la passion pour la chimie médicinale que tu as sue me transmettre et surtout l'envie de poursuivre ces études avec la thèse de sciences. Ce fût un réel plaisir d'avoir pu travailler à tes côtés, en espérant que la thèse de pharma ne soit que la fin d'un chapitre et non la fin du livre.

Au Dr. Raphaëlle Alcaïde-Verez :

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous remercie également pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés, et pour la confiance que vous m'avez accordée depuis toutes ces années.

Je tiens, ensuite, à remercier mes parents de m'avoir permis de suivre ces études longues et difficiles, ainsi que mes frères et mes anciens camarades de fac pour leur soutien sans faille. Enfin, merci au Dr. David Alapini de m'avoir accueilli en stage la majeure partie de mes études, et ainsi d'avoir contribué grandement à ma formation et mon évolution.

Abréviations

AprA : Protéase alcaline

BHL : *N*-butanoyl-L-homoserine lactone

BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

ECDC : Centre Européen de Prévention et de Contrôle des maladies

ExIA : Exolysine

ExoS, T, U, Y : Exotoxines S, T, U, Y

HNE : Elastase des Neutrophiles humains

K_i : Constante d'inhibition

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IQS : 2-(2-hydrophenyl)-thiazole-4-carbaldehyde

LecA et LecB : Lectines A et B

LPS : Lipopolysaccharide

MMP : Métalloprotéinase Matricielles

NAG : *N*-acétylglucosamine

NAM : Acide *N*-acétylmuramique

OdDHL : *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PAVM : Pneumonies Associées à la Ventilation Mécanique

Pch : Pyochéline

PCN : Pyocyanine

PEA : Exotoxine A

PLC : Phospholipase C

PLP : Protéines Liant les Pénicillines

PQS : 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone

Pvd : Pyoverdine

QS : Quorum Sensing

RND : Résistance-Nodulation-Division

TACE : Enzyme de Conversion du TNF α

T1SS : Système de Sécrétion de Type 1

Wt : Wild-typ

Sommaire

Introduction générale.....	13
I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : profil d'une bactérie opportuniste et préoccupante	15
1. <i>P. aeruginosa</i> : généralités	15
2. <i>P. aeruginosa</i> : ses facteurs de virulence, leurs rôles dans la pathogenèse et leurs régulations.....	16
A) <i>Les facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne</i>	17
B) <i>Les facteurs de virulence sécrétés</i>	18
3. <i>P. aeruginosa</i> : épidémiologie.....	21
A) <i>Infections nosocomiales</i>	21
B) <i>Mucoviscidose</i>	22
C) <i>Infections chez les immunodéprimés</i>	22
4. <i>P. aeruginosa</i> : traitement.....	23
a) <i>Les β-lactamines</i>	23
b) <i>Les aminosides</i>	25
c) <i>Les quinolones</i>	26
d) <i>Les polypeptides</i>	27
5. <i>P. aeruginosa</i> : résistance	29
a) <i>Epidémiologie</i>	29
b) <i>Mécanismes de résistance</i>	29
II) L'élastase LasB : une cible attractive pour lutter contre <i>P. aeruginosa</i>	34
1. Production et régulation.....	34
2. Structure, activités et rôles biologiques	35
a) <i>Structure</i>	35
b) <i>Mécanisme catalytique</i>	36
c) <i>Substrats clivés par LasB</i>	37
3. Impact de LasB sur la virulence dans des modèles animaux d'infection	39
III) Les inhibiteurs de LasB décrits dans la littérature	44
1. Les phosphoramidates	44
2. Les thiols.....	45
a) <i>Peptidiques</i>	45
b) <i>Non peptidiques</i>	48
3. Les acides hydroxamiques	51
4. Les acides carboxyliques.....	54
5. Les acides phosphoniques	58
6. Les chélateurs de métaux.....	61
Conclusion.....	63

Introduction générale

Avec les vaccins, les antibiotiques sont considérés comme l'une des plus grande avancée de la médecine moderne. Malheureusement, depuis quelques années, ces antibiotiques perdent de leur efficacité en raison de l'apparition et la dissémination de bactéries résistantes mettant en péril le rôle essentiel joué par ces thérapeutiques dans les pratiques médicales actuelles.

D'après le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies, ce phénomène de résistance est responsable d'environ 30 000 décès par an et sera responsable de 10 millions de décès d'ici 2050 d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

La bactérie gram-négative *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) fait partie des bactéries ayant la capacité de développer facilement et propager des souches multirésistantes, et est ainsi considérée par l'OMS comme étant une bactérie hautement menaçante pour l'humanité. Etant capable d'adopter un mode de croissance en biofilm, elle dispose d'une arme redoutable pour lutter contre les antibiotiques rendant son élimination difficile. A ce jour, l'évolution et la dissémination rapide de souches résistantes dépassent le développement des antibiotiques, d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies antimicrobiennes.

Acteurs clés de la pathogénèse, les facteurs de virulence apparaissent comme une alternative prometteuse. En effet, ces facteurs de virulence contribuent à l'établissement et la chronicité de l'infection soit en endommageant l'hôte soit en permettant à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire. Ainsi, interférer avec ces facteurs de virulence permettrait de « désarmer » les bactéries et donc de réduire les dommages au sein de l'hôte et contourner la résistance aux antibiotiques. De plus, cette stratégie présente deux avantages de choix : de nombreux facteurs de virulence ont une localisation extracellulaire, ce qui ne nécessite pas la pénétration de la paroi cellulaire, et une préservation des voies de croissance bactérienne, ce qui permet de réduire la pression sélective et de préserver les bactéries commensales.

Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons à l'élastase LasB qui est considérée comme l'un des facteurs de virulence les plus importants sécrétés par *P.*

aeruginosa et nous aborderons les différents inhibiteurs de cette protéase en cours de développement.

I. *Pseudomonas aeruginosa* : profil d'une bactérie opportuniste et préoccupante

1. *P. aeruginosa* : généralités

Décrite pour la première fois en 1882 par Carle Gessard, pharmacien français, *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie gram-négative opportuniste en forme de bâtonnets d'environ 1 à 5 µm de long et 0.5 à 1 µm de large. La majorité des souches dispose d'un seul flagelle qui assure sa mobilité et produit des antigènes thermolabiles (antigène H). Cette bactérie dispose également de pillis qui permet sa fixation et ainsi la colonisation. Son enveloppe cellulaire est similaire à celle des autres bactéries gram-négatives et se compose de trois couches : la membrane cytoplasmique, la couche de peptidoglycane et la membrane externe. La membrane externe est composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides (LPS)^[1].

Bien que cette bactérie soit à l'origine de la surinfection des plaies des soldats lors de la première guerre mondiale, elle a surtout émergée comme un agent pathogène opportuniste majeur dans les années 1960-1970 notamment avec le développement de l'hospitalisation et des techniques invasives d'exploration. On retrouve *P. aeruginosa* dans de nombreux environnements, en particulier dans les environnements hydriques (égouts, lacs, piscines...). On distingue deux types de contamination : une contamination directe à partir des réservoirs environnementaux et une contamination indirecte via le matériel médicale ou le personnel soignant ; l'hôpital représente donc une niche favorable au développement de cette bactérie (douches, toilettes, endoscopes, respirateurs, nébulisateurs...)^[2].

P. aeruginosa est doté d'un des génomes les plus grands parmi ceux des espèces bactériennes (5,5 à 7 Mbp, 4,6 Mbp chez *Escherichia Coli*, 4,4 Mbp chez *Mycobacterium tuberculosis*)^[3]. Celui-ci code une grande proportion de facteurs de virulence qui permettent à cette bactérie de s'adapter assez facilement aux divers environnements hostiles et d'infecter différents hôtes.

2. *P. aeruginosa* : ses facteurs de virulence, leurs rôles dans la pathogénèse et leurs régulations

La virulence des agents pathogènes implique leur capacité à infecter l'hôte et à provoquer des symptômes cliniques via les différents facteurs de virulence, qui selon leur nature, contribuent à la fixation, à la colonisation et à l'invasion de l'hôte, à l'interruption de l'intégration des tissus de l'hôte, à la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte et à l'évasion de celle-ci, ainsi qu'à l'épuisement des nutriments de l'hôte [1,4-6].

L'une des particularités de *P. aeruginosa* est sa capacité à adopter deux modes de vie radicalement différents et ces derniers vont conduire à deux modes d'infections différents : des infections aiguës versus des chroniques. En effet, dans les infections aiguës, la bactérie est agressive et mobile, et utilise ses toxines et enzymes pour infliger des dégâts au sein de l'hôte. Alors que lorsqu'elle induit des infections chroniques, elle est plutôt immobile et adopte un mode de croissance en biofilm, et induit des dégâts utilisant le système immunitaire de son hôte. Par conséquent, on va distinguer des différences dans la sécrétion de ces facteurs en fonction du stade de l'infection.

Les nombreux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* peuvent être divisés en deux catégories principales, à savoir ceux liés à la paroi bactérienne et ceux qui sont sécrétés par la bactérie. Les facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne interviennent notamment dans l'attachement et la colonisation, on retrouve par exemple le flagelle, le pili de type IV et les lectines tandis que ceux qui sont sécrétés sont responsables des lésions cellulaires et tissulaires provoqués au sein de l'hôte, et on retrouve par exemple les enzymes lytiques et les toxines. De plus, comme décrit précédemment, *P. aeruginosa* est doté d'un autre mécanisme de virulence consistant en la formation de biofilms. Le biofilm est une mode de croissance dans lequel les bactéries sont immobiles et s'agrègent dans des substances polymériques extracellulaires, leur permettant de contourner des conditions défavorables comme par exemple les carences en nutriments, les fluctuations de température ou l'action des antibiotiques^[7]. Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure 1).

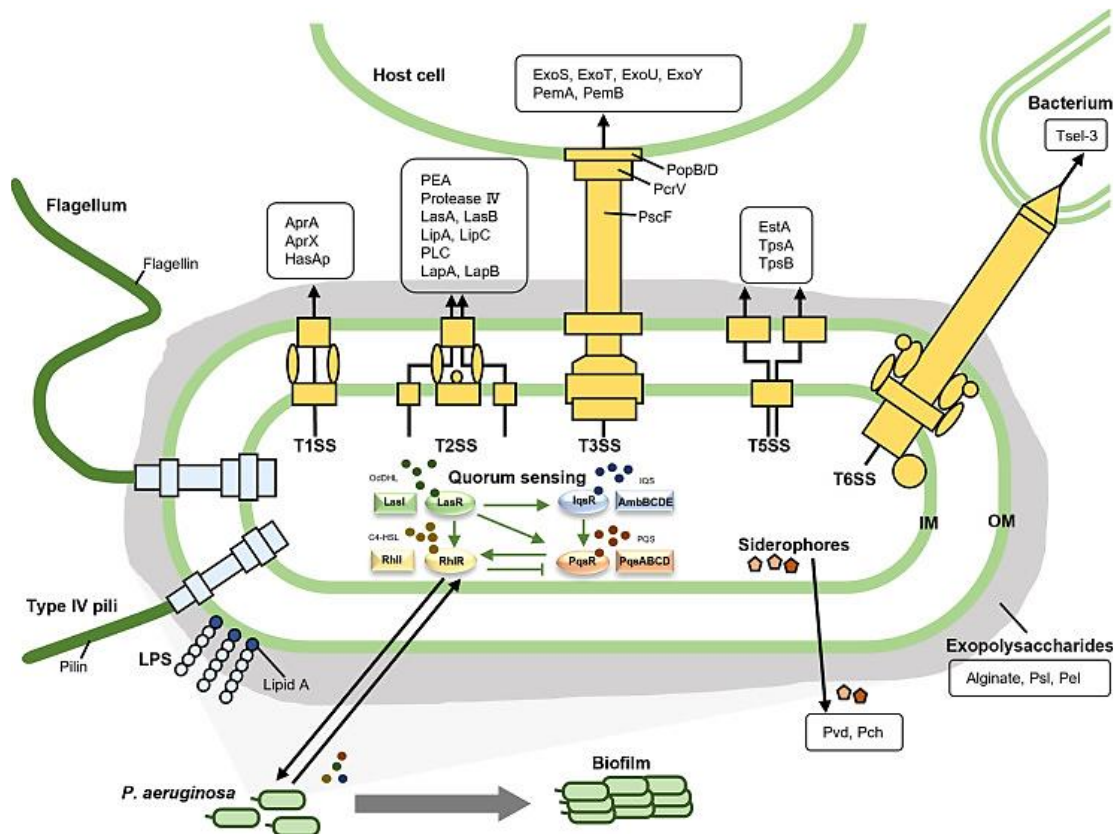


Figure 1 : Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, issue de Liao et al.^[8]. Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sont divisés deux catégories principales : les éléments de la paroi bactérienne et les facteurs sécrétés. Les structures de surface bactériennes comprennent des appendices de surface comme les pili de type IV et les flagelles, des composants de la membrane externe comme le lipopolysaccharide et cinq systèmes de sécrétion (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS et T6SS). Les facteurs sécrétés sont illustrés dans les cases noires.

A) Les facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne

Parmi les éléments de la paroi bactérienne impliqués dans la virulence, on retrouve trois principaux composants : les appendices de surface tels que les pili de type IV, les flagelles et les lectines, les composants de la membrane externe comme le lipopolysaccharide ainsi que les différents systèmes de sécrétion. Leurs rôles respectifs dans la pathogénèse sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Les facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne et leurs rôles dans la pathogénèse

Catégories	Facteurs de virulence	Rôle dans la pathogénèse
Appendice de surface	Pili de type IV	Fixation aux cellules hôtes, motilité (twitching et swarming) et formation de biofilm
	Flagelle	Motilité (swarming), adhésion et formation de biofilm

	Lectines A et B (LecA et LecB)	Adhésion et formation de biofilm
Composant de la membrane externe	Lipopolysaccharide	Stimulation de la réponse inflammatoire de l'hôte et évasion via une résistance à la phagocytose
Système de sécrétion	Type 1 (T1SS)	Sécrétion de protéases alcalines, absorption de l'hème et utilisation du fer
	Type 2 (T2SS)	Sécrétion d'enzymes lytiques
	Type 3 (T3SS)	Injection d'effecteurs virulents dans les cellules hôtes
	Type 5 (T5SS)	Sécrétion de protéines liées à l'adhésion et à la formation de biofilm
	Type 6 (T6SS)	Distribution de toxines aux bactéries voisines, translocation d'effecteurs vers les cellules hôtes et formation de biofilm

B) Les facteurs de virulence sécrétés

Les facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* peuvent être classifiés en 4 groupes : les exopolysaccharides, les sidérophores, les protéases ainsi que les différentes toxines produites. Comme précédemment, leurs fonctions respectives sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Les facteurs de virulence sécrétés et leurs rôles dans la pathogénèse

Catégories	Facteurs de virulence	Rôle dans la pathogénèse
Exo-polysaccharides	Alginate	Adhésion, évasion et formation de biofilm
	Pel et Psl	
Sidérophores	Pyoverdine (Pvd)	Croissance, survie et virulence des bactéries
	Pyochéline (Pch)	
Protéases	Protéase alcaline (AprA)	Régulation du quorum sensing et protection des bactéries contre les défenses de l'hôte

	Elastases A et B (LasA et LasB)	Dégradation des protéines du tissu de l'hôte, dégradation des composants du système immunitaire, induction de dommages au sein de l'hôte et formation de biofilm
	Protéase de type IV	Dégradation des protéines de l'hôte intervenant dans la réponse immunitaire de l'hôte
Toxines	Exotoxines S, T, U et Y (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY)	Perturbation du cytosquelette d'actine de l'hôte et induction de l'apoptose de la cellule hôte
	Exotoxine A (PEA)	Inhibition de la synthèse protéique conduisant à la mort cellulaire
	Exolysine (ExlA)	Formation de pores dans la membrane de la cellule hôte
	Phospholipase hémolytique C (PLC)	Dégradation du surfactant phospholipidique et destruction des cellules hôtes
	Leukocidine	Inhibition des fonctions immunitaires de l'hôte
	Pyocyanine (PCN)	Suppression de la réponse immunitaire et induction d'effets cytotoxiques aux cellules hôtes

Ces mécanismes de virulence sont régulés par des réseaux complexes et dynamiques ; la majeure partie des facteurs de virulence étant sous le contrôle du quorum sensing (QS)^[9,10]. QS est un système de communication, qui est basé sur la diffusion de petites molécules et qui dépend de la densité bactérienne et de divers signaux environnementaux. Ces petites molécules sont essentielle car, en fonction de leur quantité, elles entraînent l'activation ou la répression de gènes et permettant ainsi aux bactéries de coordonner leur comportement vis-à-vis d'un environnement particulier^[11].

Chez *P. aeruginosa*, le QS est formé de quatre voies : *las*, *rhl*, *iqs* et *pqs*, qui comprennent respectivement les récepteurs LasR, RhlR, IqsR et PqsR et qui utilisent respectivement des auto-inducteurs, à savoir *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine

lactone (OdDHL), *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL), 2-(2-hydrophenyl)-thiazole-4-carbaldehyde (IQS) et 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (PQS). Chaque voie contient une enzyme à activité synthase qui, en fonction de divers signaux environnementaux (faibles niveaux de fer, d'oxygène, de phosphate...), conduit à la production d'un auto-inducteur et d'une protéine réceptrice de transcription^[5]. Lorsque la concentration de l'auto-inducteur atteint un certain seuil, elle active la protéine réceptrice transcriptionnelle permettant au réseau de contrôler la production de nombreux facteurs importants pour la croissance et la virulence de la bactérie (Figure 2).

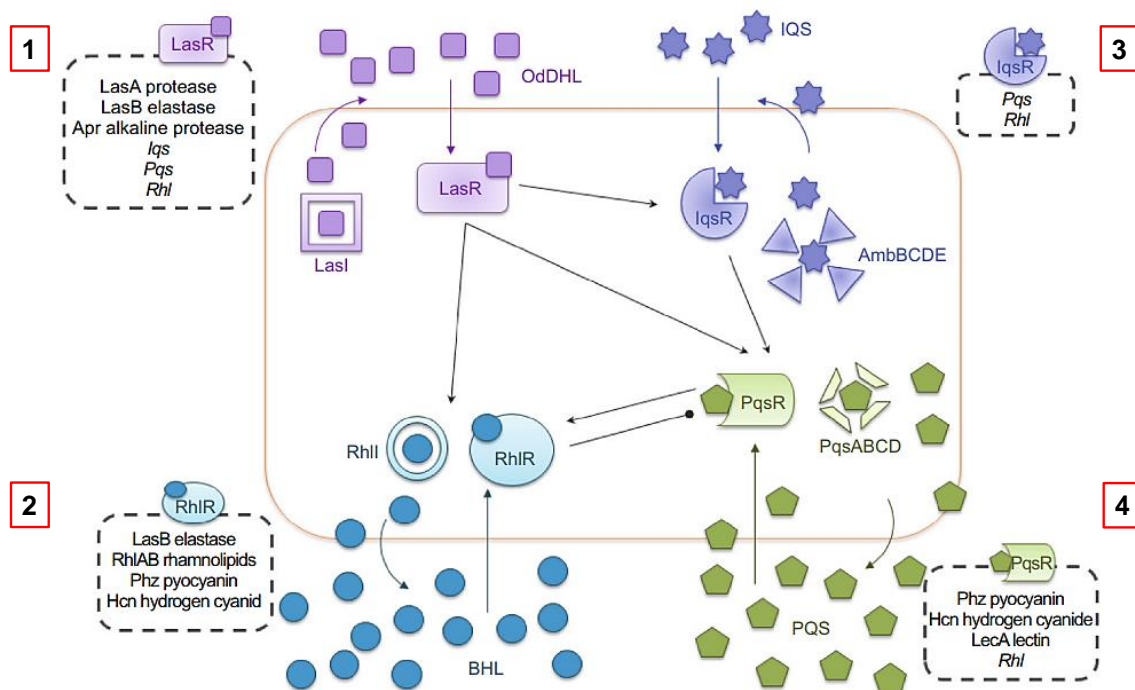


Figure 2 : Représentation schématique des quatre voies de signalisation du QS chez *P. aeruginosa*, leur régulation respectives et le rôle de chaque réseau sur la sécrétion des facteurs de virulence, issue de Lee et al.^[12]. Les quatre réseaux de signalisation incluent respectivement les récepteurs LasR, RhIR, IqsR et PqsR, les auto-inducteurs OdDHL, BHL, IQS et PQS, ainsi que les facteurs de transcription LasI, RhII, AmbBCDE et PqsABCD. Les flèches indiquent un effet stimulant tandis que la ligne muni d'un point indique un effet inhibiteur. Dans chaque boîte représentée en pointillés se trouvent les facteurs de virulence et les systèmes QS associés.

Ainsi, le QS joue un rôle clé dans les mécanismes de virulence associés à *P. aeruginosa*, notamment en régulant la libération de multiples facteurs de virulence (enzymes lytiques, toxines, rhamnolipides...) et en favorisant la maturation des biofilms et par conséquent la résistance.

3. *P. aeruginosa* : épidémiologie

P. aeruginosa est peu pathogène chez le sujet immunocompétent bien qu'il puisse être responsable d'infections communautaires bénignes telles que des surinfections de plaies, des otites externes ou des folliculites. Cependant, l'affaiblissement du système immunitaire révèle son caractère opportuniste et cette bactérie représente un réel danger pour ces patients immunodéprimés. *P. aeruginosa* est notamment responsable d'infections nosocomiales pouvant être mortelles, d'infections chez les patients souffrant de pathologies pulmonaires chroniques et est notamment lié intimement à la mucoviscidose, et d'infections chez les patients immunodéprimés^[13].

A) Infections nosocomiales

Cette bactérie est des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales, et on estime que *P. aeruginosa* est le quatrième pathogène le plus fréquemment rencontré dans les hôpitaux européens et est responsable d'environ 7-9% des infections nosocomiales^[14-16]. Parmi les infections nosocomiales, on la retrouve principalement les pneumonies (bactérie gram négative la plus fréquemment retrouvée), et dans de moindres proportions dans les infections urinaires, les infections post chirurgicales et les bactériémies. Selon une étude publiée en 2017, cette bactérie était responsable de 16% des infections en soins intensifs, avec une source respiratoire comme étant le site plus fréquent des infections à *P. aeruginosa*^[17]. Par exemple, ce pathogène est retrouvé dans 10 à 20% des cas de pneumonies associées à la ventilation mécanique (PAVM) chaque année, l'infection nosocomiale la plus fréquente en réanimation, derrière *Staphylococcus aureus*^[16,18]. Ces PAVMs secondaire à *P. aeruginosa* sont problématiques puisque la mortalité associée est estimée entre 32 et 43% avec des coûts associés très importants^[16]. Ce pathogène est fréquemment retrouvé dans les infections nosocomiales des voies urinaires, en particulier celles liées aux cathéters, il est à l'origine de 16% des infections urinaires en unités de soins intensifs et est responsable d'environ 10% des infections urinaires liées aux cathéters^[16]. Ces infections urinaires peuvent conduire à des complications de type bactériémie avec un taux de mortalité associé assez important d'environ 15%^[19].

Outre les pneumonies et les infections urinaires, *P. aeruginosa* est l'une des causes principales d'infections et de septicémie chez les patients souffrant de brûlures, conduisant très fréquemment au décès des patients^[16]. Elle représente également

environ 6% des infections de sites chirurgicaux notamment lors de chirurgies mammaires et cardiaques^[16]. Lorsque que ces infections se compliquent, elles conduisent à des bactériémies ; ces dernières sont associées à des taux élevés de mortalité, ces taux étant estimés entre 43 et 59%^[16].

