

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

ABDELLI Oussama

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces encadrant le gène *DEFA1* exprimé par le macrophage au cours des infections par *Pseudomonas aeruginosa*

Soutenu le 22 juin 2023, devant le jury composé de :

Président	BENMANSOUR Souheila	MAA	Université de Tlemcen
Encadrant	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Résumé

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie pathogène responsable d'infections aiguës ou chroniques. Le macrophage est en première ligne de la défense immunitaire innée qui permet d'éliminer ce pathogène par plusieurs mécanismes. Cette cellule peut produire des substances antimicrobiennes qui ont un effet bactéricide. Ces substances sont nommées peptides antimicrobiens, telles que les défensines qui sont codées par le gène *DEFA1*.

Objectif : Concevoir des amorces pour le gène *DEFA1* exprimé par le macrophage afin d'étudier son rôle au cours des infections à *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques pour le gène *DEFA1*, nous avons utilisé des outils de bioinformatique. La base de données www.ensembl.org a été utilisée pour rechercher des séquences spécifiques du gène *DEFA1* et l'outil de primer-blast fourni par NCIB a été utilisé pour concevoir des amorces. Les résultats ont été confirmés par *in silico* PCR .

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *DEFA1* à savoir : F primer CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC, R primer CTGCTGAGACCCAACTCTGG avec un produit spécifique de 353 pb, Tm (F primer 59,83°C, R primer : 60,04°C), la teneur en GC est de 60% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusions : Concevoir une bonne paire d'amorces aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène *DEFA1* et l'étude de son rôle au cours des infections bactériennes.

Mots clé : *P. aeruginosa*, macrophage, *DEFA1*, , Primer-BLAST, amorces.

Abstract

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) is a pathogenic bacterium responsible for acute or chronic infections. the macrophage is at the forefront of the innate immune defense which eliminates this pathogen by several mechanisms. this cell can produce antimicrobial substances that have a bactericidal effect. these substances are called antimicrobial peptides, such as the defensins which are encoded by the *DEFA1* gene.

Objective: to design primers for the *DEFA1* gene expressed by the macrophage in order to study its role during *P. aeruginosa*.

Material and methods: in order to design specific primers for the *DEFA1* gene, we used bioinformatics tools. the www.ensembl.org database was used to search for specific sequences of the *DEFA1* gene and the primer-blast tool provided by NCIB was used to design primers. the results were confirmed by in silico PCR.

Results: the use of the primer-blast tool made it possible to obtain a primer specific to the *DEFA1* gene, namely: F primer CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC, R primer CTGCTGAGACCAACTCTGG with a specific product of 353 bp, Tm (F primer 59.83°c , R primer: 60.04° c), the GC content is 60% for the sense primer and 60% for the antisense primer and a length of 20 nucleotides for the two primers.

Conclusions: designing a good pair of primers helps to succeed in the PCR technique, and therefore the correct amplification of the *DEFA1* gene and the study of its role during bacterial infections.

Keywords: *P. aeruginosa*, Macrophage, *DEFA1*, Primer-BLAST, primers.

ملخص

ملخص

مقدمة: الزائفة الزنجارية (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا ممرضة مسؤولة عن العدوى الحادة أو المزمنة. تعد البلاعم في طليعة الدفاع المناعي الفطري الذي يقضي على هذا العامل الممرض بعدة آليات. يمكن أن تنتج هذه الخلية مواد مضادة للميكروبات لها تأثير مبيد للجراثيم. هذه المواد تسمى الببتيدات المضادة للميكروبات ، مثل الديفينسين التي يتم ترميزها بواسطة الجين *DEFA1* .

الهدف: تصميم بادئات للجين *DEFA1* الذي يعبر عنه البلاعم لدراسة دوره خلال ص. الزنجارية.

المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات محددة للجين *DEFA1* ، استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية. ثم استخدام قاعدة بيانات www.Ensemble.org للبحث عن تسلسلات محددة من الجين *DEFA1* وتم استخدام أداة التفجير التمهيدي التي يوفرها NCIB لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج في *silico PCR*.

النتائج: أتاح استخدام أداة التمهيدي التفجير الحصول على أساس خاص بجين *DEFA1* ، وهو: F primer ، وهو: R primer CTGCTGAGACCAACTCTGG•TTGTCTCCGAGCCTTCTCC ، مع منتج محدد 353 bp ، Tm (F) التمهيدي 59.83 درجة مئوية، R التمهيدي : 60.04 درجة مئوية) ، محتوى GC هو 60% لبادئ الحاسة و 60% للبادئ المضاد للمعنى وبطول 20 نيوكليوتيد للبادئين.

الاستنتاجات: تصميم زوج جيد من البادئات يساعد على النجاح في تقنية PCR ، وبالتالي التضخيم الصحيح للجين *DEFA1* ودراسة دوره أثناء الالتهابات البكتيرية.

الكلمات الرئيسية: ص. الزنجارية ، الضامة ، *DEFA1* ، Primer-BLAST ، التمهيدي.

Avant-propos

Je remercie Allah le tout puissant de m'avoir guidé, maintenu en santé, et donné la foi et le courage pour accomplir ce travail

J'exprime ma profonde gratitude et mon respect à mon encadrant, Dr. Nouari Wafa, pour son encadrement, ses conseils et ses sacrifices afin d'offrir le meilleur et pour son suivi, sa disponibilité et sa bienveillance durant la période de préparation de mon mémoire de fin d'étude. J'aimerais aussi le remercier pour ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail

Mes vifs remerciements pour les membres du jury, à commencer par : Madame la professeur BENMANSOUR Souheila, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury de ce mémoire, merci pour votre confiance. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance. Dr. MILIANI Marwa pour l'intérêt qu'elle a porté à cette recherche en acceptant d'examiner ce modeste travail pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire Biomolim

Je remercie tous mes amis et collègues de la spécialité Immunologie pour le soutien et les encouragements

Je dédie ce travail à ma mère et à mon frère, ainsi qu'à tous les membres de ma famille qui ont su me réconforter avec les mots justes et à tous ceux qui m'ont aidé et soutenu

Je remercie mes chers ami(e)s : abdel samad, imran, lina, radwan et toutes les personnes que j'admire.

Table des matières

Table des matières

Résumé	II
Abstract	III
Résumé en Arabe	IV
Avant-propos	V
Table des matières	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	IX
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.1. Généralités	2
1.1.2. Morphologie et structure	2
1.1.