B) Mucoviscidose

Conséquence de mutations du gène CFTR, la mucoviscidose est une maladie génétique qui touche principalement les voies respiratoires et le système digestif et qui se caractérise par des sécrétions visqueuses au niveau de ces organes. Ces patients vont être sujets aux infections en raison de leur mucus épais et collant qui obstrue leurs voies respiratoires ; les infections à *P. aeruginosa* étant parmi les infections les plus courantes avec une prévalence d'environ 30%^[20]. L'âge est un facteur aggravant, puisqu'on retrouve cette bactérie chez 14% des enfants contre 47% chez les adultes souffrant de mucoviscidose en Europe^[21].

Ces patients vont, dans la majorité des cas, souffrir d'infections chroniques à *P. aeruginosa* car les bactéries vont adopter un mode de croissance en biofilm, rendant ainsi leurs éliminations difficiles, constituant ainsi une cause majeure de morbidité et mortalité^[22].

C) Infections chez les immunodéprimés

Ce pathogène est redoutable chez les patients immunodéprimés, en particulier chez ceux atteints de neutropénies. Par exemple, *P. aeruginosa* est à l'origine de 17% des bactériémies à Gram négatif chez les patients souffrant d'hémopathies malignes^[16]. Les patients transplantés représentent également une population à risque vis-à-vis des infections à cette bactérie ; la mortalité imputable aux bactéries à *P. aeruginosa* étant estimée à 50% chez les patients ayant subi une transplantation pulmonaire ou de cellules souches^[23]. Elle est également l'une des principales bactéries responsables d'infections chez les patients brûlés (environ 14%), derrière *Staphylococcus aureus* (environ 55%)^[24].

4. *P. aeruginosa* : traitement

La prise en charge des infections à *P. aeruginosa* repose sur l'utilisation d'antibiotiques, et quatre grandes classes sont couramment utilisées^[25] :

- les β -lactamines qui bloquent la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne
- les aminosides qui inhibent la synthèse protéique bactérienne
- les quinolones qui empêchent la réplication de l'ADN bactérien
- les polypeptides qui perturbent la membrane cellulaire bactérienne

a) Les β -lactamines

La famille des β -lactamines est constituée de composés dont la structure chimique est articulée autour d'un noyau β -lactame. Parmi les β -lactamines actifs sur *P. aeruginosa*, on retrouve les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames qui sont utilisés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Parmi les pénicillines présentant une activité sur cette bactérie, on retrouve la ticarcilline et la pipéracilline qui sont la plupart du temps associés à des inhibiteurs de β -lactamases comme le tazobactam.

Concernant les céphalosporines, *P. aeruginosa* est sensible à la ceftazidime (3^{ème} génération), à la céfopérazone (3^{ème} génération), à la céfépime (4^{ème} génération) et à la ceftolozane (5^{ème} génération).

L'imipénème (en association avec la cilastine, inhibiteur de la déhydropeptidase rénale) et le méropénème sont deux carbapénèmes efficaces contre les infections à *P. aeruginosa*. Enfin, ce pathogène présente également une sensibilité à l'aztréonam, principal monobactame utilisé en clinique (Figure 3).

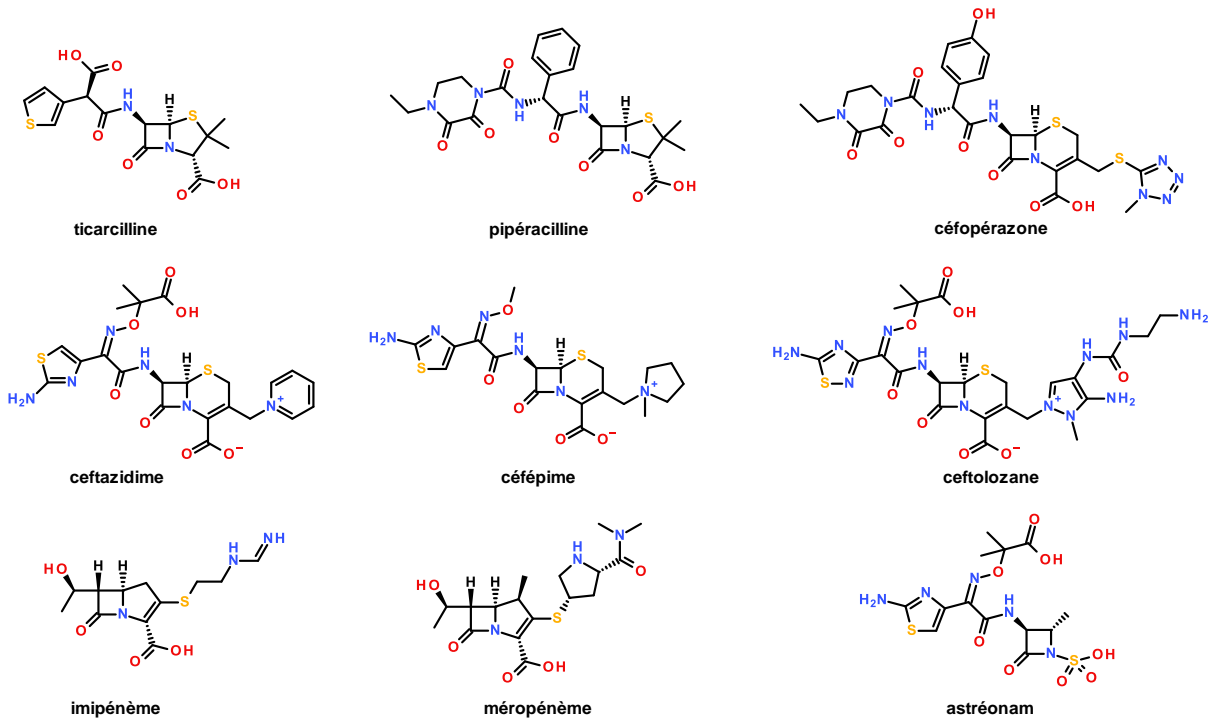


Figure 3 : Structures chimiques des pénicillines utilisées dans les infections à *P. aeruginosa*

Ces antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi cellulaire en agissant sur la formation d'un composant essentiel aux bactéries : le peptidoglycane. La formation de ce peptidoglycane est médiée par des transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases, et celles-ci sont les protéines cibles des β -lactamines. Ces enzymes sont également appelées Protéines Liant les Pénicillines (PLP)^[26]. Les β -lactamines vont exercer leurs effets par analogie structurale à un composant essentiel à la formation du peptidoglycane et qui est substrat naturel de ces enzymes : le motif D-alanine–D-alanine (Figure 4).

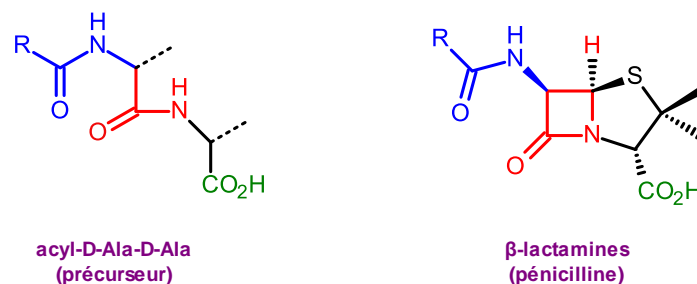


Figure 4 : Analogie structurale précurseur peptidoglycane – β -lactamine

Ces composés se comportent comme des substrats suicides, ils se fixent de façon covalente dans le site actif des transpeptidases, y subissent l'action de celles-ci au niveau du cycle β -lactame entravant leur fonctionnement, bloquant ainsi la synthèse du peptidoglycane et conduisant finalement à la lyse bactérienne^[27] (Figure 5).

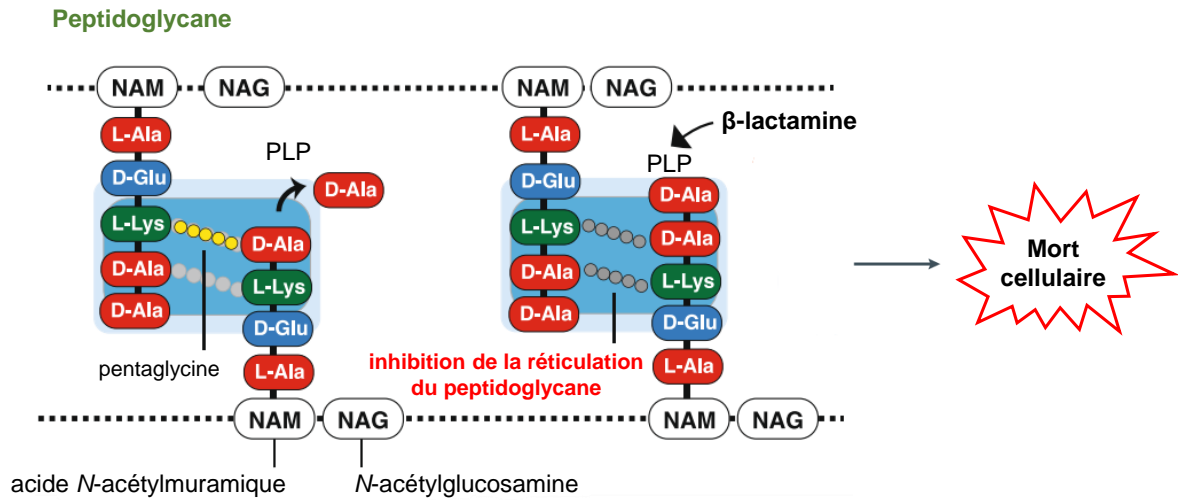


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action des β-lactamines, adaptée de Sawa *et al.*^[27]

b) Les aminosides

Les aminosides sont des molécules naturellement produites par des souches de *Streptomyces* ou d'Actinomyces, constituées d'un cycle central aminocyclitol relié à un ou plusieurs hexoses. L'amikacine, la gentamicine et la tobramycine sont les trois composés de cette classe étant utilisés contre cette bactérie (Figure 6).

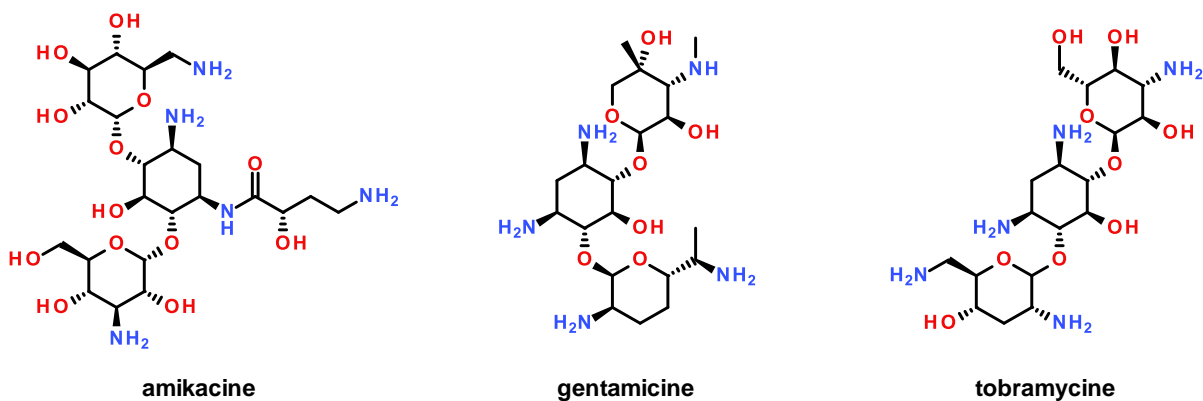


Figure 6 : Structures chimiques des aminosides utilisés dans les infections à *P. aeruginosa*

De par leurs structures polycationiques, ces molécules se lient au squelette polyphosphate de l'ARN ribosomal 16s au niveau de la sous-unité 30S. Cette liaison entraîne des erreurs de codage qui conduisent à une mauvaise traduction de l'ARNm en protéine et donc à la formation de protéines malfodées, mal traduites. Ces protéines vont s'accumuler et s'incorporer à l'enveloppe bactérienne provoquant la mort des bactéries^[28,29] (Figure 7).

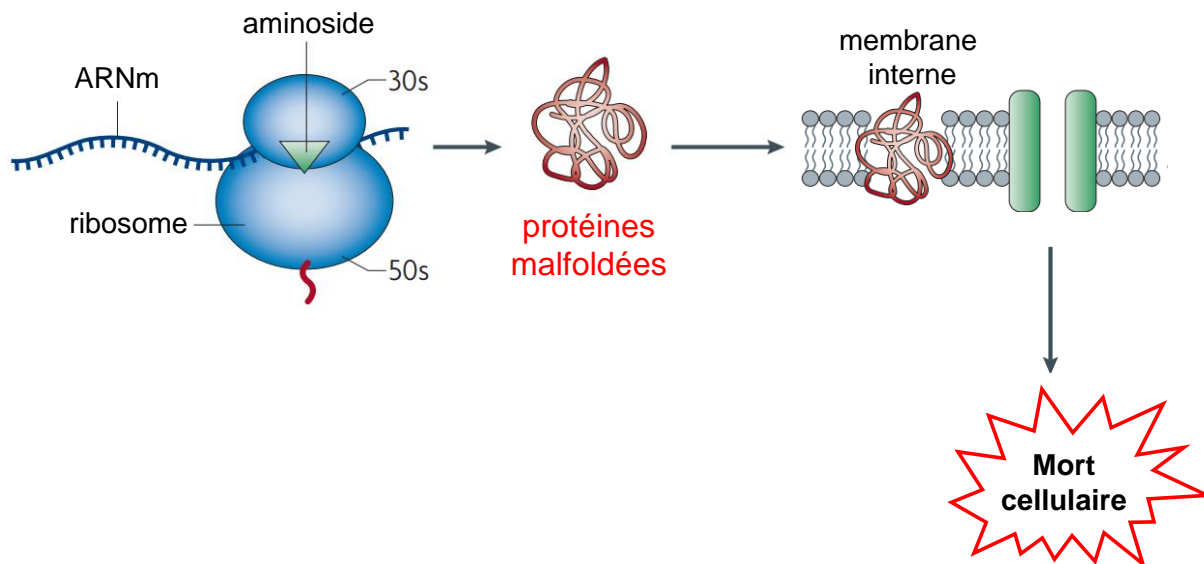


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action des aminosides, adaptée de Kohanski *et al.*^[28]

c) Les quinolones

P. aeruginosa présente également une sensibilité aux quinolones et notamment aux fluoroquinolones, qui comme leur nom l'indique, contiennent un noyau quinolone (Figure 8). Parmi les molécules utilisées, on retrouve la ciprofloxacine, la péfloxacin (2^{ème} génération de quinolones et 1^{ère} génération de fluoroquinolones) et la lévofloxacine (3^{ème} génération de quinolones et 2^{ème} génération de fluoroquinolones).

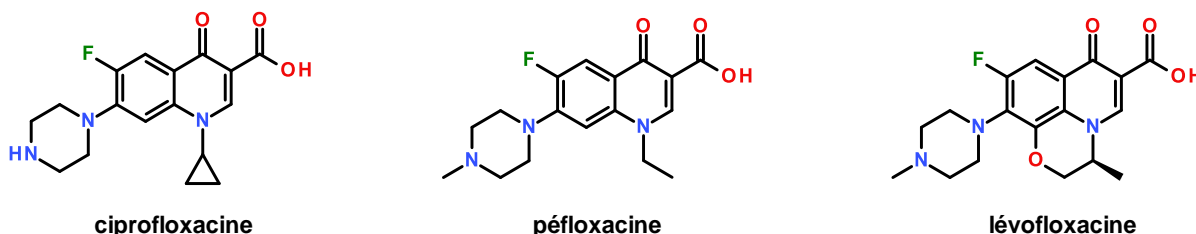


Figure 8 : Structures chimiques des fluoroquinolones utilisées dans les infections à *P. aeruginosa*

Ces antibiotiques perturbent la réplication de l'ADN bactérie en inhibant deux enzymes qui jouent un rôle clé dans les processus d'enroulements et désenroulements de l'ADN bactérien afin de faciliter l'action de l'ADN polymérase : la topoisomérase II (également appelé ADN gyrase) et la topoisomérase IV. Ceci induit des cassures doubles brins de l'ADN et celles-ci entraînent une réponse SOS. Cette réponse conduit à des mécanismes de réparation de l'ADN impliquant des ADN

polymérase de basse fidélité, conduisant à des mutations mortelles et donc aboutissant à la mort cellulaire^[28] (Figure 9).

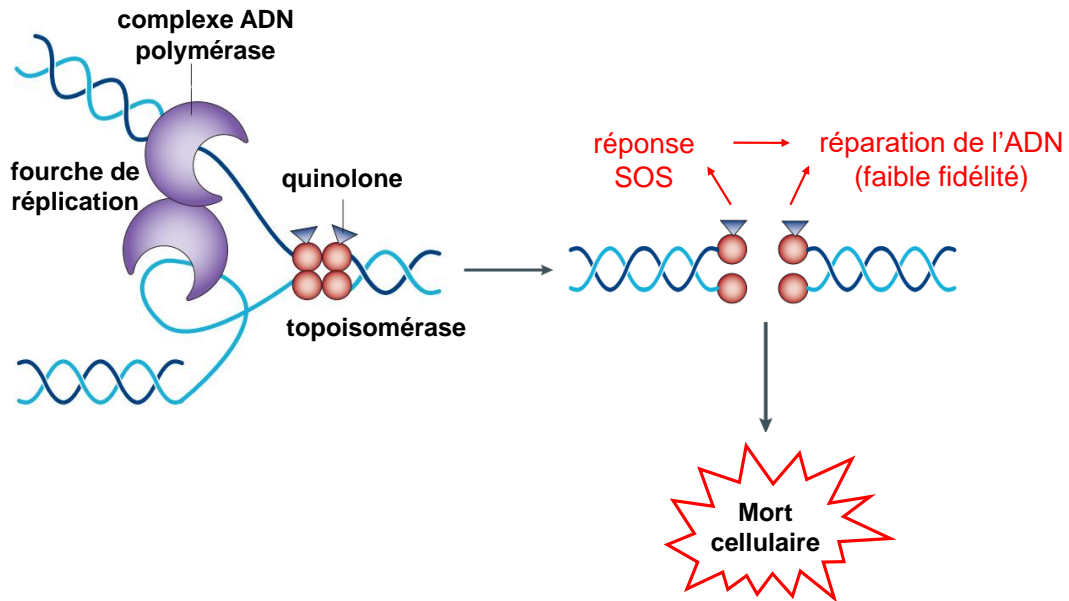


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action des quinolones, adaptée de Kohanski *et al.*^[28]

d) Les polypeptides

Comme leur nom l'indique, ce sont des structures polypeptidiques cationiques constituées d'un noyau heptapeptidique, d'unités d'acide diamino butyrique et d'une chaîne exocyclique acylée par un résidu d'acide gras (Figure 10). La polymyxine B et la colistine (polymyxine E) sont utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*.

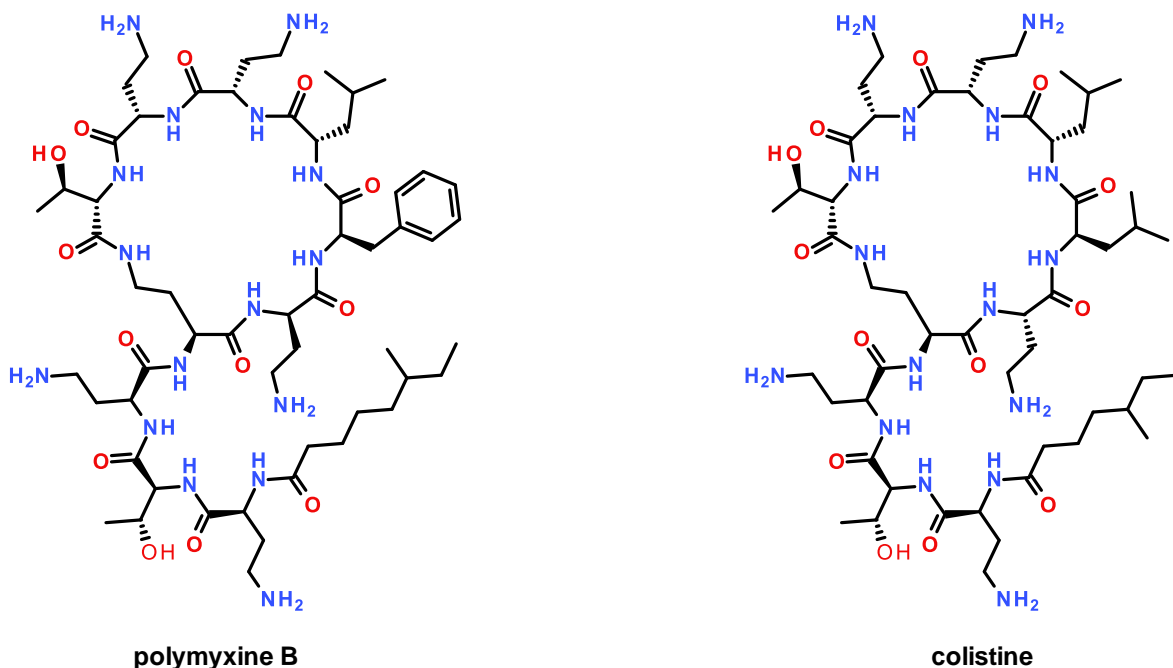


Figure 10 : Structures chimiques des polypeptides utilisés dans les infections à *P. aeruginosa*

Ces composés cationiques agissent sur la membrane cytoplasmique. Ils vont interagir, par l'intermédiaire d'une interaction électrostatique, avec le LPS anionique. Par le biais de cette interaction, ils s'incorporent entre les différentes couches (lipidiques et protéiques) de la membrane et induisent une rupture de l'intégrité osmotique. Ce phénomène entraîne la genèse de pores par le déplacement d'ions calcium et magnésium conduisant à des anomalies d'échanges provoquant de gros dysfonctionnements et ainsi la mort des bactéries^[30] (Figure 11).

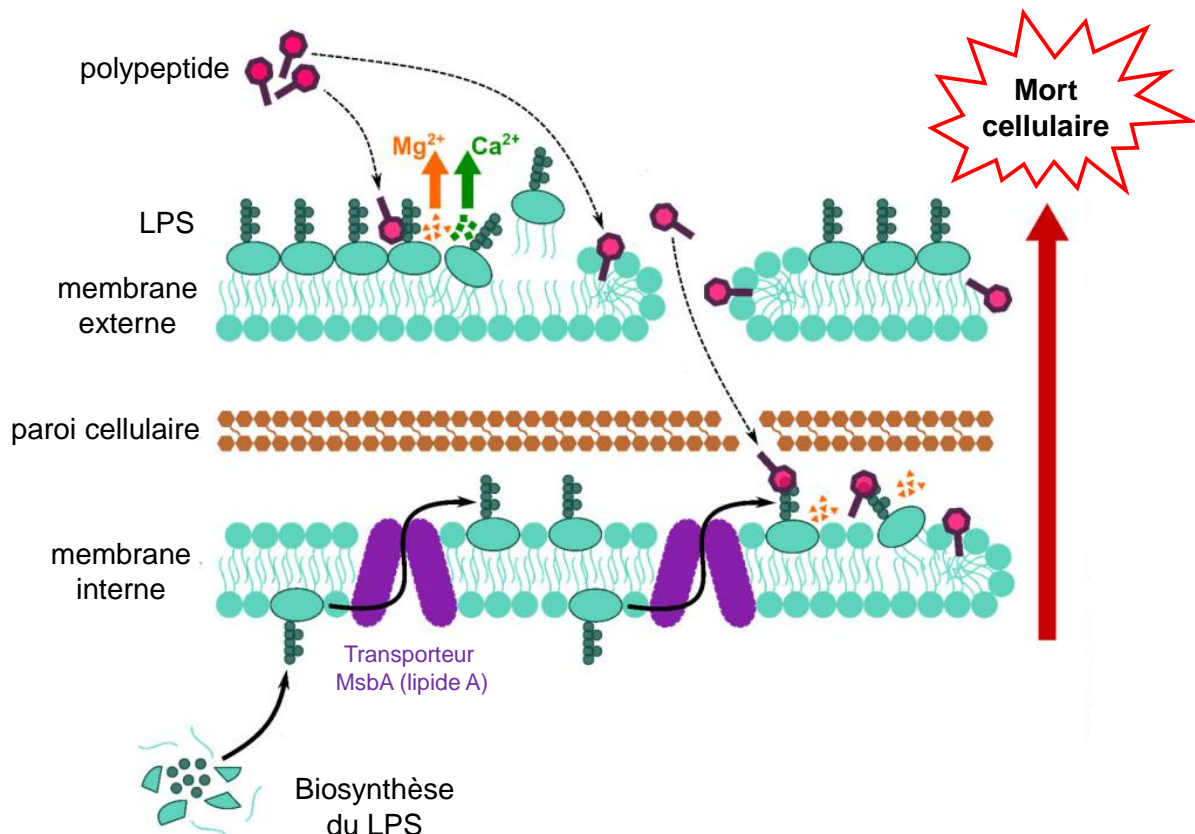


Figure 11 : Représentation schématique du mécanisme d'action des polypeptides, adaptée de Sabnis *et al.*^[30]

Malheureusement, l'apparition de résistances aux antibiotiques fait, de manière quasi systématique, suite à leurs utilisations en clinique. De plus, peu de nouvelles classes d'antibiotiques ont vu le jour depuis les années 1960, hormis les lipopeptides et oxazolidinones dans les années 2000, et les bactéries développent des mécanismes de résistance de plus en plus sophistiqués résultant en leur capacité à résister à plusieurs classes d'antimicrobiens, notamment *P. aeruginosa*.

5. *P. aeruginosa* : résistance

a) Epidémiologie

Ces dernières années, la prévalence des souches résistantes de *P. aeruginosa* a augmenté de façon conséquente, avec des taux compris entre 15 et 30% dans certaines zones géographiques^[31]. D'après une étude publiée en 2019, en Europe, la résistance aux antibiotiques concernant *P. aeruginosa* était associée à 43800 décès et 10800 directement attribués à celle-ci^[32]. De plus, selon le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies, les fluoroquinolones présentait le pourcentage de résistance le plus élevé (18,9 %), suivies par l'association pipéracilline-tazobactam (16,9 %), les carbapénèmes (16.5 %), la ceftazidime (14,3 %) et les aminosides (11,5 %) en 2019^[33]. Il a également été observé que 12% des isolats testés présentaient une résistance à plus de trois classes d'antibiotiques (Tableau 3).

Tableau 3 : Nombre total d'isolats invasifs de *P. aeruginosa* testés et pourcentage d'isolats présentant un phénotype résistant en 2019 adapté de l'ECDC^[33]

Antibiotiques	Nombre d'isolats invasifs testés	% d'isolats avec un phénotype résistant
Fluoroquinolones	20 273	18,9
Pipéracilline-Tazobactam	19355	16,9
Carbapénèmes	20127	16,5
Ceftazidime (C3G)	19849	14,3
Aminosides	20109	11,5

Comme vu précédemment, les patients atteints de mucoviscidose développent très facilement des infections à *P. aeruginosa*. Ainsi, cette résistance va conduire à l'apparition d'infections chroniques chez ces patients, et il a été estimé qu'environ 30% des patients atteints de mucoviscidose en Europe étaient chronique infectés par *P. aeruginosa* en 2017^[34], et environ 28% aux Etats-Unis en 2019^[35].

b) Mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistances aux antibiotiques peuvent être divisés en trois catégories : intrinsèque ou naturelle, acquise et adaptative.

- Intrinsèques

La résistance intrinsèque est une résistance naturelle à un ou plusieurs antimicrobiens. Elle survient lorsqu'il existe une expression inductible ou basal de gènes qui protègent contre les agents toxiques, ou lorsque ces derniers ne peuvent pas atteindre leurs cibles au sein de la bactérie.

Concernant *P. aeruginosa*, sa faible perméabilité de sa membrane externe est l'un de ses mécanismes de résistance naturelle. Cette faible perméabilité provient de la présence de porines, qui régulent notamment la diffusion des antibiotiques de nature anionique comme les β -lactamines. Par exemple, OprD est une porine spécifique de la membrane externe de *P. aeruginosa* impliquée dans la diffusion des carbapénèmes^[36].

Un autre mécanisme de résistance intrinsèque chez *P. aeruginosa* provient de l'expression de pompes d'efflux. Ce système d'efflux permet d'expulser du cytoplasme les molécules toxiques capables de perturber ou désorganiser la membrane cytoplasmique. Les substrats de ces pompes d'efflux de *P. aeruginosa*, comprennent de nombreux antibiotiques comme les β -lactamines, les aminosides ou encore les fluoroquinolones. *P. aeruginosa* utilise les pompes d'efflux RND (resistance nodulation-cell division) comme principaux acteurs d'efflux d'antibiotiques dont quatre sont pertinentes cliniquement par leur contribution à la virulence, au quorum sensing et la résistance aux antibiotiques : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM^[37].

Le troisième mécanisme consiste en la production d'enzymes inductibles capables d'inactiver certains antibiotiques. *P. aeruginosa*, possède des β -lactamases chromosomiques comme notamment l'AmpC, qui comme leurs noms l'indiquent, hydrolysent certaines β -lactamines^[38] (Figure 12).

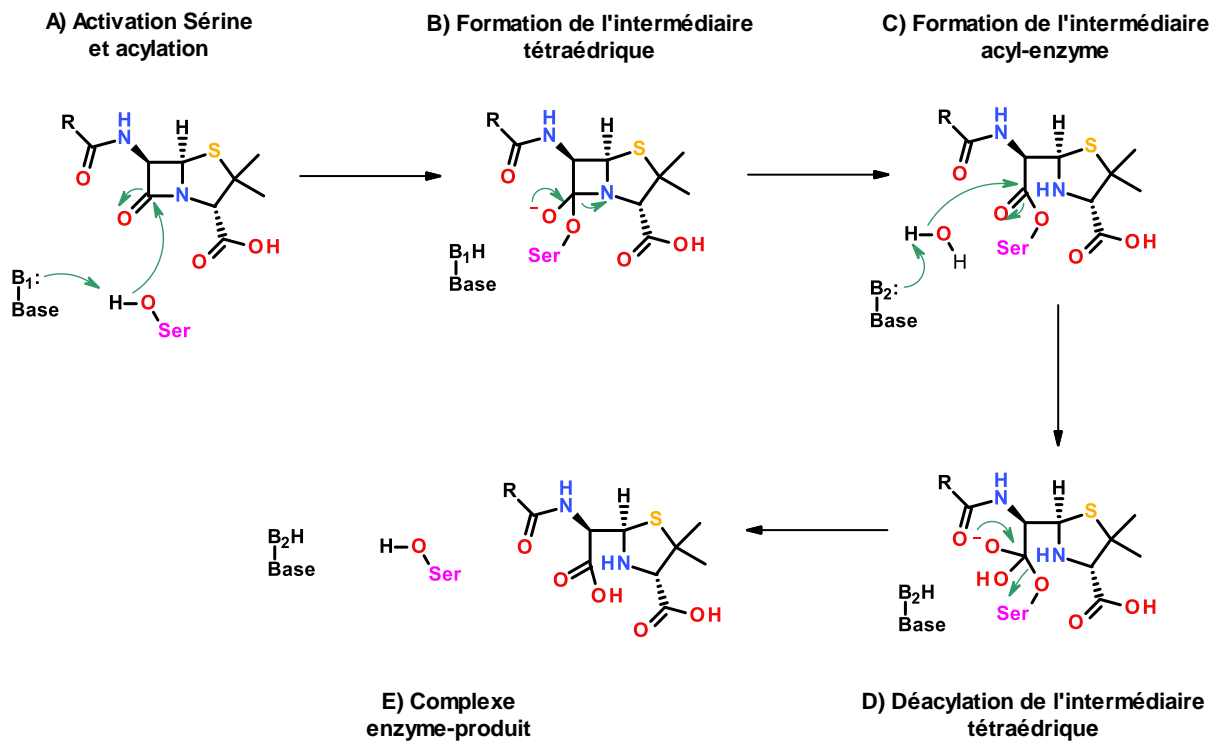


Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme d'hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases à sérine, adaptée de Tooke *et al.*^[38]

- Acquis

La résistance acquise est la conséquence de gains de fonction, soit via des mutations ou soit via un transfert horizontal de gènes de résistance.

Le premier mécanisme acquis issu d'un transfert horizontal de gènes consiste en l'acquisition de β -lactamases ; *P. aeruginosa* étant l'un des pathogènes possédants la plus grande diversité de β -lactamases acquises^[39]. Par exemple, cette bactérie peut acquérir des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) comme KPC, TEM et OXA, et des métallo- β -lactamases comme IMP, VIM et NDM ; celles-ci conférant une résistance plus importante aux β -lactamines comparée à la céphalosporinases AmpC. Comme leur nom l'indique, les métallo- β -lactamases utilisent un ou deux atomes de zinc dans leurs sites actifs pour catalyser l'hydrolyse des β -lactamines, contrairement aux β -lactamases qui, elles, utilisent une sérine.

Un autre mécanisme provenant d'un transfert horizontal de gènes est l'acquisition d'enzymes capables de modifier la structure chimique des aminosides, notamment au niveau des groupements hydroxyles et amines, conduisant à une diminution de l'affinité de ces antibiotiques pour leur cible^[40]. Parmi celles-ci, on retrouve des *N*-

acétyltransférases, des O-nucléotidyltransférases et des O-phosphoryltransférases (Figure 13).

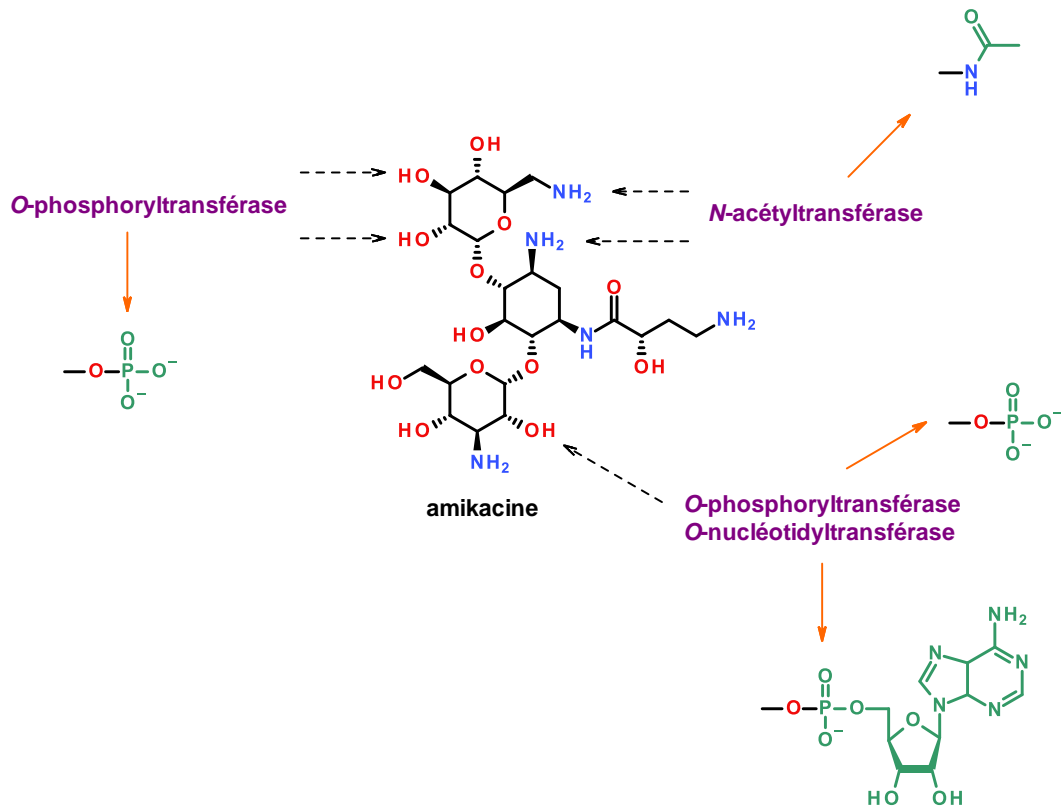


Figure 13 : Représentation schématique de l'action des enzymes modifiant les aminosides (amikacine), adaptée de Becker *et al.*^[40]

Cette résistance peut être également acquise suite à des mutations *de novo*, entraînant des modifications des porines ou des cibles de certains antibiotiques, la surexpression de pompes d'efflux et de β -lactamases. Par exemple, des mutations d'OprD et de l'ADN gyrase chez *P. aeruginosa* confèrent une résistance aux carbapénèmes et aux quinolones, respectivement^[41,42].

- Adaptative

La résistance adaptative résulte de mécanismes qui sont induits par des stimuli extérieurs. Elle implique souvent des voies de régulation et conduit à une modification de l'expression de gènes, des changements dans la synthèse de protéines, et des altérations des cibles des antibiotiques^[43]. Contrairement à la résistance acquise, elle est transitoire et instable. En effet, elle n'est pas permanente et devient « inactive » lorsqu'on supprime l'élément déclencheur. Chez *P. aeruginosa*, la production de biofilm est la stratégie la plus importante pour acquérir une résistance adaptative aux antibiotiques^[44].

Ainsi, *P. aeruginosa* dispose d'un arsenal important pour devenir résistante aux antibiotiques, et nous ne connaissons probablement la partie émergée de l'iceberg. Face à cette bactérie hautement menaçante pour l'espèce humaine, de nouvelles stratégies ont été récemment décrites pour lutter contre ce fléau dont une qui consiste à cibler la virulence, notamment face à son implication dans la pathogenèse et la résistance^[5,6,45]. En effet, celle-ci semble prometteuse puisqu'elle consiste à neutraliser un ou plusieurs facteurs de virulence et non à éliminer la bactérie, ce qui permet de diminuer la pression sélective et ainsi le risque d'apparition de résistance. Chez *P. aeruginosa*, l'élastase LasB est considéré comme l'un des acteurs clés du processus de virulence et apparaît donc comme une cible thérapeutique de choix^[46].

II) L'élastase LasB : une cible attractive pour lutter contre *P. aeruginosa*

1. Production et régulation

L'élastase LasB, ou pseudolysine, est une métalloprotéase (cofacteurs Zn^{2+}/Ca^{2+}) extracellulaire sécrétée par *P. aeruginosa* qui appartient au groupe des thermolysines (M4). Elle est produite sous forme d'une préproélastase composée de trois domaines peptidiques : un prépeptide N-terminal (prépeptide signal, acide aminé 1-23), un propeptide (acide aminé 24-197) qui sert de chaperon intramoléculaire pour le domaine C-terminal (acide aminé 198-498), qui code pour l'élastase mature (33 kDa)^[46] (Figure 14).

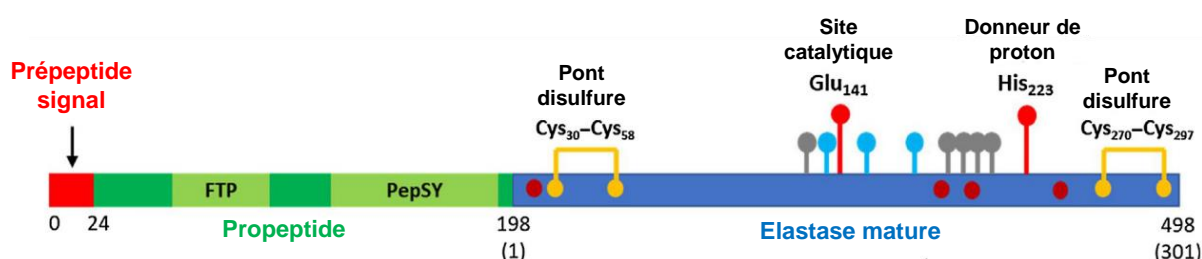


Figure 14 : Représentation schématique de la préproélastase, adaptée d'Everett *et al.*^[46]. Le prépeptide N-terminal est représenté en rouge, le propeptide en vert avec les sous-domaines chaperon (FTP) et inhibiteur d'élastase (PepSY), et l'élastase mature en bleu. Les résidus lysine soumis à une modification post-traductionnelle sont représentés par des points rouge foncés, les positions des cystéines impliquées dans les deux ponts disulfures sont représentées par des points jaunes. Les sites de liaison au calcium sont représentés en gris, les sites de liaison au zinc en bleu turquoise, et les sites catalytique et donneur de proton en rouge.

Comme décrit précédemment, la régulation de l'expression de LasB est sous le contrôle du système QS (Figure 2). Situé au sommet du système QS de *P. aeruginosa*, LasR est capable d'activer les trois autres voies (IqsR, PqsR et RhIR) et pourrait représenter une cible prometteuse. Cependant, ces systèmes communiquent et ont la capacité de s'activer mutuellement et peuvent donc contrecarrer l'inhibition de LasR. Par exemple, la production de LasB peut se faire par une deuxième voie directe : le réseau RhIR-RhII (Figure 15). Ainsi, d'autres systèmes QS peuvent indirectement induire l'expression de LasB, comme IqsR et PqsR, IqsR régulant PqsR qui, à son tour, régule RhIR (Figure 15).

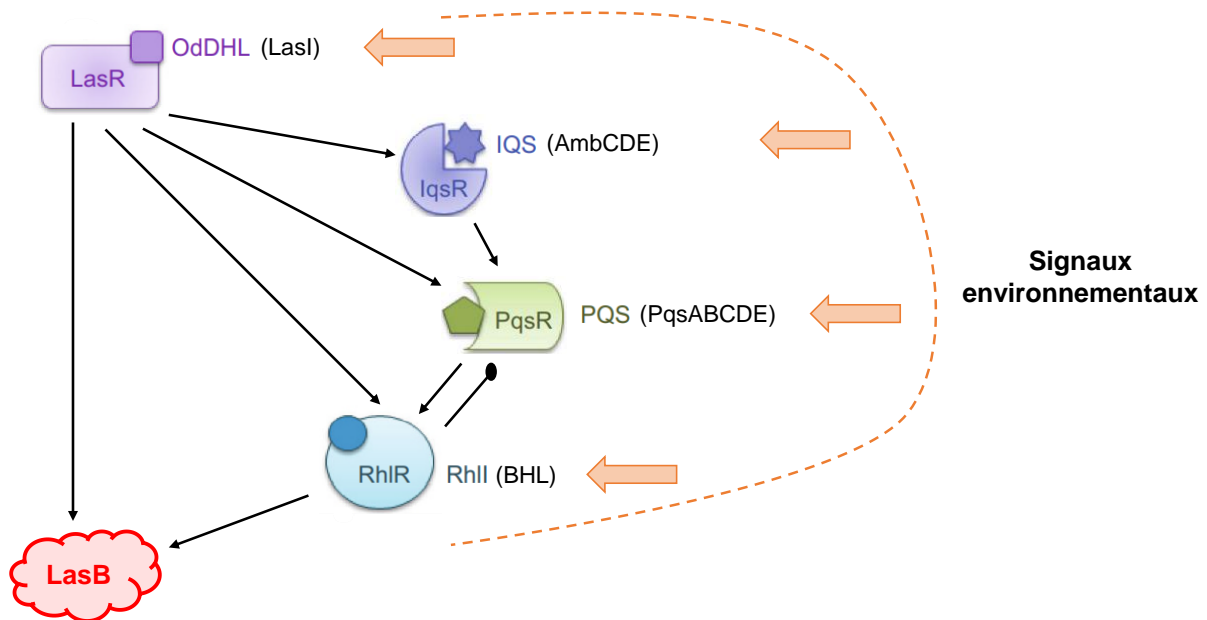


Figure 15 : Représentation schématique de la régulation de l'expression de LasB, adaptée d'Everett *et al.*^[46]

2. Structure, activités et rôles biologiques

a) Structure

La structure tertiaire de LasB, résolue par Thayer et ses collègues en 1991^[47], est très proche de celle de la thermolysine ; d'où son appartenance au groupe M4. Elle dispose d'un atome de zinc et un atome de calcium qui sont essentiels pour son activité et sa stabilité. Le site actif est recouvert de deux hélices qui fournissent les résidus liant le zinc (His140, His144 et Glu164). Ainsi, le zinc adopte une conformation tétraédrique via ces trois résidus et notamment grâce à une interaction supplémentaire avec une molécule d'eau ou un ligand (Figure 16A). Le site actif est composé de deux poches, S1' et S2'. Comme elle contient l'atome de zinc et les trois résidus qui le lient, la poche S1' est présentée comme la poche principale d'interaction. Même si sa partie externe, proche du zinc, est hydrophile, elle est en grande partie de nature lipophile grâce à la présence de résidus aliphatiques (Leu132, Ile186 et Ile190) qui la bordent. Elle dispose également d'une sous-poche étroite mais profonde. Concernant la poche S2', elle est plus large que S1' mais est plutôt externe^[48] (Figure 16B).

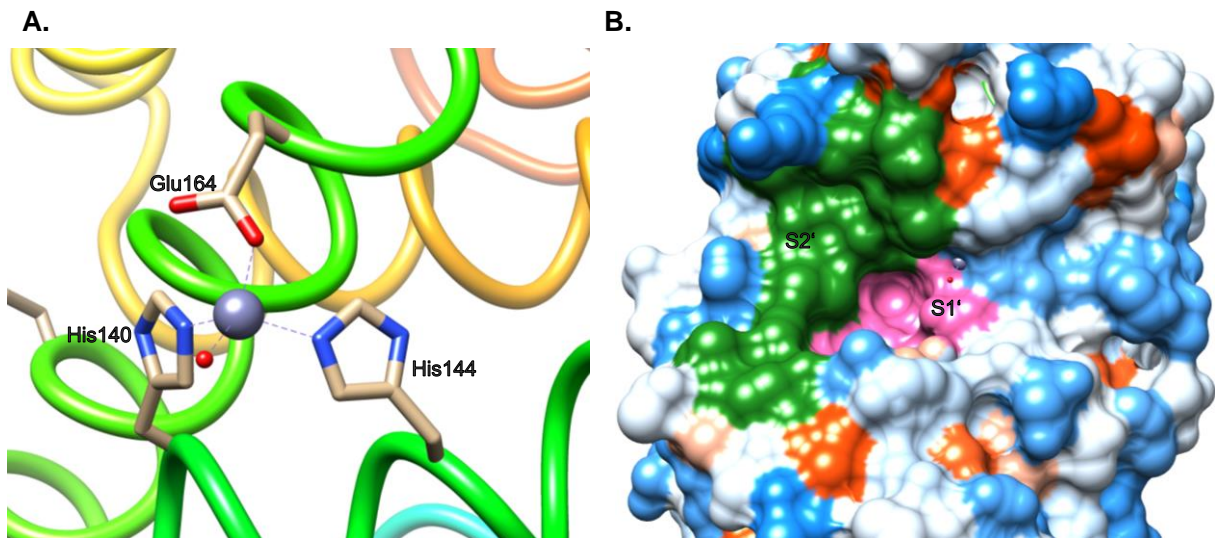


Figure 16 : Description structurale du site actif de LasB, issue de Camberlein *et al.*^[48] (PDB : 1EZM). (A) Coordination tétraédrique de l'atome de zinc (boule grise) par les résidus His140, His144, Glu164 et une molécule d'eau (boule rouge). (B) Visualisation des surfaces des poches S1' (rose) et S2' (vert).

b) Mécanisme catalytique

LasB est un acteur pivot du processus de virulence chez *P. aeruginosa* par sa capacité à cliver un spectre très large de substrats^[46]. Ces derniers sont clivés selon le mécanisme catalytique présenté sur la figure ci-dessous (Figure 17). L'acide carboxylique d'un résidu aspartate se lie à la molécule d'eau par des interactions de liaison hydrogène et l'active (A), facilitant son attaque nucléophile sur le groupe amide du substrat (B). Cette attaque conduit à la formation d'un intermédiaire oxyanionique, stabilisé par la coordination du zinc (C). À la suite d'un réarrangement protonique, cet intermédiaire est dégradé (D), ce qui régénère l'enzyme à l'état fondamental et libère l'amine et l'acide carboxylique de la liaison amide, conduisant à l'inactivation du substrat (E) ^[46].

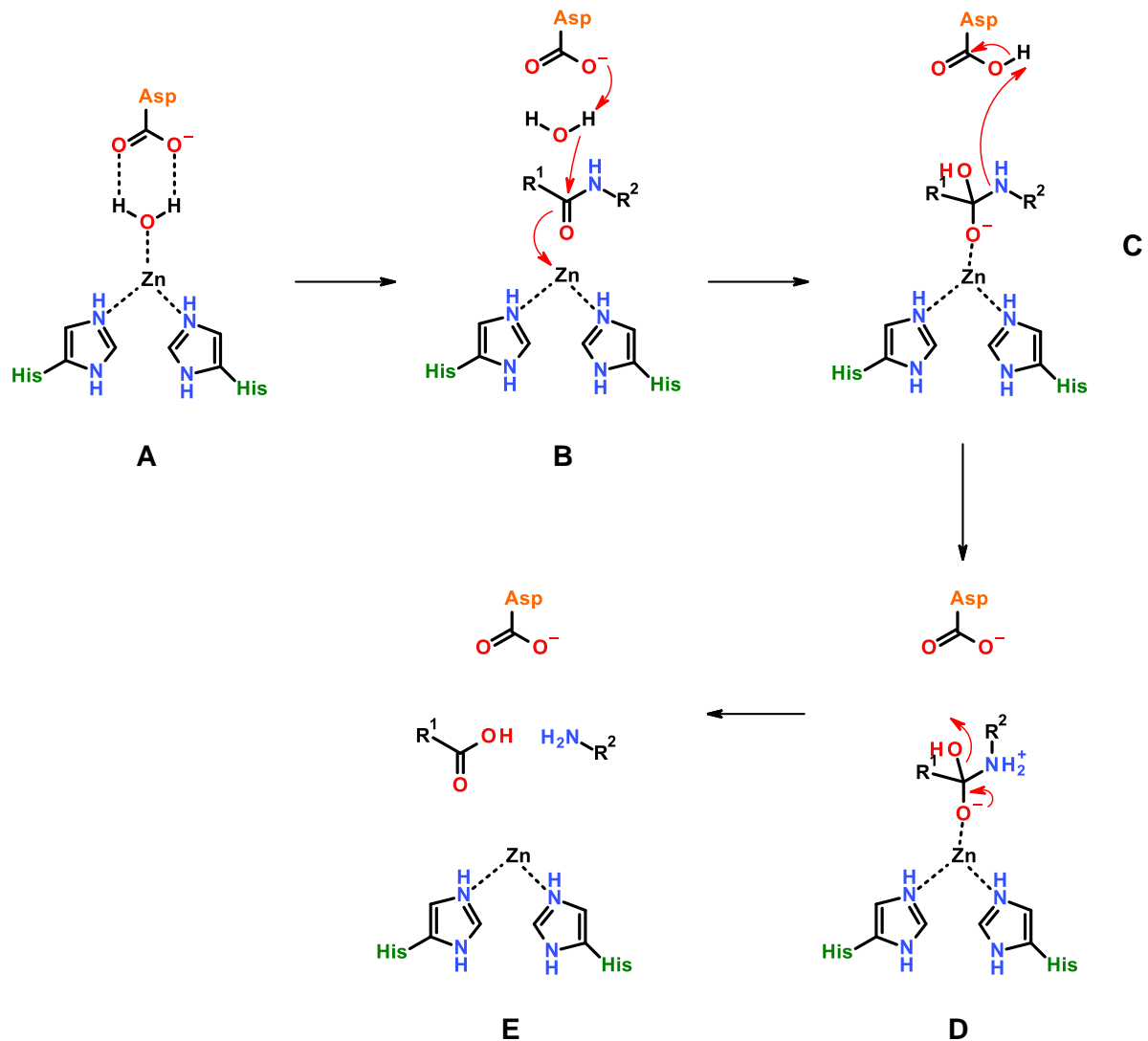


Figure 17 : Mécanisme catalytique hypothétique d'hydrolyse de substrats par LasB, adaptée d'Everett *et al.*^[46]

c) Substrats clivés par LasB

Au sein de son hôte, *P. aeruginosa* est capable de cliver, par l'intermédiaire de LasB, trois catégories de substrats : des composants structuraux, des composants du système immunitaire et d'autres composants.

- Composants structuraux

L'endommagement de composants structuraux par LasB favorise l'invasion et la colonisation de l'hôte. Cette enzyme a la capacité de dégrader trois éléments majeurs de la matrice extracellulaire : l'élastine, les collagènes III-IV et la laminine, conduisant à une lyse de la matrice et donc à la perte de l'intégrité des tissus^[49]. De plus, LasB peut cliver le complexe uPar-vitronectine et la VE-cadhérine qui

participent à l'adhésion cellulaire et à l'établissement des jonctions serrées, respectivement. Ceci aboutit donc à une perte de l'adhérence cellulaire et à une augmentation de la perméabilité épithéliale^[50,51].

- Composants du système immunitaire

En neutralisant de nombreux éléments du système immunitaire de l'hôte, LasB facilite l'échappement immunitaire. Premièrement, cette élastase dégrade certaines immunoglobulines (Ig) comme les IgA et les IgG, réduisant l'opsonisation et donc la phagocytose bactérienne^[52]. De plus, elle peut altérer l'immunité à médiation cellulaire (TNF- α et IFN- γ) et la réponse cellulaire (CD-4)^[53,54]. Deuxièmement, LasB participe à l'installation d'un terrain inflammatoire en activant l'interleukine IL-1 β ^[55]. En parallèle, certaines interleukines peuvent être inactivées par cette enzyme comme l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-8, aboutissant respectivement, à l'inhibition de la prolifération lymphocytaire, au blocage de la réparation des cellules épithéliales et à la perturbation du recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires (chimiotactisme des neutrophiles)^[56,57]. Ensuite, l'élastase a la faculté de cibler des éléments de l'immunité innée tels que le système du complément^[58], les collectines SP-A/SP-D du surfactant pulmonaire^[59,60] et le peptide antimicrobien LL-37^[61]. Enfin, elle perturbe l'élastase des neutrophiles humains (HNE) en ciblant l'antiprotéase α 1, qui lutte normalement contre la virulence bactérienne^[62].

- Autres composants

Parmi les autres éléments dégradés par LasB, on retrouve principalement des composants sanguins. Par exemple, elle clive l'hémoglobine, transferrine, la lactoferrine et l'hémoglobine, générant des radicaux libres et libérant du fer ; l'acquisition de fer étant favorable pour la croissance bactérienne^[63-65]. De plus, certains facteurs de la coagulation peuvent être neutralisés par LasB, conduisant à des hémorragies (fibrinogène et fibrine) et une inflammation (thrombine)^[66].

En parallèle du clivage des substrats de l'hôte, LasB a la faculté d'activer des composants bactériens. Par exemple, elle favorise l'invasion des cellules épithéliales via l'activation des exotoxines ExoS et ExoT^[67]. De plus, elle agit de concert avec AprA pour empêcher la reconnaissance immunitaire médiée par la flagelline^[68]. Enfin, elle est impliquée dans la formation de biofilm en activant la kinase Ndk ; cette

dernière étant essentielle pour l'initiation de la synthèse de l'alginate et l'expression d'un phénotype mucoïde^[69].

Ainsi, LasB joue un rôle crucial dans la pathogénèse en favorisant :

- l'invasion et la colonisation de l'hôte via le clivage d'éléments structuraux
- l'échappement immunitaire via le clivage d'éléments du système immunitaire
- la formation de biofilm via l'activation d'éléments bactériens

Afin d'établir un lien causal direct de l'activité LasB sur la virulence, différentes études sur des modèles animaux d'infections à *P. aeruginosa* ont été menées.

3. Impact de LasB sur la virulence dans des modèles animaux d'infection

Tout d'abord, le rôle de LasB dans un modèle d'infection pulmonaire aigüe a été étudié. Ainsi, il a été démontré qu'un mutant LasB était avirulent dans un modèle d'infection pulmonaire aigüe chez la souris^[70].

Lors de cette étude, les souris ont été séparées en trois groupes : les souris infectées par le mutant LasB et traitées avec une solution saline (Δ LasB, saline), les souris infectées par la souche PAO1 et traitées avec une solution saline (PAO1, saline) et les souris infectées par la souche PAO1 et traitées avec le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique), un inhibiteur de métalloprotéase à large spectre (PAO1, Ca-DTPA). De façon intéressante, les souris du groupe Δ LasB traitées avec une solution saline sont restées viables pendant cinq jours alors que les souris du groupe PAO1 traitées avec une solution saline sont mortes dans les cinq jours (Figure 18A). De plus, les souris du groupe PAO1 traitées avec le DTPA ont montré un taux de survie significativement plus élevé que les souris traitées avec une solution saline (PAO1, solution saline) (Figure 18A) ; ce qui démontre que l'inhibition de LasB peut conduire à la survie des souris. Les coupes de poumons des souris infectées par le mutant LasB présentaient une architecture pulmonaire normale après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (Figure 18B). Cependant, chez les souris infectées par la souche PAO1 et ne recevant pas de DTPA, une infiltration de cellules inflammatoires était visible. Cette réponse inflammatoire était moins visible chez les souris traitées au DTPA (Figure 18B).

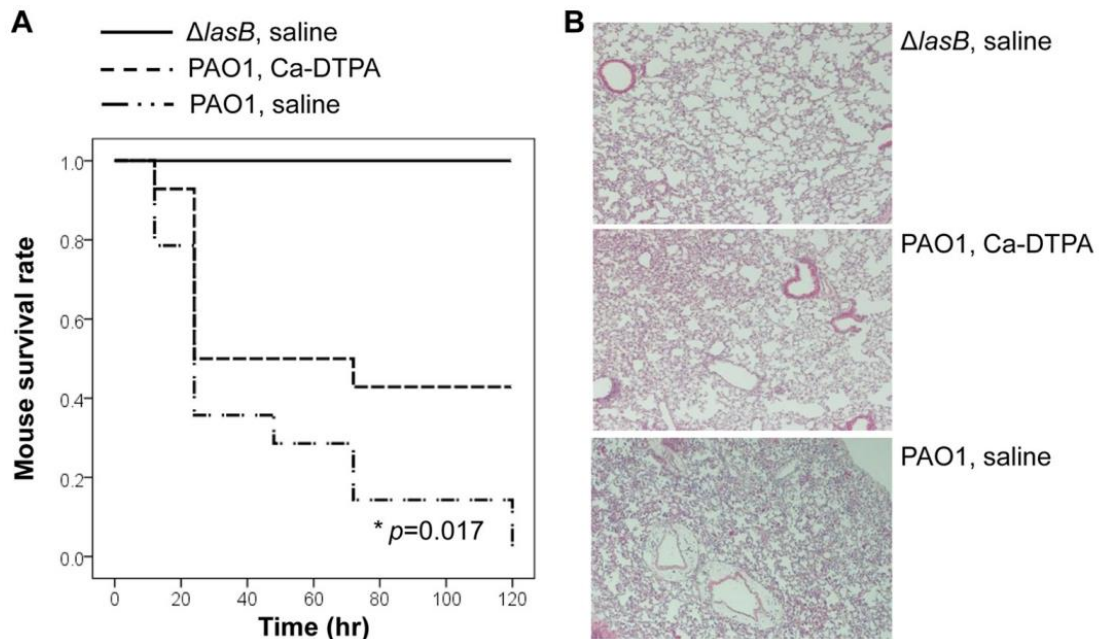


Figure 18 : (A) Diagramme de survie Kaplan-Meier de chaque groupe de souris. (B) Images représentatives du tissu pulmonaire de chaque groupe de souris, adaptés de Gi et al.^[70]

D'autre part, le rôle de LasB dans un modèle d'infection pulmonaire chronique a également été étudié, par l'intermédiaire de souches issues de patients atteints de mucoviscidose : PAO1, RP45 et RP43^[71].

Premièrement, l'activité élastolytique a été mesurée dans les différents groupes constitués : PAO1 wild-type (wt PAO1) et PAO1 Δ lasB, RP45 wt et RP45 Δ lasB, RP73 wt et RP73 Δ lasB, et un contrôle négatif correspondant à un milieu de croissance Luria-Bertani. De façon intéressante, pour les isolats PAO1 et RP45, l'activité élastolytique est diminuée dans les groupes mutants PAO1 Δ lasB et RP45 Δ lasB par rapport aux groupes wild-types qui, eux, possèdent une activité importante (Figure 19). Il est important de noter que pour le groupe RP73 wt, aucune activité élastase n'a été détectée ; ceci s'expliquant par le fait que la souche RP73 ne dispose pas d'une enzyme LasB fonctionnelle^[72].

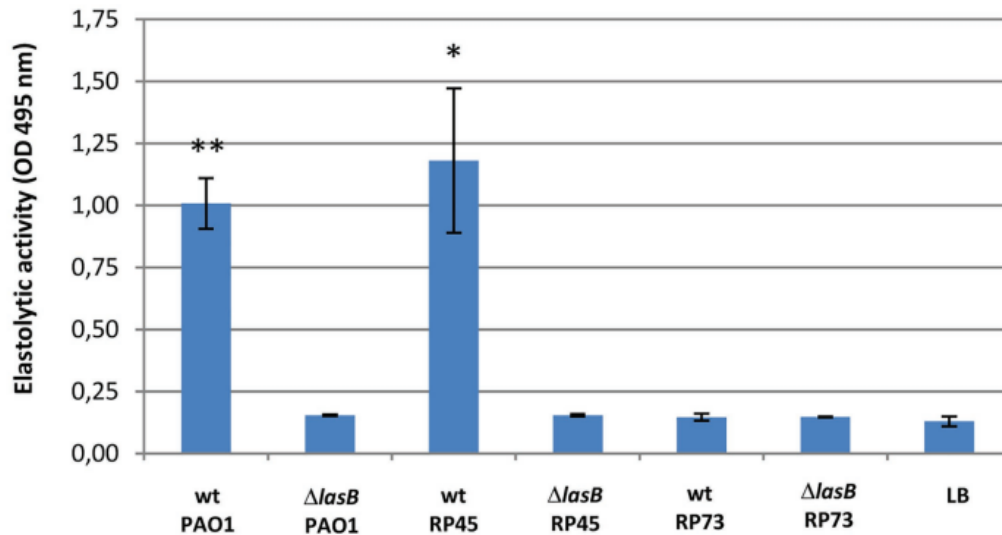


Figure 19 : Activité élastolytique de LasB dans les surnageants de culture de chaque groupe présenté précédemment, issue de Cigana *et al.*^[71]

Ensuite, les auteurs ont souhaité tester l'hypothèse selon laquelle LasB favoriserait la colonisation des poumons lors des infections chroniques à *P. aeruginosa*. Pour la souche RP45, au deuxième jour après l'infection, la charge bactérienne pulmonaire ne différait pas entre la souche RP45 wt et RP45 $\Delta lasB$. Cependant, au septième jour, la souche RP45 $\Delta lasB$ présentait des charges bactériennes pulmonaires significativement plus faibles que les souris RP45 wt (Figure 20A). Cette réduction de la charge bactérienne pulmonaire s'explique par une moindre virulence de la souche RP45 $\Delta lasB$ par rapport à la souche RP45 wt (Figure 20B), facilitant ainsi l'élimination par l'hôte.

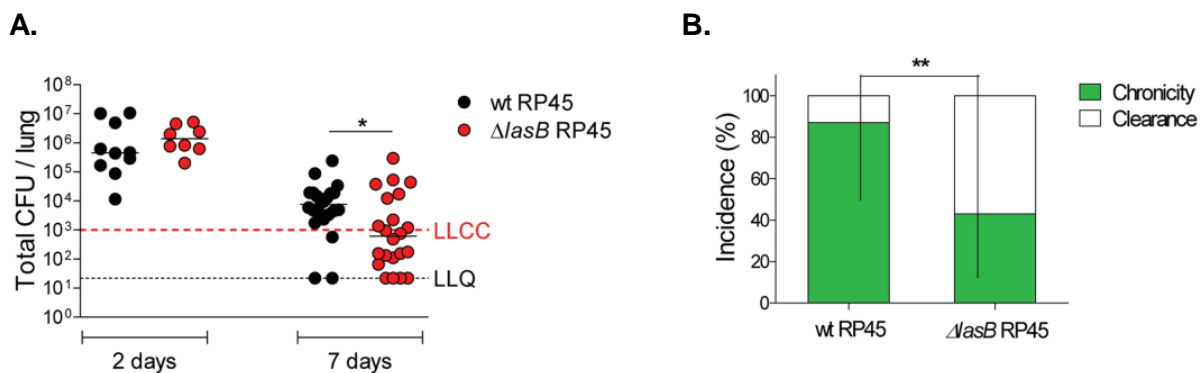


Figure 20 : (A) Mesure des CFU pulmonaires après deux et sept jours d'infection pour les isolats RP45 wt et RP45 $\Delta lasB$; LLCC (limite inférieure de la colonisation chronique) et LLQ (limite inférieure de la quantification) sont indiquées. (B) Incidence de la clairance et capacité à établir une infection chronique pour les isolats RP45 wt et RP45 $\Delta lasB$, issues de Cigana *et al.*^[71]

En ce qui concerne la souche RP73, isolée plus tardivement, la charge bactérienne pulmonaire était la même dans les groupes wild-type et mutant après sept jours (Figure 21A). Aucune différence dans l'incidence de la colonisation n'a été observée entre les deux groupes (Figure 21B), probablement en raison de l'absence d'activité élastolytique pour les souches RP73, comme décrit précédemment.

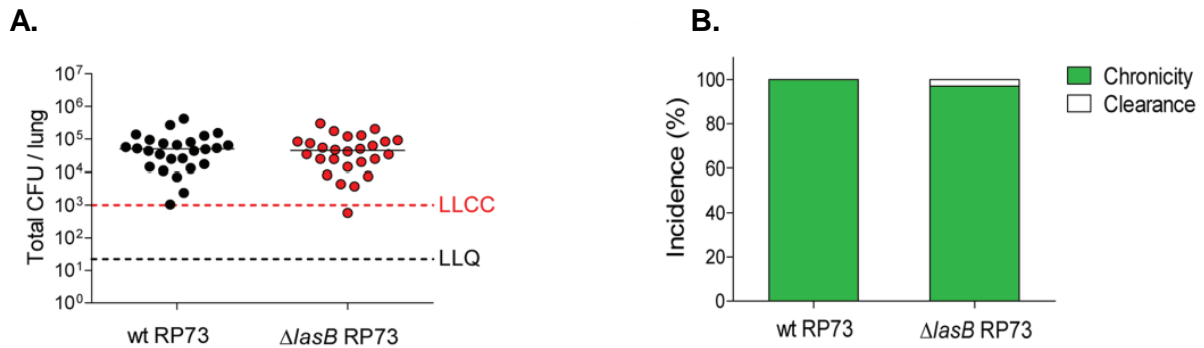


Figure 21 : (A) Mesure des CFU pulmonaires après deux et sept jours d'infection pour les isolats RP73 wt et RP73 Δ lasB ; LLCC (limite inférieure de la colonisation chronique) et LLQ (limite inférieure de la quantification) sont indiquées. (B) Incidence de la clairance et capacité à établir une infection chronique pour les isolats RP73 wt et RP73 Δ lasB, issues de Cigana et al.^[71]

Enfin, les auteurs se sont intéressés au rôle de LasB dans l'inflammation. Ainsi, ils ont mesuré les niveaux de plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance dans les surnageants d'homogénats pulmonaires des souris infectées par des souches RP45 wt ou RP45 Δ lasB, après sept jours d'infection. La délétion de LasB a entraîné une augmentation significative des niveaux d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-3, d'IL-12p70, d'IL-17A, d'éotaxine, de facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF), de protéine inflammatoire des macrophages (MIP-1 α , MIP-1 β et de RANTES) par rapport à la souche wild type (Tableau 4). Ceci indique que LasB est capable de moduler le système immunitaire, soit par dégradation directe des médiateurs ou soit par diminution indirecte de leur production, et par conséquent dispose d'un rôle important dans l'inflammation^[71].

Tableau 4 : Concentrations de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance après infection chronique par les souches RP45 wt et RP45 Δ lasB, issu de Cigana et al.^[71]

Cytokine/Chemokine	Concentration (mean pg/700 μ g lung protein \pm SEM)	
	wt RP45 strain	Δ lasB RP45 strain
IL-1 α	7,36 \pm 1,12	14,66 \pm 1,53***
IL-1 β	3,08 \pm 0,33	5,35 \pm 0,33****
IL-2	6,26 \pm 0,28	6,20 \pm 0,37
IL-3	0,92 \pm 0,05	1,11 \pm 0,05*
IL-4	0,52 \pm 0,03	0,60 \pm 0,04
IL-6	3,75 \pm 0,06	3,54 \pm 0,16
IL-9	18,47 \pm 0,51	19,78 \pm 0,69
IL-12p40	34,05 \pm 2,37	38,89 \pm 1,82
IL-12p70	18,21 \pm 1,19	24,71 \pm 1,42***
IL-17A	11,37 \pm 1,00	15,73 \pm 1,29*
Eotaxin	574,0 \pm 23,22	640,6 \pm 18,07*
G-CSF	10,36 \pm 0,95	21,10 \pm 2,00****
IFN- γ	20,59 \pm 0,80	22,29 \pm 0,43
KC	63,71 \pm 5,08	73,22 \pm 6,69
MCP-1	169,0 \pm 11,38	169,9 \pm 6,84
MIP-1 α	14,64 \pm 2,45	40,57 \pm 4,21****
MIP-1 β	36,08 \pm 3,80	76,55 \pm 7,44****
RANTES	248,0 \pm 21,83	392,4 \pm 40,96*
TNF- α	31,58 \pm 1,12	34,91 \pm 1,15

Ces études confirment que LasB est un acteur clé du processus de virulence. Comme vu précédemment, elle a la faculté d'induire des lésions tissulaires en dégradant des protéines structurales, favorisant ainsi la colonisation et donc la propagation des infections. De plus, cette enzyme peut neutraliser des médiateurs du système immunitaire, altérer la production de médiateurs de l'inflammation, ce qui facilite donc l'échappement au système immunitaire et l'évolution vers des infections chroniques. Enfin, LasB participe à la formation de biofilms, rendant l'élimination de *P. aeruginosa* très difficile et, par conséquent favorise la résistance aux antibiotiques.

De façon intéressante, elle a une localisation extracellulaire, ce qui ne requière pas de pénétrer les bactéries. Ainsi, tous ces arguments en font une cible thérapeutique prometteuse pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa*.

III) Les inhibiteurs de LasB décrits dans la littérature

Comme vu précédemment, LasB possède un cation zinc dans son site actif et y est dépendant pour le clivage de ses différents substrats. Ainsi, cibler ce cation via des petites molécules contenant un motif liant le zinc permettrait d'inhiber l'activité catalytique de LasB. Dans la littérature, différentes classes d'inhibiteurs ont été décrites ; ces dernières différant selon leur groupement liant le zinc^[48].

1. Les phosphoramidates

La première famille d'inhibiteurs de LasB découverte est celle des phosphoramidates dont la structure chimique est présentée ci-dessous (Figure 22).

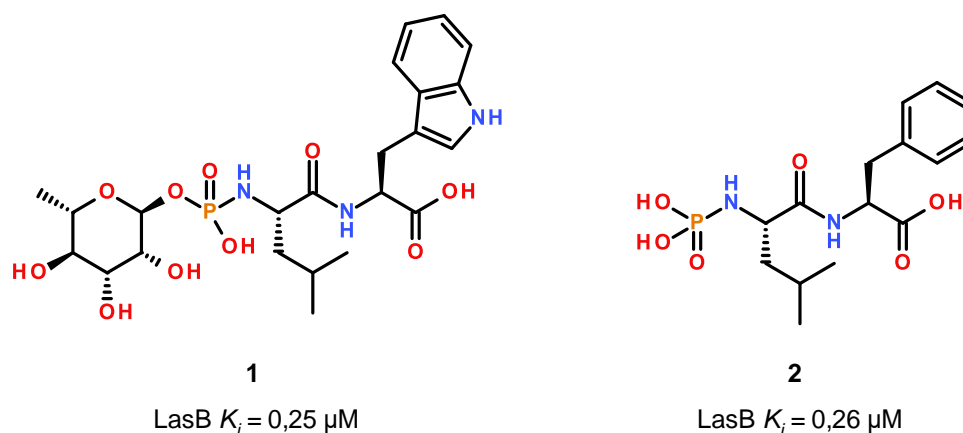
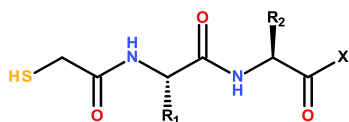


Figure 22 : Structures chimiques et activités biologiques du phosphoramidon 1 et de son analogue 2. Les valeurs des K_i ont été extraites de la publication originale^[73].

Concernant le mode de liaison du phosphoramidon (Figure 23), il chélate l'atome de zinc par l'intermédiaire de son phosphoryle et interagit avec trois résidus histidine via des liaisons hydrogènes (His140, His144 et His223). On retrouve également d'autres liaisons hydrogènes telles que celles entre le l'azote et l'hydroxyle du phosphoramidate avec une alanine (Ala113) glutamate (Glu141) respectivement, le carbonyle de l'acide carboxylique avec une asparagine (Asn112) et notamment une liaison hydrogène très importante entre le carbonyle de l'amide et un résidu arginine (Arg198) (Figure 23B, C). Le noyau indole occupe la poche S2' qui contient des acides aminés hydrophobes (Met128, Phe129, Leu197) alors que la chaîne isobutyle se loge partiellement dans une petite cavité hydrophobe de la poche S1' (Figure 23A, C).



- 3: R₁ = -2-methylpropyl, R₂ = -(phenyl)methyl, X = -OH, LasB K_i = 1,5 μM
 4: R₁ = -(phenyl)methyl, R₂ = -2-methylpropyl, X = -OH, LasB K_i = 0,2 μM
 5: R₁ = -(1*H*-indol-3-yl), R₂ = -2-methylpropyl, X = -NH₂, LasB K_i = 3,7 μM
 6: R₁ = -(1*H*-indol-3-yl), R₂ = -(phenyl)methyl, X = -NH₂, LasB K_i = 1,1 μM
 7: R₁ = -(1*H*-indol-3-yl), R₂ = -(4-hydroxyphenyl)methyl, X = -NH₂, LasB K_i = 0,04 μM
 8: R₁ = -(phenyl)methyl, R₂ = -(4-hydroxyphenyl)methyl, X = -NH₂, LasB K_i = 0,04 μM
 9: R₁ = -(1*H*-indol-3-yl), R₂ = -butan-2-yl, X = -NH₂, LasB K_i = 1,0 μM
 10: R₁ = -butan-2-yl, R₂ = -(4-hydroxyphenyl)methyl, X = -NH₂, LasB K_i = 2,1 μM

Figure 24 : Structures chimiques et activités biochimiques des thiols 3-10. Les valeurs de K_i ont été extraites des publications originales^[74–77].

L'utilisation d'un thiol comme groupement liant le zinc a diminué l'activité inhibitrice (composé **3**, K_i = 1,5 μM contre composé **2**, K_i = 0,26 μM). En revanche, l'inversion des chaînes latérales (groupement en R¹ et R²) a permis de retrouver l'activité biologique sur LasB et ainsi d'obtenir un inhibiteur équipotent au composé **2** (composé **4**, K_i = 0,2 μM). Il est intéressant de noter que la configuration des aminoacides constituant ces structures peptides est déterminante pour l'activité inhibitrice sur LasB. En effet, par exemple, l'analogue *D*-phénylalanine du composé **3** présente une activité 23 fois moins importante (K_i = 34 μM)^[74].

Ces travaux ont ensuite été continués avec pour objectifs d'explorer les poches S1' et S2'. Ainsi, Cathcart et ses collègues ont décidé d'introduire successivement les vingt acides aminés naturels en position P₁' (groupe R¹) et P₂' (groupe R²)^[75,76]. Les formules chimiques de six de ces analogues sont présentées dans ci-dessus (Figure 24, thiols **5–10**). Les inhibiteurs les plus puissants de cette famille de dipeptides contiennent un tryptophane ou une phénylalanine en position P₁' et une tyrosine en position P₂' (composés **7** et **8**, K_i = 0,04 μM). A titre de comparaison, le remplacement de la tyrosine en P₂' par une phénylalanine a conduit à une diminution significative de l'activité par un facteur 27 (composé **6**, K_i = 1,1 μM contre composé **7**, K_i = 0,04 μM) ; démontrant ainsi que la présence du phénol est crucial pour atteindre une activité de l'ordre du nanomolaire.

Enfin, les auteurs ont démontré que l'introduction d'acides aminés non aromatiques en position P₁' et P₂' était possible, mais ceci résultant en des inhibiteurs moins actifs (composé **5**, **9** et **10**, K_i = 3,7, 1,0 et 2,1 μM, respectivement).

Des études de docking concernant cette famille de thiols ont été menées dans le but d'essayer d'élucider le mode de liaison de ces derniers à LasB^[48,78]. D'après celles-ci, il semblerait le groupement benzyle du composé **8** (groupe R¹) se loge au sein de

la poche S1' tandis que le phénol (groupe R²) occupe la poche S2' (Figure 25A, C). De plus, on retrouve les mêmes liaisons hydrogènes impliquées dans la liaison du phosphoramidon à LasB : le carbonyle de l'amide avec l'arginine 198, l'azote de l'amide avec l'alanine 113, le carbonyle en position C-terminale avec l'asparagine 112 (Figure 25B, C). Cependant, malgré un mode de liaison proche de celui de phosphoramidon, la partie phénolique du composé **8** semble être trop éloignée du glutamate 111 pour établir une liaison hydrogène avec ce résidu.

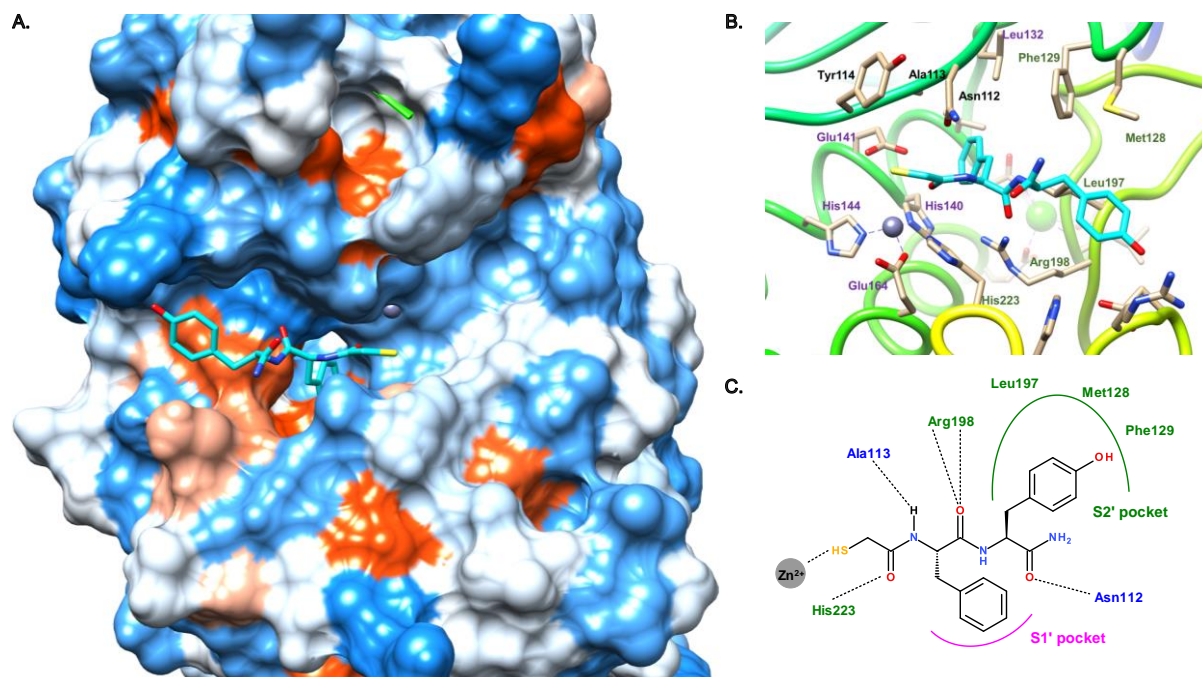


Figure 25 : Simulations du mode de liaison du composé **8 à LasB (à l'aide de la PDB 3DBK) via Chimera 1.15, issue de Camberlein *et al.*^[48]. (A) Vue d'ensemble du site actif de LasB en mode surface accommodant le thiol **8** (bleu), visualisée à l'aide de Chimera 1.15. Le cation zinc est représenté par une sphère grise. (B) Vue d'ensemble du site actif de LasB avec **8** (bleu) et les résidus impliqués (beige) dans la liaison, visualisée à l'aide de Chimera 1.15. (C) Représentation schématique bidimensionnelle du mode de liaison. Les interactions clés sont représentées par des tirets, le cation zinc par une sphère grise, les résidus clés appartenant à la poche S1' et S2' en rose et vert respectivement, les autres résidus en bleu.**

Un tripeptide SH-CH₂-(DL)Leu-Phe-Ala-NH₂, connu comme un inhibiteur puissant de collagénases de mammifères, a également démontré une activité inhibitrice submicrolaire sur LasB ($K_i = 0,3 \mu\text{M}$), indiquant donc que la taille du peptide n'a pas d'influence significative sur l'activité inhibitrice^[77]. En conclusion, ces études ont contribué à découvrir la spécificité des poches S1' et S2' : S1' a une préférence pour les chaînes latérales aromatiques volumineuses alors que S2' a la capacité de tolérer un spectre plus étendu de résidus (Ile, Phe, Leu, Val, Gln, Arg, Lys, Asp, Thr et Tyr), mais avec une préférence pour les résidus hydrophobes volumineux.

Ainsi, des études supplémentaires comme par exemple concernant la toxicité et la sélectivité sont nécessaires afin de considérer ces composés comme de futurs candidats médicaments.

b) Non peptidiques

Quelques années plus tard, deux nouvelles familles de thiols ont été décrites dans la littérature ; celles-ci s'articulant autour de noyaux *N*-aryle mercaptoacetamide (composés **11–13**) et *N*-aryle mercaptosuccinimide (composé **14**) (Figure 26). La première famille mentionnée a été découverte à la suite d'un screening d'une librairie ciblée d'inhibiteurs de métalloprotéases^[79]. Suite à ce criblage, des études de relation structure-activité ont conduit au composé **11** qui possède une activité inhibitrice modérée sur LasB ($Cl_{50} = 6,6 \mu M$).

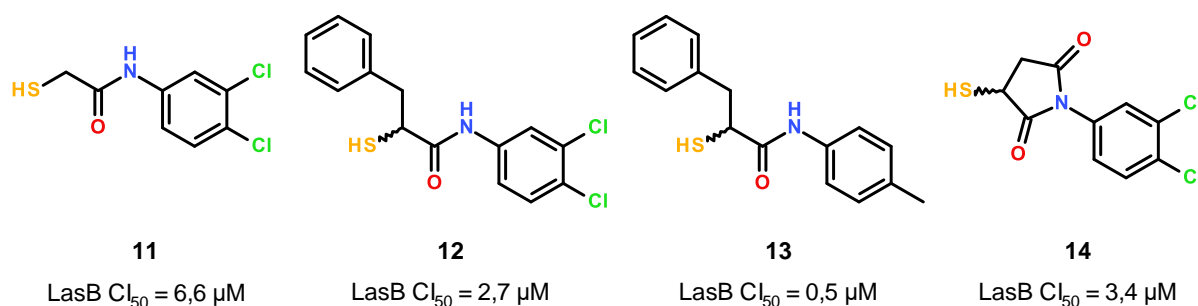


Figure 26 : Structures chimiques et activités inhibitrices des thiols 11–14. Les valeurs de Cl_{50} ont été extraites des publications originales^[79–81].

De plus, cet inhibiteur **11** a été co-cristallisé avec LasB par l'équipe du Pr. Hirsch, permettant ainsi de comprendre son mode de liaison (Figure 27). De façon surprenante, deux molécules antiparallèles de **11** ont été retrouvées au sein du site actif de LasB. Concernant le mode de liaison « attendu » (molécule **11a**, en vert, Figure 27A, B), le thiol chélate l'atome de zinc et interagit avec l'histidine 223 par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène. On retrouve également une liaison hydrogène entre cet aminoacide et l'atome d'azote de l'amide de **11**. Le noyau aromatique semble occupé la poche S1' via le phényle et partiellement S2' via le motif di-chloro. Comme vu précédemment avec les dipeptides, une liaison hydrogène de forte intensité, bidendate, s'établit entre l'arginine 198 et le carbonyle de l'amide de **11**. L'absence d'occupation suffisante de la poche S2' justifie l'activité biologique modérée de cet inhibiteur. En parallèle, pour le mode de liaison « inattendu » (molécule **11b**, en bleu, Figure 27A, B), le thiol ne cible pas le zinc. Ce dernier lie le

site actif via une liaison hydrogène entre l'atome d'azote de l'amide de **11** et l'asparagine 112 ; la poche S1' accueillant le motif dichlorophényle.

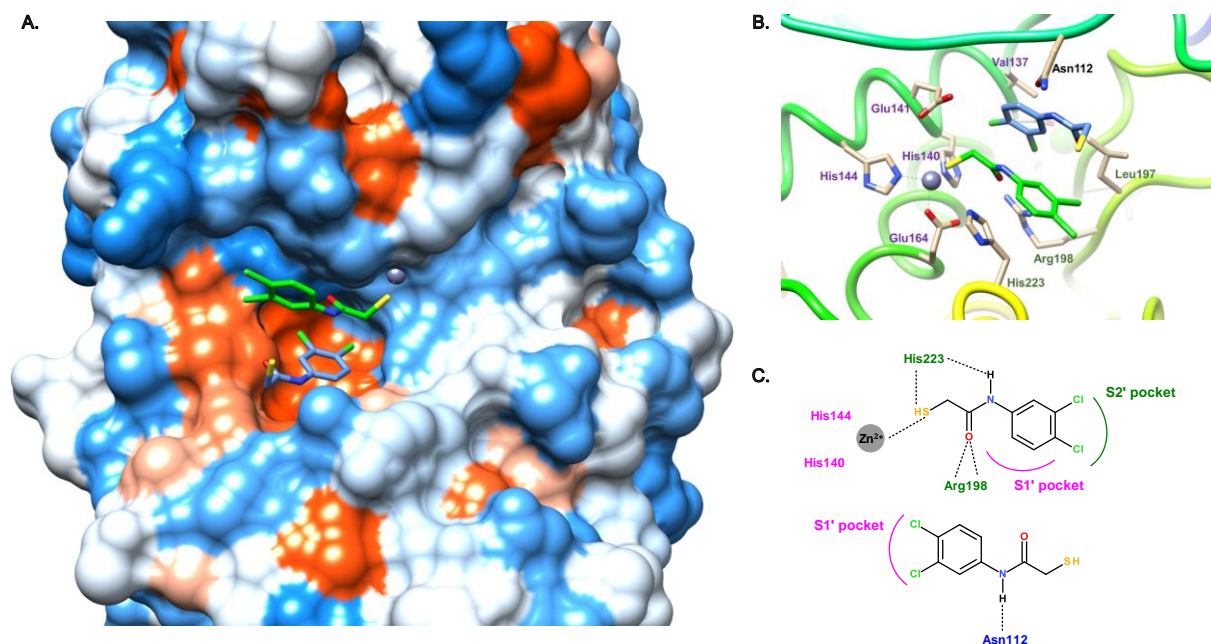


Figure 27 : Mode de liaison du thiol **11** (PDB : 6F8B), issu de Camberlein *et al.*^[48]. (A) Vue d'ensemble du site actif de LasB en mode surface accommodant **11a** (vert) et **11b** (bleu foncé), visualisée à l'aide de Chimera 1.15. Le cation zinc est représenté par une sphère grise. (B) Vue d'ensemble du site actif de LasB avec **11a** (vert) et **11b** (bleu foncé) et les résidus impliqués (beige) dans la liaison, visualisée à l'aide de Chimera 1.15. (C) Représentations schématiques bidimensionnelles du mode de liaison de **11a** (en haut) et **11b** (en bas). Les interactions clés sont représentées par des tirets, le cation zinc par une sphère grise, les résidus clés appartenant à la poche S1' et S2' en rose et vert respectivement, les autres résidus en bleu.

Dans l'objectif de cibler les poches S1' et S2', l'équipe du Pr. Hirsch a essayé de « fusionner » les molécules **11a** et **11b** via l'introduction de groupement aryles et aliphatiques sur l'azote de l'amide. Mais, cette modification n'a pas eu l'effet escompté puisqu'elle a conduit à une diminution des Cl_{50} ^[79]. En revanche, de façon intéressante, la substitution en position α de l'amide par un benzyle a abouti à une légère augmentation de l'activité (composé **12**, $Cl_{50} = 2,7 \mu M$). Cette augmentation étant plus accrue lorsque le motif 3,4-dichloro fut remplacé par un 4-méthyle (composé **13**, $Cl_{50} = 0,5 \mu M$)^[81]. Ainsi, ce gain significatif d'activité s'explique par le fait que ce noyau benzyle en α occupe la poche S1' et est stabilisée par des interactions hydrophobes notamment avec la leucine 197, pendant que le groupement *N*-aryle s'insère suffisamment la poche S2' (Figure 28).

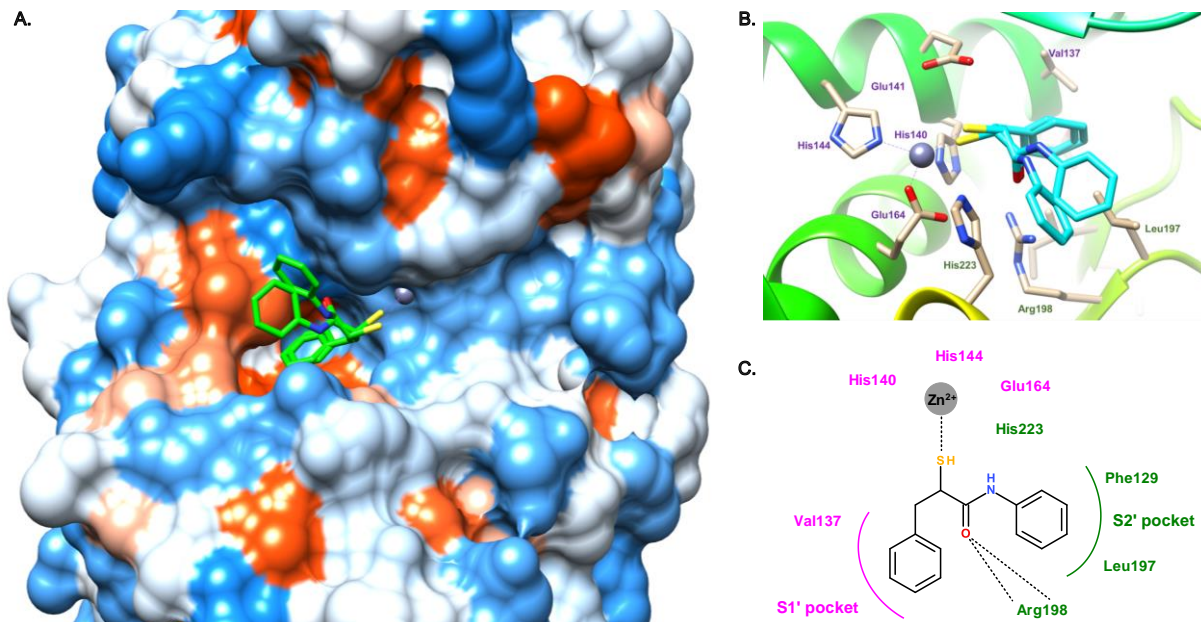


Figure 28 : Mode de liaison de l'analogue déhalogéné du thiol **12** (PDB : 7OC7), issu de Camberlein *et al.*^[48]. (A) Vue d'ensemble du site actif de LasB en mode surface accueillant l'analogue de **12** (vert, deux conformations), visualisée à l'aide de Chimera 1.15. Le cation zinc est représenté par une sphère grise. (B) Vue d'ensemble du site actif de LasB avec l'analogue de **12** (bleu) et les résidus impliqués (beige) dans la liaison, visualisée à l'aide de Chimera 1.15. (C) Représentation schématique bidimensionnelle du mode de liaison de l'analogue de **12**. Les interactions clés sont représentées par des tirets, le cation zinc par une sphère grise, les résidus clés appartenant à la poche S1' et S2' en rose et vert respectivement, les autres résidus en bleu.

En parallèle, les auteurs ont également développé une troisième famille, constituée d'un noyau *N*-aryle mercaptosuccinimide (composé **14**), dans le but de limiter la flexibilité et donc de figer la conformation active du composé **12**. Bien que cette modification n'ait pas permis d'augmenter l'activité, elle a contribué à réduire significativement la toxicité *in vivo* dans un modèle d'embryon de poissons zèbres ; **14** présentant une concentration maximale tolérée trois fois plus élevée que **11** (30 μM pour **14** contre 10 μM pour **11**).

Ainsi, face au potentiel du composé **13**, son efficacité dans un modèle *in vivo* utilisant des larves *Galleria mellonella* a été mesurée (Figure 29). Dans cette expérience, le taux de survie des larves est analysé après que celles-ci aient reçues le surnageant de la souche PA-14 (PA14 s.n.) et aient été traitées ou non avec un inhibiteur, ici **12** et **13**. Le surnageant a réduit la survie des larves d'environ 90% après trois jours d'incubation. En revanche, le traitement des larves par le thiol **13** a permis d'augmenter la survie de ces dernières jusqu'à 60% ; démontrant donc le potentiel de ce composé dans un modèle d'infection *in vivo*.

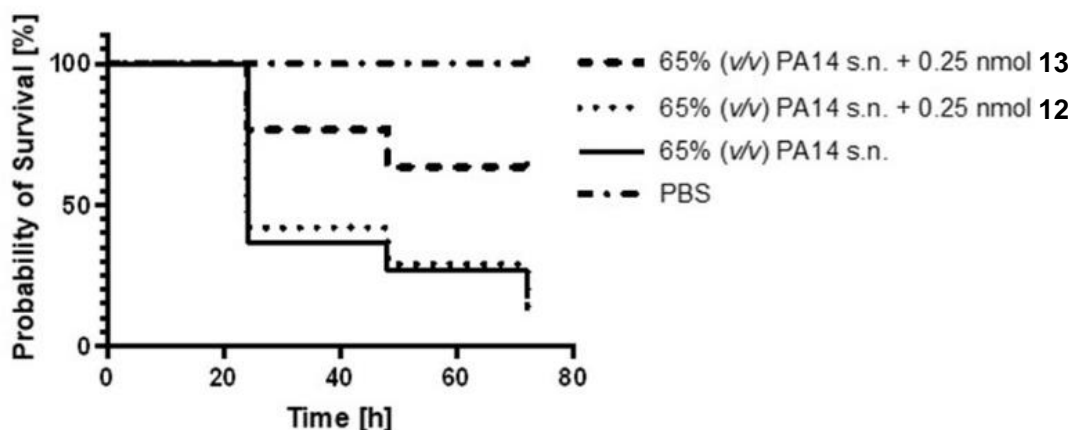


Figure 29 : Analyse Kaplan-Meiers de la survie des larves *Galleria mellonella* infectées par PA14 et traitées avec 12 (deux tirets) ou 13 (pointillé) ou non (trait plein), issue de Kaya et al.^[81]. Le PBS est utilisé comme contrôle négatif (tiret).

Malheureusement, l'utilisation de **13** en thérapeutique est limitée en raison de son profil de sélectivité et de sa stabilité ; ce dernier disposant d'une activité résiduelle micromolaire sur TACE ($CI_{50} = 2,2 \mu M$), et les thiols sont sensibles à l'oxydation^[81].

3. Les acides hydroxamiques

Compte tenu de leur capacité à coordonner fortement le cation zinc, de façon bidentate, des inhibiteurs contenant un hydroxamate comme groupement liant le zinc ont été développés (Figure 30).

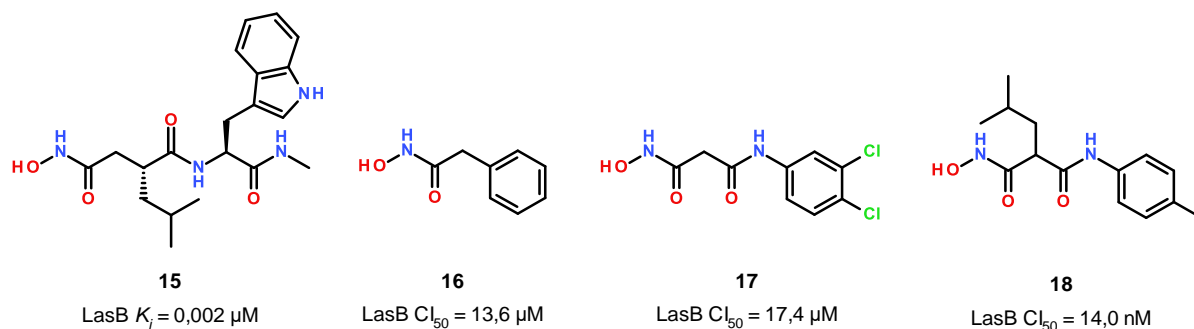


Figure 30 : Structures chimiques et activités inhibitrices des hydroxamates **15–18**. Les valeurs des K_i et CI_{50} ont été extraites des publications originales^[82–85].

Le premier acide hydroxamique (**15**) reporté dans littérature est articulé autour d'un dipeptide et dérivé du phosphoramidon. Il s'agit d'un inhibiteur très puissant, avec une activité de l'ordre du nanomolaire ($K_i = 2 nM$). Malheureusement, ce dernier n'a pas été co-cristallisé avec LasB afin d'établir son mode de liaison. De plus, les études de simulation réalisées n'ont pas non plus permis de mettre en évidence un

mode de liaison cohérent^[48]. Cependant, face à son analogie avec le phosphoramidon, diverses hypothèses peuvent être avancées et notamment l'occupation de S1' par la chaîne isobutyle de la leucine et de S2' par le noyau indole du tryptophane^[48].

En parallèle, une autre famille de petits hydroxamates a été découverte (inhibiteur **16**, $Cl_{50} = 13,6 \mu M$). Bien que ces derniers présentent une activité micromolaire in vitro, ils n'ont pas démontré d'effet dans différents modèles d'études d'infection, probablement à cause de leur instabilité^[83].

Plus récemment, avec pour objectif de remplacer le groupement thiol et le problème d'oxydation, Hirsch et ses collègues ont mis au point un hydroxamate construit autour d'un squelette malonique (composé **17**)^[84]. Cette modulation n'a pas permis d'améliorer l'activité, conduisant même à une diminution de celle-ci d'un facteur 2,6 (hydroxamate **17**, $Cl_{50} = 17,4 \mu M$ vs thiol **11**, $Cl_{50} = 6,6 \mu M$). Ceci s'explique par le mode de liaison de **17** à LasB. En effet, bien que la coordination du zinc par l'hydroxamate soit plus forte que celle du thiol, la liaison hydrogène clef bidendate, impliquant l'arginine 198 ne participe pas à la fixation de l'inhibiteur **17** dans le site actif (Figure 31B, C). On retrouve d'autres liaisons hydrogène comme celle entre l'azote de l'amide avec l'alanine 113 et une entre l'hydroxyle de l'hydroxamate avec un résidu glutamate (Glu141) ; ces deux liaisons ne participant pas à la liaison du thiol **11**. Enfin, le composé **17** ne lie pas la poche S1' puisque le motif dichlorophényle s'insère dans S2' (Figure 31A, C).

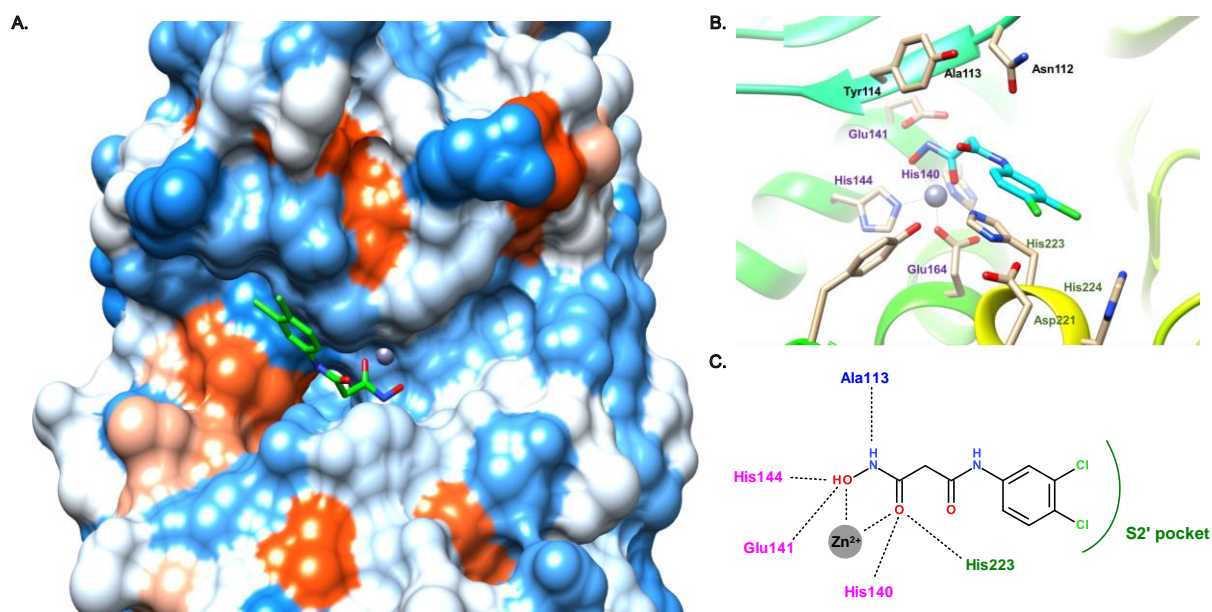


Figure 31 : Mode de liaison de **17** (PDB : 6FZX), adapté de Camberlein *et al.*^[48]. (A) Vue d'ensemble du site actif de LasB en mode surface accueillant **17** (vert), visualisée à l'aide de Chimera 1.15. Le cation zinc est représenté par une sphère grise. (B) Vue d'ensemble du site

actif de LasB avec 17 (bleu) et les résidus impliqués (beige) dans la liaison, visualisée à l'aide de Chimera 1.15. (C) Représentation schématique bidimensionnelle du mode de liaison de 17. Les interactions clés sont représentées par des tirets, le cation zinc par une sphère grise, les résidus clés appartenant à la poche S1' et S2' en rose et vert respectivement, les autres résidus en bleu.

Il est intéressant de noter, qu'en dépit de la mauvaise réputation des hydroxamates, le composé 17 dispose d'un très bon profil de sélectivité (Tableau 5).

Tableau 5 : Profil de sélectivité de 17 en comparaison du Batimastat, issu de Kany *et al.*^[84].

	Activité résiduelle en présence de 17 à [100 µM] (%)	Batimastat CI ₅₀ (nM)
MMP-1	91 ± 9	2,2 ± 0,1
MMP-2	87 ± 3	1,8 ± 0,1
MMP-3	84 ± 5	5,6 ± 0,9
MMP-7	98 ± 3	7,0 ± 0,2
MMP-8	73 ± 6	0,7 ± 0,2
MMP-14	98 ± 4	2,8 ± 0,2
TACE	38 ± 12	Non déterminée

De plus, il n'a démontré que de faibles effets cytotoxiques sur des cellules Hep G2, cellulaires, bien qu'ayant des effets plus marqués sur des cellules HEK293 (Figure 32) ; ceci pouvant s'expliquer par l'inhibition de TACE par 17^[84].

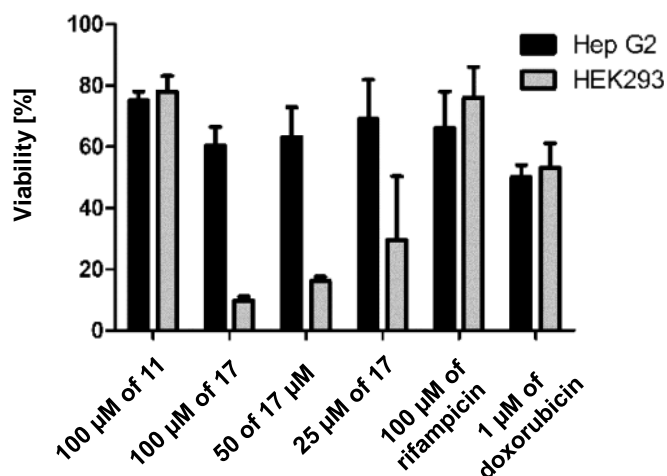


Figure 32 : Mesure de la cytotoxicité de l'hydroxamate 17 sur les lignées cellulaires Hep G2 et HEK293, comparée au thiol 11, à la rifampicine et doxorubicine, issue de Kany *et al.*^[84].

Face au potentiel du composé **17**, les auteurs se sont inspirés des modifications faites lors de l'optimisation des thiols dans le but d'essayer d'améliorer son activité : la substitution en α du groupement liant le zinc et le remplacement du motif 3,4-dichloro par un méthyle en position 4 (composé **18**). Ces modifications ont conduit à une augmentation très importante de l'activité, aboutissant à un inhibiteur nanomolaire ($CI_{50} = 14,0$ nM). Ainsi, ce gain d'activité s'expliquerait par l'occupation de la poche S1' via la chaîne isobutyle en position malonique^[48].

Cependant, lors d'études pharmacocinétiques chez la souris, les concentrations de **18** retrouvées dans les poumons étaient très moyennes ; ce dernier n'étant plus détecté 2 heures après administration^[85]. De plus, **18** dispose un profil de sélectivité limité, inhibant certaines métalloprotéinases matricielles (MMP-1, MMP-2 et MMP-3) et TACE de l'ordre du micromolaire^[85], limitant ainsi son utilisation en thérapeutique.

4. Les acides carboxyliques

L'inhibition de LasB par l'intermédiaire d'un acide carboxylique a également été décrite dans la littérature^[86]. Leiris et ses collègues se sont inspirés de la structure chimique du phosphoramidon et ont utilisé un screening virtuel comme approche pour essayer de découvrir des inhibiteurs de LasB. Concernant leur pharmacophore, celui-ci contenait un groupement liant le zinc, un motif hydrophobe pour mimer la chaîne isobutyle du phosphoramidon qui occupe S1', et au moins une liaison hydrogène avec le glutamate 111, l'asparagine 112 ou l'arginine 198. Ainsi, sept millions de composés ont été criblés aboutissant à l'identification du hit **19** ($K_i = 14,8$ μ M), et après optimisation de ce dernier, à un inhibiteur prometteur (composé **20**, $K_i = 0,16$ μ M) (Figure 33).

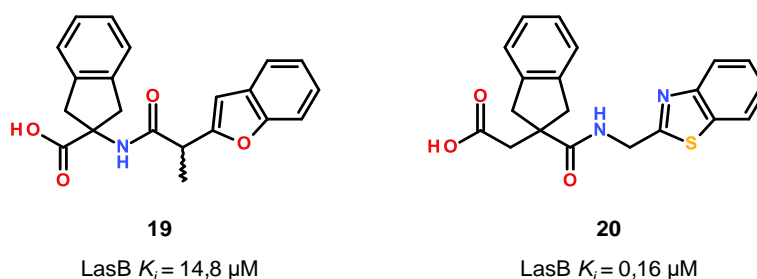


Figure 33 : Structures chimiques et activités biologiques des acides carboxyliques 19 et 20. Les valeurs des K_i ont été extraites de la publication originale^[86]

L'inhibiteur **20** a été co-cristallisé avec LasB permettant d'obtenir son mode de liaison (Figure 34) ; celui-ci étant similaire à celui du phosphoramidon même si la chélation du zinc est différente. Comme attendu, l'hydroxyle de l'acide carboxylique lie le zinc et établit une liaison hydrogène avec l'histidine 223. Quant au carbonyle de l'acide carboxylique, il interagit avec le glutamate 141 via une liaison hydrogène. Deux autres liaisons hydrogènes participent à la liaison de **20** à LasB comme celle entre l'asparagine 112 avec le l'atome d'azote de l'amide et notamment la liaison bidentate faisant intervenir l'arginine 198, qui elle, interagit avec le carbonyle de l'amide (Figure 34B, C). Concernant l'occupation des poches S1' et S2', l'indane se trouve dans S1' alors que le benzothiazone lie la poche S2' et forme une interaction π - π avec un résidu phénylalanine de celle-ci (Phe129) (Figure 34).

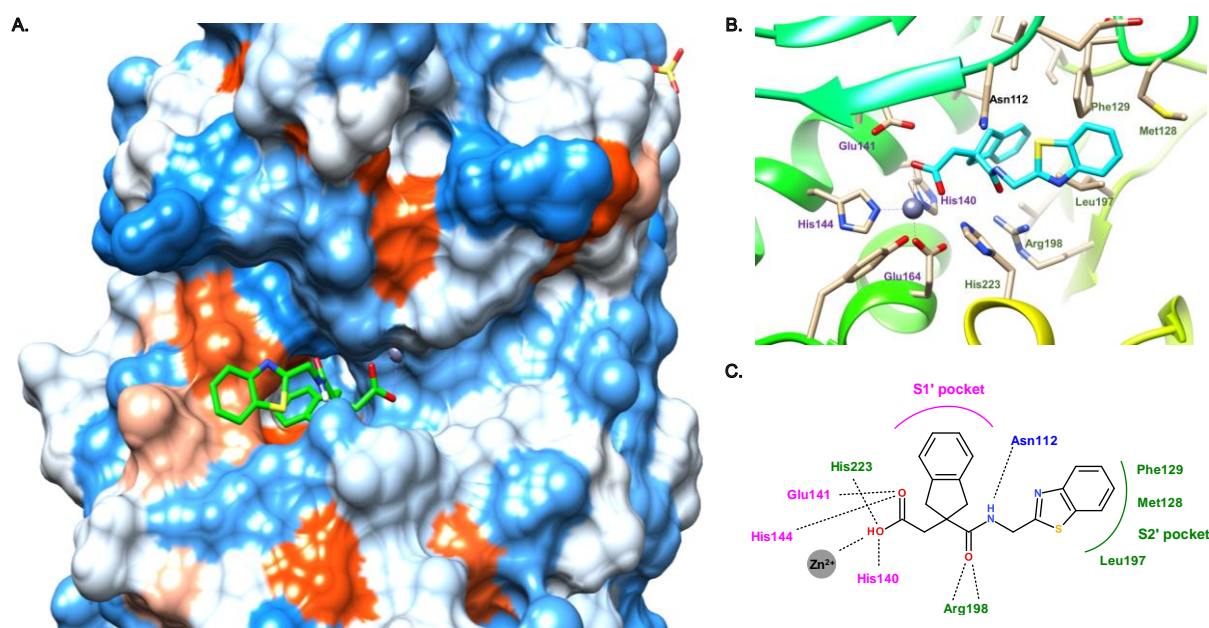


Figure 34 : Mode de liaison de 19 (PDB : 7AJR), issu de Camberlein *et al.*^[48]. (A) Vue d'ensemble du site actif de LasB en mode surface accueillant 19 (vert), visualisée à l'aide de Chimera 1.15. Le cation zinc est représenté par une sphère grise. (B) Vue d'ensemble du site actif de LasB avec 19 (bleu) et les résidus impliqués (beige) dans la liaison, visualisée à l'aide de Chimera 1.15. (C) Représentation schématique bidimensionnelle du mode de liaison de 17. Les interactions clés sont représentées par des tirets, le cation zinc par une sphère grise, les résidus clés appartenant à la poche S1' et S2' en rose et vert respectivement, les autres résidus en bleu.

Dans le but d'améliorer l'activité inhibitrice de cette famille de composés et d'augmenter leur solubilité, d'autres modifications ont été menées conduisant aux inhibiteurs 21 et 22 (Figure 35) ; ces changements n'ayant pas entraîné de différences significatives dans le mode de liaison à LasB comparé à **20**^[87].

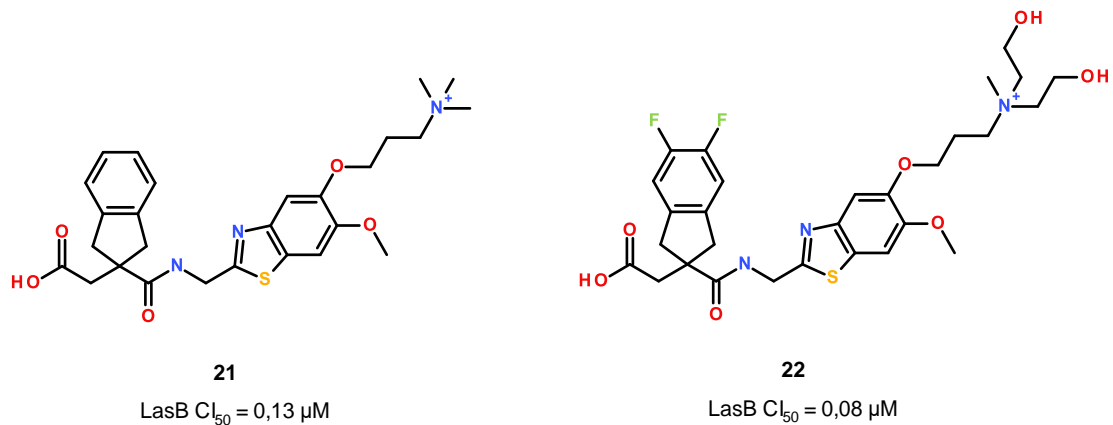


Figure 35 : Structures chimiques et activités biologiques des acides carboxyliques 21 et 22. Les valeurs des Cl_{50} ont été extraites de la publication originale.

Le potentiel de ces deux acides carboxyliques a été évalué dans des modèles cellulaires et animaux d'infection à *P. aeruginosa*. Comme vu précédemment, LasB est capable de cliver certains effecteurs du système immunitaire. Ainsi, premièrement, la capacité de **21** et **22** à inhiber ce clivage a été mesurée notamment le clivage de l'IgG et de l'IL-1 β (Figure 36). La protéolyse de l'IgG médiée par LasB libère un peptide de dégradation de 36kDa, et cette libération est inhibée par des concentrations croissantes de **21** et **22** (Figure 36A) ; démontrant ainsi l'effet de ces deux inhibiteurs sur LasB. D'autre part, LasB clive le domaine N-terminal de la pro-IL-1 β conduisant à la forme active de l'IL-1 β . Cette activité peut être suivie via spectrophotométrie par l'hydrolyse d'un peptide fluorescent (Sub115). De manière intéressante, 21 et 22 ont été capables d'inhiber le clivage de ce peptide de façon dose dépendante (Figure 36A et B)^[87].

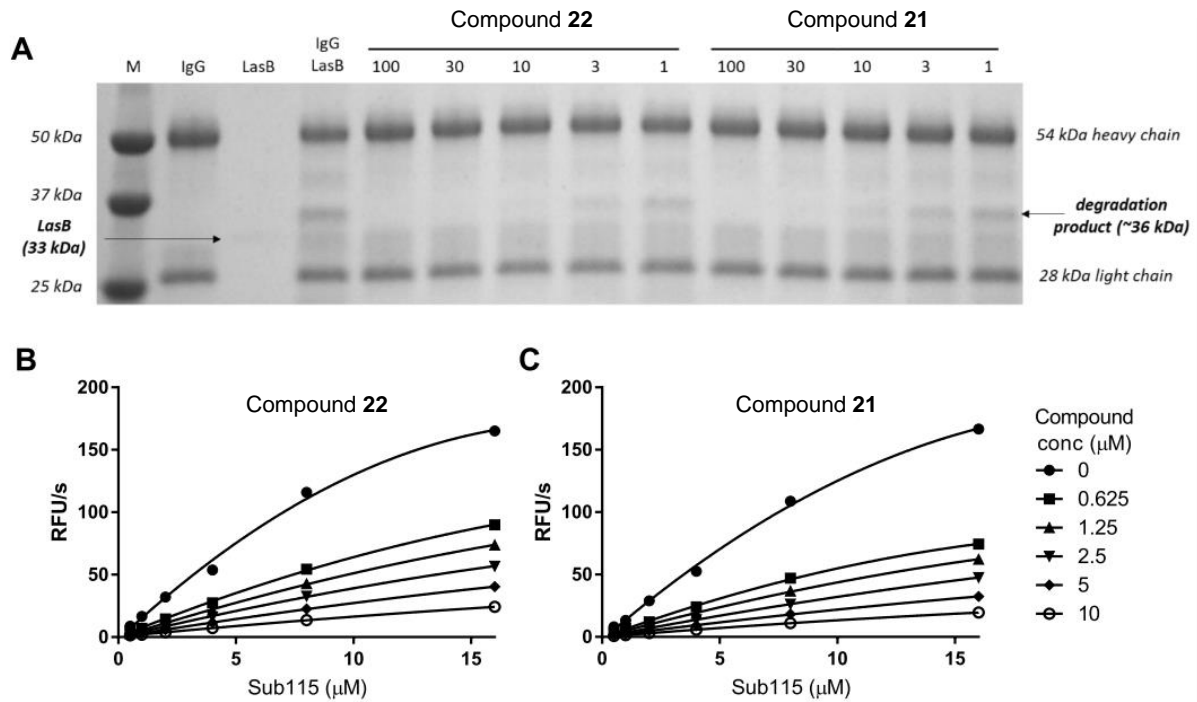


Figure 36 : Inhibition de la protéolyse des substrats de l'hôte médiée par LasB par les composés 21 et 22, issue d'Everett *et al.*^[87]. (A) Inhibition de la protéolyse de l'IgG par 21 et 22. (B) et (C) Inhibition de la protéolyse de l'IL-1β par 21 et 22.

Après avoir démontré un effet *in vitro* sur la protéolyse de la pro-IL-1β, les acides carboxyliques **21** et **22** ont été évalués sur leur potentiel à reproduire cet effet dans des macrophages humains infectés par *P. aeruginosa* (souche PAO1) ou par un mutant LasB (Δ lasB). Ces deux composés ont permis de réduire drastiquement, de manière dose-dépendante, l'activité LasB et par conséquent l'activation de l'IL-1β dans des macrophages infectés par la souche PAO1 (Figure 37)^[87].

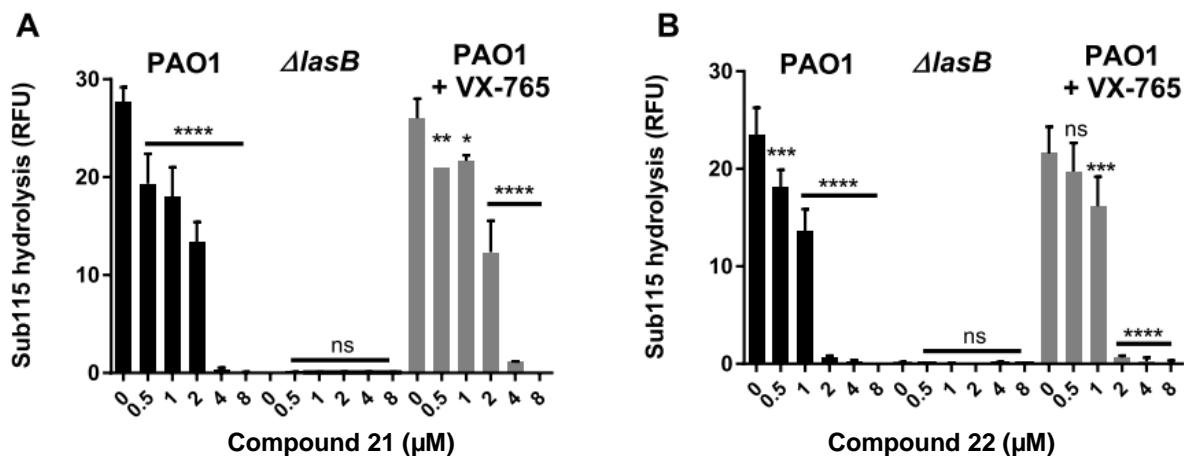


Figure 37 : Inhibition de l'activation de l'IL-1β par les composés 21 (A) et 22 (B) dans les macrophages infectés par *P. aeruginosa*, issue d'Everett *et al.*^[87].

Enfin, pour déterminer si **21** et **22** étaient capables d'engager LasB *in vivo*, des études d'efficacité dans un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez la

souris ont été menées. De façon intéressante, ces deux inhibiteurs ont entraîné une diminution du nombre de bactéries, équivalentes à celles observées dans le groupe Δ lasB (Figure 38)^[87].

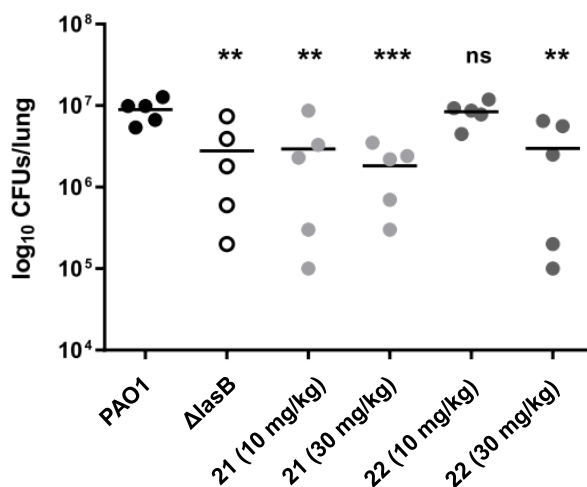


Figure 38 : Mesure du nombre de cellules bactériennes (CFU) dans les homogénats de poumons 24h après l'infection et traitement par 21 et 22, issue d'Everett *et al.*^[87].

En conclusion, ces deux composés sont puissants, sélectifs, non cytotoxiques, possèdent de bonnes propriétés pharmacocinétiques et ont démontré une efficacité dans un modèle in vivo d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Ils représentent donc de sérieux candidats médicaments à ce jour.

5. Les acides phosphoniques

Récemment, une nouvelle famille d'inhibiteurs de LasB contenant un phosphonate comme groupement liant le zinc a été décrite par l'équipe du Pr. Hirsch, avec pour objectif de résoudre les problèmes issus de l'hydroxamate **18** (Figure 39)^[85].

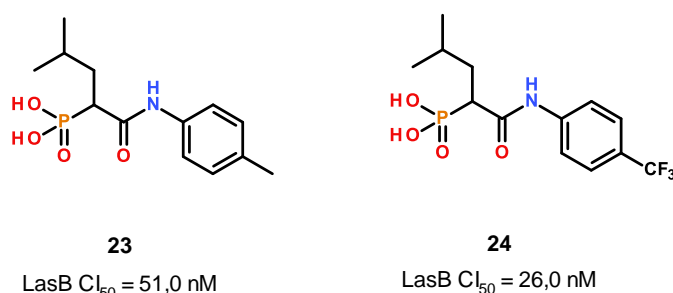


Figure 39 : Structures chimiques et activités biologiques des phosphonates 23 et 24. Les valeurs des CI_{50} ont été extraites de la publication originale^[85].

Bien que ce changement n'ait pas entraîné d'augmentation l'activité sur LasB (composé **23**, $CI_{50} = 51,0$ nM, composé **24**, $CI_{50} = 26,0$ nM contre composé **18** = 14,0 nM), il a permis d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques ; **23** et **24** étant retrouvés à des concentrations plus importantes dans le tissu pulmonaire que l'hydroxamate **18**^[85]. De plus, contrairement à **18**, les inhibiteurs **23** et **24** ne présentent pas d'activité résiduelle sur TACE^[85]. Concernant leur toxicité, ces deux derniers ont montré une concentration maximale tolérée ≥ 100 μ M sur des embryons de poissons zèbres^[85].

Le mode de liaison de cette famille d'inhibiteurs via la co-cristallisation avec LasB a été élucidé^[85]. En revanche, à ce jour, la structure cristalline n'est pas disponible. Ainsi, **24** se lie de façon similaire au thiol **12** (Figure 28) ; le phosphonate liant le zinc de façon monodendate. La chaîne isobutyle occupe S1' tandis que S2' accommode le noyau aryle de **24**. La liaison hydrogène bidentate faisant intervenir l'arginine 198 participe également à la liaison de **24**, ce résidu interagissant avec le carbonyle de l'amide. D'autres liaisons hydrogènes impliquant des résidus histidine (223), glutamate (141) et asparagine (112) interviennent, en se liant respectivement avec le phosphonate et l'azote de l'amide.

Ensuite, l'activité de cette classe d'inhibiteurs de LasB a été mesurée dans un modèle *in vivo* utilisant les larves *Galleria Mellonella* (Figure 40). Alors que le traitement par **24** ou tobramycine n'a entraîné qu'une faible augmentation de la survie, 25% et 5% respectivement, la combinaison tobramycine-**24** a considérablement amélioré la survie des larves de 40%^[85].

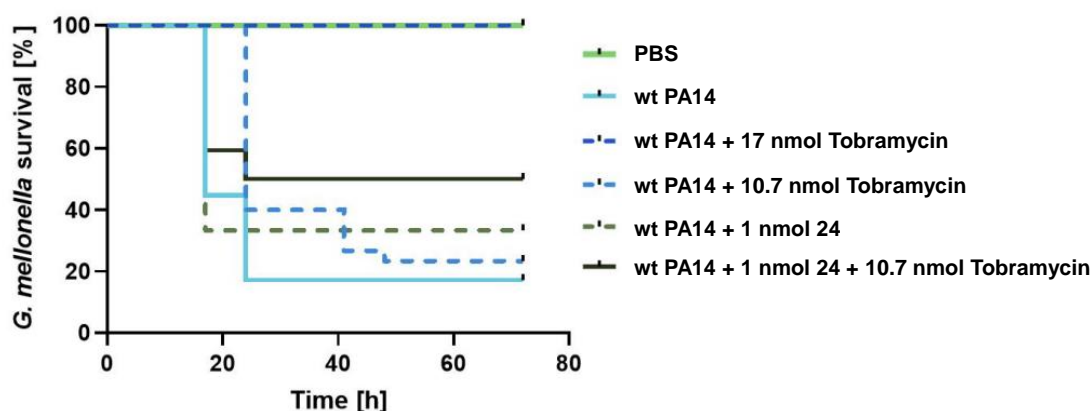


Figure 40 : Analyse Kaplan-Meiers de la survie des larves *Galleria mellonella* infectées par PA14 et traitées avec tobramycine (tiret bleu foncé et tiret bleu clair), 24 (tiret vert), tobramycine + 24 (trait plein noir), issue de Konstantinovic et al.^[85].

Face aux résultats très prometteurs observés dans différents essais in vitro, ses bonnes propriétés pharmacocinétiques et son efficacité dans un modèle d'infection in vivo chez *Galleria mellonella*, **24** a été évalué dans une étude pharmacodynamique utilisant un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez la souris (Figure 41).

Comme observé sur la Figure 41A, le traitement par lévofloxacine a permis de réduire la croissance bactérienne tandis que **24** n'a pas eu d'effet positif sur celle-ci. En revanche, ce paramètre fut diminué significativement lorsque les souris ont reçu la combinaison lévofloxacine-**24**. De plus, une diminution des concentrations de LasB dans le sang a été observé pour les groupes lévofloxacines et lévofloxacine-**24** (Figure 41B). De manière intéressante, cette réduction a également été observée pour les souris ne recevant que **24** ; fournissant ainsi la preuve de concept et l'engagement de la cible (Figure 41B)^[85].

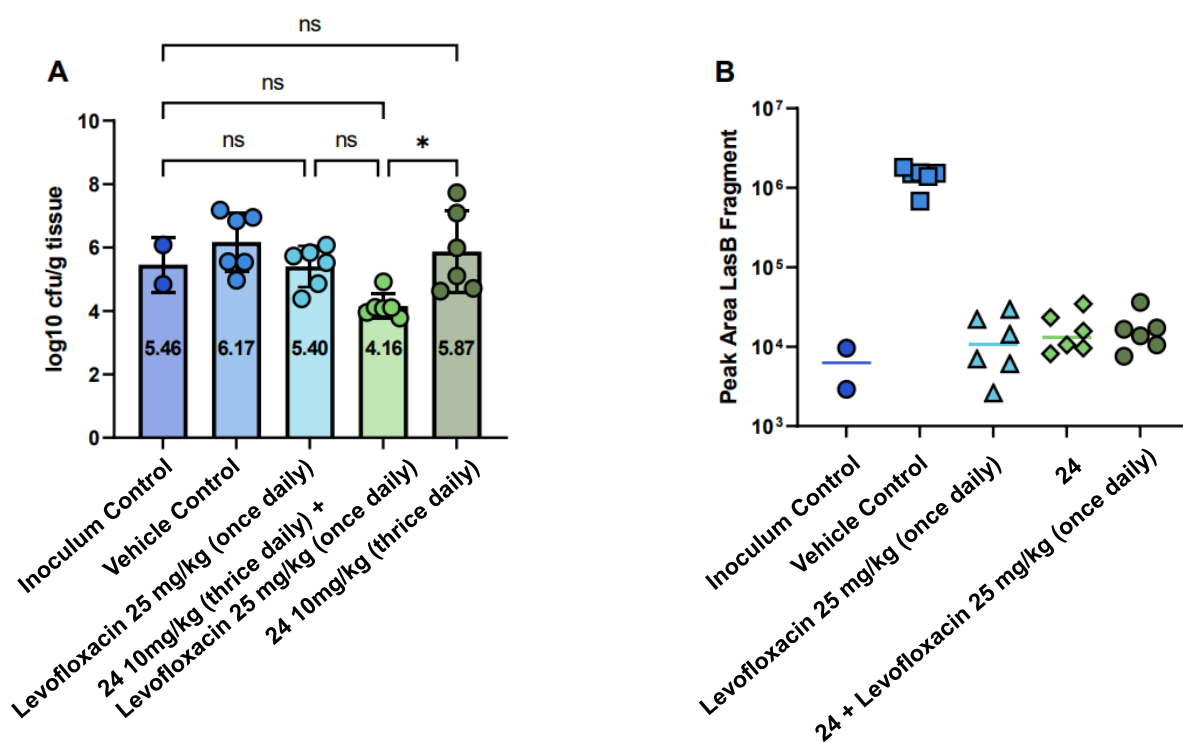


Figure 41 : (A) Croissance bactérienne dans le tissu pulmonaire après traitement par lévofloxacine, **24** ou lévofloxacine + **24**. (B) Concentration de LasB dans le sang des souris infectées par *P. aeruginosa*, issue de Konstantinovic *et al.*^[85].

Ainsi, ces phosphonates possèdent une puissante activité inhibitrice *in vitro*, un très bon profil de sélectivité et n'engendrent pas d'effets cytotoxiques majeurs. De plus, ils ont démontré un effet significatif dans un modèle *in vivo* d'infection à *P. aeruginosa* et dispose de propriétés pharmacocinétiques comparables à celle d'un candidat médicament ; ils apparaissent donc comme des candidats médicaments crédibles.

6. Les chélateurs de métaux

Utilisant un criblage d'une librairie de chélateurs métalliques, suivi d'optimisation des hits, les groupes de recherche de Cohen et Janda ont décrit l'inhibition micromolaire de LasB par la 3-hydroxy-2-méthyl-4-sulfanylidene-pyridin-1(4H)-yl (**25**, $CI_{50} = 2,7 \mu M$) et la tropolone (**26**, $CI_{50} = 1,2 \mu M$) (Figure 42). A ce jour, aucune donnée sur le mode de liaison de ces derniers n'a été publiée et les tentatives de simulation n'ont pas été fructueuses^[48]. Il est intéressant de noter que le composé **25** présente une bonne stabilité chimique (pas d'oxydation ou décomposition) et que **26** dispose d'un bon profil de sélectivité^[83,88]. Malheureusement, leurs puissances moyennes limitent leurs utilisations en thérapeutique.

Plus récemment, il a été rapporté que des complexes d'argent et de cuivre de la 1,10-phénanthroline-5,6-dione peuvent inhiber LasB, en particulier le complexe de cuivre **28** avec une forte puissance ($K_i = 0,09 \mu M$) (Figure 42)^[89]. Bien que les structures co-cristallines de ces deux complexes avec LasB ne soient pas disponibles pour le moment, des études de docking ont été réalisées par le même groupe, permettant de comprendre leur mode de liaison et donc la différence de puissance. En ce qui concerne le complexe d'argent **27**, un atome d'azote de phénanthroline forme une liaison hydrogène avec l'alanine 113, et trois molécules d'eau renforcent sa liaison au site actif en interagissant avec les atomes d'oxygène et d'azote de **27**^[89]. En revanche, le complexe de cuivre **28** ne présente pas la même liaison au site actif et interagit avec les résidus clés arginine 198 et asparagine 112, justifiant la différence d'activité entre ces deux complexes métalliques^[89]. Des études supplémentaires sur leur stabilité, leur solubilité et leur sélectivité sont nécessaires pour les considérer comme des candidats médicaments.

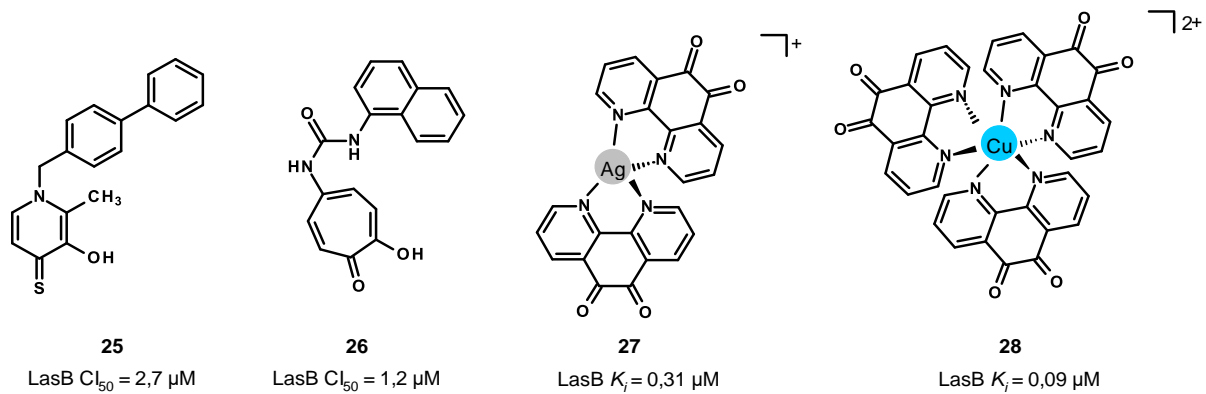


Figure 42 : Structures chimiques et activités biologiques des inhibiteurs 25–28. Les valeurs des CI_{50} ont été extraites des publications originales^[83,88,89].

Conclusion

Depuis la découverte du phosphoramidon, premier inhibiteur de LasB décrit, différentes familles de petites molécules ont été développées avec des profils plus ou moins prometteurs. Ceci a permis d'établir un pharmacophore à considérer pour la conception d'inhibiteurs de LasB : (1) chélation du cation zinc ; (2) occupation des poches de liaison S1' et S2', S1' étant plutôt hydrophobe et étroite, et pouvant être considérée comme la poche principale d'interaction, alors que S2' est plus externe et plus large avec une partie hydrophobe au milieu et une partie supérieure contenant des résidus hydrophiles offrant la possibilité de liaisons hydrogène notamment avec l'arginine 198, et dans une moindre mesure avec l'asparagine 112 et l'histidine 223 ; (3) occupation de la petite cavité hydrophobe de S1' à proximité du cation zinc.

A ce jour, aucun de ces inhibiteurs n'a atteint le marché, soit en raison d'un manque de puissance *in vitro* ou d'efficacité *in vivo*, de stabilité ou de sélectivité, bien que certains inhibiteurs contenant un acide carboxylique ou un acide phosphoniques apparaissent prometteurs. En ce qui concerne le manque de puissance, ce problème peut être résolu grâce aux nombreuses structures cristallines disponibles. En ce qui concerne la stabilité et la sélectivité, le remplacement du groupement liant pourrait être une opportunité intéressante car certains groupes fonctionnels n'ont pas encore été explorés, comme le sulfamate ou le boronate. D'autres stratégies peuvent être envisagées pour surmonter le défi perpétuel de l'inhibition sélective des métalloprotéases comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux^[90].

Bien que l'approche de l'anti-virulence semble attrayante et prometteuse, d'autres thérapies non-antibiotiques ont également été explorées^[91], telles que la modulation du microbiome^[92] ou l'inhibition des pompes à efflux^[93]. Comme ces approches nécessiteront probablement l'utilisation d'un antibiotique en association, les efforts de découverte de médicaments devront se poursuivre dans le domaine des antibiotiques.

Références

1. Diggle, S.P.; Whiteley, M. Microbe Profile: *Pseudomonas Aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat. *Microbiol. Read. Engl.* **2020**, *166*, 30–33, doi:10.1099/mic.0.000860.
2. Azam, M.W.; Khan, A.U. Updates on the Pathogenicity Status of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 350–359, doi:10.1016/j.drudis.2018.07.003.
3. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.-J.; Cheng, Z. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192, doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
4. Mühlen, S.; Dersch, P. Anti-Virulence Strategies to Target Bacterial Infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2016**, *398*, 147–183, doi:10.1007/82_2015_490.
5. Dickey, S.W.; Cheung, G.Y.C.; Otto, M. Different Drugs for Bad Bugs: Antivirulence Strategies in the Age of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 457–471, doi:10.1038/nrd.2017.23.
6. Rasko, D.A.; Sperandio, V. Anti-Virulence Strategies to Combat Bacteria-Mediated Disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 117–128, doi:10.1038/nrd3013.
7. Mann, E.E.; Wozniak, D.J. *Pseudomonas* Biofilm Matrix Composition and Niche Biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 893–916, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.
8. Liao, C.; Huang, X.; Wang, Q.; Yao, D.; Lu, W. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 926758, doi:10.3389/fcimb.2022.926758.
9. Jimenez, P.N.; Koch, G.; Thompson, J.A.; Xavier, K.B.; Cool, R.H.; Quax, W.J. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2012**, *76*, 46–65, doi:10.1128/MMBR.05007-11.
10. Balasubramanian, D.; Schneper, L.; Kumari, H.; Mathee, K. A Dynamic and Intricate Regulatory Network Determines *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1–20, doi:10.1093/nar/gks1039.
11. LaSarre, B.; Federle, M.J. Exploiting Quorum Sensing to Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2013**, *77*, 73–111, doi:10.1128/MMBR.00046-12.
12. Lee, J.; Zhang, L. The Hierarchy Quorum Sensing Network in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6*, 26–41, doi:10.1007/s13238-014-0100-x.
13. Lynch, J.P.; Zhanel, G.G. *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia: Evolution of Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2022**, *43*, 191–218, doi:10.1055/s-0041-1740109.
14. Rossi, E.; La Rosa, R.; Bartell, J.A.; Marvig, R.L.; Haagensen, J.A.J.; Sommer, L.M.; Molin, S.; Johansen, H.K. *Pseudomonas Aeruginosa* Adaptation and Evolution in Patients with Cystic Fibrosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 331–342, doi:10.1038/s41579-020-00477-5.
15. Jurado-Martín, I.; Sainz-Mejías, M.; McClean, S. *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3128, doi:10.3390/ijms22063128.
16. Reynolds, D.; Kollef, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* **2021**, *81*, 2117–2131, doi:10.1007/s40265-021-01635-6.

17. Vincent, J.-L.; Sakr, Y.; Singer, M.; Martin-Loeches, I.; Machado, F.R.; Marshall, J.C.; Finfer, S.; Pelosi, P.; Brazzi, L.; Aditianingsih, D.; et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* **2020**, *323*, 1478–1487, doi:10.1001/jama.2020.2717.
18. Pisanu, G.; Fartoukh, M.; Garnier, M. Pneumonie associée à la ventilation mécanique. *Prat. En Anesth. Réanimation* **2018**, *22*, 10–16, doi:10.1016/j.pratan.2018.01.005.
19. Kitagawa, K.; Shigemura, K.; Yamamichi, F.; Osawa, K.; Uda, A.; Koike, C.; Tokimatsu, I.; Shirakawa, T.; Miyara, T.; Fujisawa, M. Bacteremia Complicating Urinary Tract Infection by *Pseudomonas Aeruginosa*: Mortality Risk Factors. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2019**, *26*, 358–362, doi:10.1111/iju.13872.
20. Salsgiver, E.L.; Fink, A.K.; Knapp, E.A.; LiPuma, J.J.; Olivier, K.N.; Marshall, B.C.; Saiman, L. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* **2016**, *149*, 390–400, doi:10.1378/chest.15-0676.
21. Posters | European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Available online: <https://www.ecfs.eu/ecfspr/posters> (accessed on 8 June 2023).
22. Mogayzel, P.J.; Naureckas, E.T.; Robinson, K.A.; Brady, C.; Guill, M.; Lahiri, T.; Lubsch, L.; Matsui, J.; Oermann, C.M.; Ratjen, F.; et al. Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Guideline. Pharmacologic Approaches to Prevention and Eradication of Initial *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2014**, *11*, 1640–1650, doi:10.1513/AnnalsATS.201404-166OC.
23. Johnson, L.E.; D'Agata, E.M.C.; Paterson, D.L.; Clarke, L.; Qureshi, Z.A.; Potoski, B.A.; Peleg, A.Y. *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteremia over a 10-Year Period: Multidrug Resistance and Outcomes in Transplant Recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **2009**, *11*, 227–234, doi:10.1111/j.1399-3062.2009.00380.x.
24. Latifi, N.A.; Karimi, H. Correlation of Occurrence of Infection in Burn Patients. *Ann. Burns Fire Disasters* **2017**, *30*, 172–176.
25. Jangra, V.; Sharma, N.; Chhillar, A.K. Therapeutic Approaches for Combating *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Microbes Infect.* **2022**, *24*, 104950, doi:10.1016/j.micinf.2022.104950.
26. Lima, L.M.; Silva, B.N.M. da; Barbosa, G.; Barreiro, E.J. β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112829.
27. Sawa, T.; Kooguchi, K.; Moriyama, K. Molecular Diversity of Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases, and Antimicrobial Resistance. *J. Intensive Care* **2020**, *8*, 13, doi:10.1186/s40560-020-0429-6.
28. Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435, doi:10.1038/nrmicro2333.
29. Kopaczynska, M.; Schulz, A.; Fraczkowska, K.; Kraszewski, S.; Podbielska, H.; Fuhrhop, J.H. Selective Condensation of DNA by Aminoglycoside Antibiotics. *Eur. Biophys. J.* **2016**, *45*, 287–299, doi:10.1007/s00249-015-1095-9.
30. Sabnis, A.; Hagart, K.L.; Klöckner, A.; Becce, M.; Evans, L.E.; Furniss, R.C.D.; Mavridou, D.A.; Murphy, R.; Stevens, M.M.; Davies, J.C.; et al. Colistin Kills Bacteria by Targeting Lipopolysaccharide in the Cytoplasmic Membrane. *eLife* **2021**, *10*, e65836, doi:10.7554/eLife.65836.
31. Horcajada, J.P.; Montero, M.; Oliver, A.; Sorlí, L.; Luque, S.; Gómez-Zorrilla, S.; Benito, N.; Grau, S. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00031-19, doi:10.1128/CMR.00031-19.

32. European Antimicrobial Resistance Collaborators The Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in the WHO European Region in 2019: A Cross-Country Systematic Analysis. *Lancet Public Health* **2022**, *7*, e897–e913, doi:10.1016/S2468-2667(22)00225-0.
33. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019 Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019> (accessed on 11 October 2021).
34. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Reports 2017.
35. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2019 2019.
36. Li, H.; Luo, Y.-F.; Williams, B.J.; Blackwell, T.S.; Xie, C.-M. Structure and Function of OprD Protein in *Pseudomonas Aeruginosa*: From Antibiotic Resistance to Novel Therapies. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **2012**, *302*, 10.1016/j.ijmm.2011.10.001, doi:10.1016/j.ijmm.2011.10.001.
37. Pelegrin, A.C.; Palmieri, M.; Mirande, C.; Oliver, A.; Moons, P.; Goossens, H.; van Belkum, A. *Pseudomonas Aeruginosa*: A Clinical and Genomics Update. *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, *45*, fuab026, doi:10.1093/femsre/fuab026.
38. Tooke, C.L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E.C.; Colenso, C.K.; Hirvonen, V.H.A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472–3500, doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002.
39. Barbier, F.; Wolff, M. Multirésistance Chez *Pseudomonas Aeruginosa*: Vers l'impasse Thérapeutique? *médecine/sciences* **2010**, *26*, 960–968, doi:10.1051/medsci/20102611960.
40. Becker, B.; Cooper, M.A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 105–115, doi:10.1021/cb3005116.
41. Glen, K.A.; Lamont, I.L. β -Lactam Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens* **2021**, *10*, 1638, doi:10.3390/pathogens10121638.
42. Aldred, K.J.; Kerns, R.J.; Osheroff, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* **2014**, *53*, 1565–1574, doi:10.1021/bi5000564.
43. Motta, S.S.; Cluzel, P.; Aldana, M. Adaptive Resistance in Bacteria Requires Epigenetic Inheritance, Genetic Noise, and Cost of Efflux Pumps. *PloS One* **2015**, *10*, e0118464, doi:10.1371/journal.pone.0118464.
44. Maurice, N.M.; Bedi, B.; Sadikot, R.T. *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *58*, 428–439, doi:10.1165/rcmb.2017-0321TR.
45. Escaich, S. Antivirulence as a New Antibacterial Approach for Chemotherapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 400–408, doi:10.1016/j.cbpa.2008.06.022.
46. Everett, M.J.; Davies, D.T. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase (LasB) as a Therapeutic Target. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 2108–2123, doi:10.1016/j.drudis.2021.02.026.
47. Thayer, M.M.; Flaherty, K.M.; McKay, D.B. Three-Dimensional Structure of the Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa* at 1.5-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2864–2871, doi:10.2210/pdb1ezm/pdb.
48. Camberlein, V.; Jézéquel, G.; Hauptenthal, J.; Hirsch, A.K.H. The Structures and Binding Modes of Small-Molecule Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase LasB. *Antibiot. Basel Switz.* **2022**, *11*, 1060, doi:10.3390/antibiotics11081060.
49. Yang, J.; Zhao, H.-L.; Ran, L.-Y.; Li, C.-Y.; Zhang, X.-Y.; Su, H.-N.; Shi, M.; Zhou, B.-C.; Chen, X.-L.; Zhang, Y.-Z. Mechanistic Insights into Elastin Degradation by Pseudolysin, the Major Virulence Factor of the Opportunistic

- Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9936, doi:10.1038/srep09936.
50. Beaufort, N.; Corvazier, E.; Hervieu, A.; Choqueux, C.; Dussiot, M.; Louedec, L.; Cady, A.; de Bentzmann, S.; Michel, J.-B.; Pidard, D. The Thermolysin-like Metalloproteinase and Virulence Factor LasB from Pathogenic *Pseudomonas Aeruginosa* Induces Anoikis of Human Vascular Cells. *Cell. Microbiol.* **2011**, *13*, 1149–1167, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01606.x.
 51. Beaufort, N.; Corvazier, E.; Mlanaindrou, S.; de Bentzmann, S.; Pidard, D. Disruption of the Endothelial Barrier by Proteases from the Bacterial Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*: Implication of Matrilysin and Receptor Cleavage. *PLoS One* **2013**, *8*, e75708, doi:10.1371/journal.pone.0075708.
 52. Diebel, L.N.; Liberati, D.M.; Amin, P.B.; Diglio, C.A. Cleavage of SIgA by Gram Negative Respiratory Pathogens Enhance Neutrophil Inflammatory Potential. *J. Trauma* **2009**, *66*, 1336–1342; discussion 1342, doi:10.1097/TA.0b013e31819dc577.
 53. Parmely, M.; Gale, A.; Clabaugh, M.; Horvat, R.; Zhou, W.W. Proteolytic Inactivation of Cytokines by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 3009–3014.
 54. Pedersen, B.K.; Kharazmi, A.; Theander, T.G.; Odum, N.; Andersen, V.; Bendtzen, K. Selective Modulation of the CD4 Molecular Complex by *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease and Elastase. *Scand. J. Immunol.* **1987**, *26*, 91–94, doi:10.1111/j.1365-3083.1987.tb02239.x.
 55. Sun, J.; LaRock, D.L.; Skowronski, E.A.; Kimmey, J.M.; Olson, J.; Jiang, Z.; O'Donoghue, A.J.; Nizet, V.; LaRock, C.N. The *Pseudomonas Aeruginosa* Protease LasB Directly Activates IL-1 β . *EBioMedicine* **2020**, *60*, 102984, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102984.
 56. Theander, T.G.; Kharazmi, A.; Pedersen, B.K.; Christensen, L.D.; Tvede, N.; Poulsen, L.K.; Odum, N.; Svenson, M.; Bendtzen, K. Inhibition of Human Lymphocyte Proliferation and Cleavage of Interleukin-2 by *Pseudomonas Aeruginosa* Proteases. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 1673–1677, doi:10.1128/iai.56.7.1673-1677.1988.
 57. Matheson, N.R.; Potempa, J.; Travis, J. Interaction of a Novel Form of *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease (Aeruginolysin) with Interleukin-6 and Interleukin-8. *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 911–915, doi:10.1515/BC.2006.115.
 58. Schultz, D.R.; Miller, K.D. Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa*: Inactivation of Complement Components and Complement-Derived Chemotactic and Phagocytic Factors. *Infect. Immun.* **1974**, *10*, 128–135, doi:10.1128/iai.10.1.128-135.1974.
 59. Kuang, Z.; Hao, Y.; Walling, B.E.; Jeffries, J.L.; Ohman, D.E.; Lau, G.W. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLoS One* **2011**, *6*, e27091, doi:10.1371/journal.pone.0027091.
 60. Alcorn, J.F.; Wright, J.R. Degradation of Pulmonary Surfactant Protein D by *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase Abrogates Innate Immune Function. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30871–30879, doi:10.1074/jbc.M400796200.
 61. Schmidtchen, A.; Holst, E.; Tapper, H.; Björck, L. Elastase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa* Degrade Plasma Proteins and Extracellular Products of Human Skin and Fibroblasts, and Inhibit Fibroblast Growth. *Microb. Pathog.* **2003**, *34*, 47–55.
 62. Morihara, K.; Tsuzuki, H.; Oda, K. Protease and Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa*: Inactivation of Human Plasma Alpha 1-Proteinase Inhibitor. *Infect. Immun.* **1979**, *24*, 188–193, doi:10.1128/iai.24.1.188-193.1979.

63. Cosgrove, S.; Chotirmall, S.H.; Greene, C.M.; McElvaney, N.G. Pulmonary Proteases in the Cystic Fibrosis Lung Induce Interleukin 8 Expression from Bronchial Epithelial Cells via a Heme/Meprin/Epidermal Growth Factor Receptor/Toll-like Receptor Pathway. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7692–7704, doi:10.1074/jbc.M110.183863.
64. Britigan, B.E.; Hayek, M.B.; Doebbeling, B.N.; Fick, R.B. Transferrin and Lactoferrin Undergo Proteolytic Cleavage in the Pseudomonas Aeruginosa-Infected Lungs of Patients with Cystic Fibrosis. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 5049–5055, doi:10.1128/iai.61.12.5049-5055.1993.
65. Miller, R.A.; Rasmussen, G.T.; Cox, C.D.; Britigan, B.E. Protease Cleavage of Iron-Transferrin Augments Pyocyanin-Mediated Endothelial Cell Injury via Promotion of Hydroxyl Radical Formation. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 182–188, doi:10.1128/iai.64.1.182-188.1996.
66. van der Plas, M.J.A.; Bhongir, R.K.V.; Kjellström, S.; Siller, H.; Kasetty, G.; Mörgelin, M.; Schmidtchen, A. Pseudomonas Aeruginosa Elastase Cleaves a C-Terminal Peptide from Human Thrombin That Inhibits Host Inflammatory Responses. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11567, doi:10.1038/ncomms11567.
67. Cowell, B.A.; Twining, S.S.; Hobden, J.A.; Kwong, M.S.F.; Fleiszig, S.M.J. Mutation of LasA and LasB Reduces Pseudomonas Aeruginosa Invasion of Epithelial Cells. *Microbiol. Read. Engl.* **2003**, *149*, 2291–2299, doi:10.1099/mic.0.26280-0.
68. Casilag, F.; Lorenz, A.; Krueger, J.; Klawonn, F.; Weiss, S.; Häussler, S. The LasB Elastase of Pseudomonas Aeruginosa Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 162–171, doi:10.1128/IAI.00939-15.
69. Kamath, S.; Kapatral, V.; Chakrabarty, A.M. Cellular Function of Elastase in Pseudomonas Aeruginosa: Role in the Cleavage of Nucleoside Diphosphate Kinase and in Alginate Synthesis. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 933–941, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01121.x.
70. Gi, M.; Jeong, J.; Lee, K.; Lee, K.-M.; Toyofuku, M.; Yong, D.E.; Yoon, S.S.; Choi, J.Y. A Drug-Repositioning Screening Identifies Pentetic Acid as a Potential Therapeutic Agent for Suppressing the Elastase-Mediated Virulence of Pseudomonas Aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7205–7214, doi:10.1128/AAC.03063-14.
71. Cigana, C.; Castandet, J.; Sprynski, N.; Melessike, M.; Beyria, L.; Ranucci, S.; Alcalá-Franco, B.; Rossi, A.; Bragonzi, A.; Zalacain, M.; et al. Pseudomonas Aeruginosa Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 620819, doi:10.3389/fmicb.2020.620819.
72. Bianconi, I.; Jeukens, J.; Freschi, L.; Alcalá-Franco, B.; Facchini, M.; Boyle, B.; Molinaro, A.; Kukavica-Ibrulj, I.; Tümmler, B.; Levesque, R.C.; et al. Comparative Genomics and Biological Characterization of Sequential Pseudomonas Aeruginosa Isolates from Persistent Airways Infection. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 1105, doi:10.1186/s12864-015-2276-8.
73. Poncz, L.; Gerken, T.A.; Dearborn, D.G.; Grobelny, D.; Galaray, R.E. Inhibition of the Elastase of Pseudomonas Aeruginosa by N Alpha-Phosphoryl Dipeptides and Kinetics of Spontaneous Hydrolysis of the Inhibitors. *Biochemistry* **1984**, *23*, 2766–2772, doi:10.1021/bi00307a036.
74. Kessler, E.; Israel, M.; Landshman, N.; Chechick, A.; Blumberg, S. In Vitro Inhibition of Pseudomonas Aeruginosa Elastase by Metal-Chelating Peptide Derivatives. *Infect. Immun.* **1982**, *38*, 716–723, doi:10.1128/iai.38.2.716-723.1982.

75. Cathcart, G.R.; Gilmore, B.F.; Greer, B.; Harriott, P.; Walker, B. Inhibitor Profiling of the *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor LasB Using N-Alpha Mercaptoamide Template-Based Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6230–6232, doi:10.1016/j.bmcl.2009.08.099.
76. Cathcart, G.R.A.; Quinn, D.; Greer, B.; Harriott, P.; Lynas, J.F.; Gilmore, B.F.; Walker, B. Novel Inhibitors of the *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor LasB: A Potential Therapeutic Approach for the Attenuation of Virulence Mechanisms in Pseudomonas Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2670–2678, doi:10.1128/AAC.00776-10.
77. Burns, F.R.; Paterson, C.A.; Gray, R.D.; Wells, J.T. Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase and *Pseudomonas Keratitis* Using a Thiol-Based Peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2065–2069, doi:10.1128/AAC.34.11.2065.
78. Velázquez-Libera, J.L.; Murillo-López, J.A.; F de la Torre, A.; Caballero, J. Structural Requirements of N-Alpha-Mercaptoacetyl Dipeptide (NAMdP) Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor LasB: 3D-QSAR, Molecular Docking, and Interaction Fingerprint Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E6133, doi:10.3390/ijms20246133.
79. Kany, A.M.; Sikandar, A.; Haupenthal, J.; Yahiaoui, S.; Maurer, C.K.; Proschak, E.; Köhnke, J.; Hartmann, R.W. Binding Mode Characterization and Early in Vivo Evaluation of Fragment-Like Thiols as Inhibitors of the Virulence Factor LasB from *Pseudomonas Aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 988–997, doi:10.1021/acsinfectdis.8b00010.
80. Konstantinović, J.; Yahiaoui, S.; Alhayek, A.; Haupenthal, J.; Schönauer, E.; Andreas, A.; Kany, A.M.; Müller, R.; Koehnke, J.; Berger, F.K.; et al. N-Aryl-3-Mercaptosuccinimides as Antivirulence Agents Targeting *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase and *Clostridium Collagenases*. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 8359–8368, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00584.
81. Kaya, C.; Walter, I.; Yahiaoui, S.; Sikandar, A.; Alhayek, A.; Konstantinović, J.; Kany, A.M.; Haupenthal, J.; Köhnke, J.; Hartmann, R.W.; et al. Substrate-Inspired Fragment Merging and Growing Affords Efficacious LasB Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, *61*, e202112295, doi:10.1002/anie.202112295.
82. Grobelyny, D.; Poncz, L.; Galardy, R.E. Inhibition of Human Skin Fibroblast Collagenase, Thermolysin, and *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase by Peptide Hydroxamic Acids. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7152–7154, doi:10.1021/bi00146a017.
83. Garner, A.L.; Struss, A.K.; Fullagar, J.L.; Agrawal, A.; Moreno, A.Y.; Cohen, S.M.; Janda, K.D. 3-Hydroxy-1-Alkyl-2-Methylpyridine-4(1H)-Thiones: Inhibition of the *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor LasB. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 668–672, doi:10.1021/ml300128f.
84. Kany, A.M.; Sikandar, A.; Yahiaoui, S.; Haupenthal, J.; Walter, I.; Empting, M.; Köhnke, J.; Hartmann, R.W. Tackling *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence by a Hydroxamic Acid-Based LasB Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2449–2455, doi:10.1021/acscchembio.8b00257.
85. Konstantinovic, J.; Kany, A.M.; Alhayek, A.; Abdelsamie, A.S.; Sikandar, A.; Voos, K.; Yao, Y.; Andreas, A.; Shafiei, R.; Loretz, B.; et al. Inhibitors of the Elastase LasB for the Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infections 2023.
86. Leiris, S.; Davies, D.T.; Sprynski, N.; Castandet, J.; Beyria, L.; Bodnarchuk, M.S.; Sutton, J.M.; Mullins, T.M.G.; Jones, M.W.; Forrest, A.K.; et al. Virtual Screening Approach to Identifying a Novel and Tractable Series of

- Pseudomonas Aeruginosa Elastase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 217–227, doi:10.1021/acsmchemlett.0c00554.
87. Everett, M.J.; Davies, D.T.; Leiris, S.; Sprynski, N.; Llanos, A.; Castandet, J.M.; Lozano, C.; LaRock, C.N.; LaRock, D.L.; Corsica, G.; et al. Chemical Optimization of Selective Pseudomonas Aeruginosa LasB Elastase Inhibitors and Their Impact on LasB-Mediated Activation of IL-1 β in Cellular and Animal Infection Models. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9*, 270–282, doi:10.1021/acsinfecdis.2c00418.
 88. Fullagar, J.L.; Garner, A.L.; Struss, A.K.; Day, J.A.; Martin, D.P.; Yu, J.; Cai, X.; Janda, K.D.; Cohen, S.M. Antagonism of a Zinc Metalloprotease Using a Unique Metal-Chelating Scaffold: Tropolones as Inhibitors of P. Aeruginosa Elastase. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49*, 3197–3199, doi:10.1039/c3cc41191e.
 89. Galdino, A.C.M.; Viganor, L.; de Castro, A.A.; da Cunha, E.F.F.; Mello, T.P.; Mattos, L.M.; Pereira, M.D.; Hunt, M.C.; O’Shaughnessy, M.; Howe, O.; et al. Disarming Pseudomonas Aeruginosa Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.01701.
 90. Santajit, S.; Kong-Ngoen, T.; Chongsa-Nguan, M.; Boonyuen, U.; Pumirat, P.; Sookrung, N.; Chaicumpa, W.; Indrawattana, N. Human Single-Chain Antibodies That Neutralize Elastolytic Activity of Pseudomonas Aeruginosa LasB. *Pathog. Basel Switz.* **2021**, *10*, 765, doi:10.3390/pathogens10060765.
 91. Kumar, M.; Sarma, D.K.; Shubham, S.; Kumawat, M.; Verma, V.; Nina, P.B.; Jp, D.; Kumar, S.; Singh, B.; Tiwari, R.R. Futuristic Non-Antibiotic Therapies to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 609459, doi:10.3389/fmicb.2021.609459.
 92. Mindt, B.C.; DiGiandomenico, A. Microbiome Modulation as a Novel Strategy to Treat and Prevent Respiratory Infections. *Antibiot. Basel Switz.* **2022**, *11*, 474, doi:10.3390/antibiotics11040474.
 93. Yuan, Y.; Rosado-Lugo, J.D.; Zhang, Y.; Datta, P.; Sun, Y.; Cao, Y.; Banerjee, A.; Parhi, A.K. Evaluation of Heterocyclic Carboxamides as Potential Efflux Pump Inhibitors in Pseudomonas Aeruginosa. *Antibiot. Basel Switz.* **2021**, *11*, 30, doi:10.3390/antibiotics11010030.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2022 / 2023

Nom : Camberlein
Prénom : Virgyl

Titre de la thèse : L'Elastase LasB : une cible attractive pour lutter contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa*

Mots-clés : Bactérie Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiorésistance, Anti-virulence, Elastase LasB, Métalloprotéase à zinc, Phosphoramidate, Thiol, Acide carboxylique, Acide hydroxamique, Acide phosphonique.

Résumé :

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* représentent un problème de santé majeur, en particulier chez les immunodéprimés ou les patients souffrant de maladies chroniques. Elles sont difficiles à traiter en raison de la résistance de cette bactérie à de nombreuses classes d'antibiotiques, d'où la nécessité de nouvelles thérapeutiques.

Afin de satisfaire ce besoin, de nouvelles stratégies sont apparues comme celle consistant à cibler la virulence des bactéries afin de « désarmer » celles-ci. LasB représente une cible thérapeutique de choix de par sa localisation extracellulaire et ses implications physiopathologiques (colonisation, invasion, échappement à la réponse immunitaire, formation de biofilm, etc.).

Ce mémoire permet, tout d'abord, de comprendre pourquoi *P. aeruginosa* est une bactérie hautement menaçante. Ensuite, une étude détaillée de LasB y est présentée avant une mise en évidence de celle-ci comme cible thérapeutique prometteuse pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa*. Enfin, une exploration des différentes classes d'inhibiteurs décrites dans la littérature a été réalisée, présentant les structures chimiques, les modes de liaison, les puissances, sélectivités, etc.

Membres du jury :

Président : Pr. DEPREZ Benoit, Professeur des Universités, Laboratoire U1177, Faculté de Pharmacie de Lille

Directeur de thèse : Pr. DEPREZ-POULAIN Rebecca, Docteur en Pharmacie, Professeur des Universités, Laboratoire U1177, Faculté de Pharmacie de Lille

Membre extérieur : Dr. ALCAIDE-VEREZ, Docteur en Pharmacie, Pharmacien d'officine, Pharmacie des Glacis à Dunkerque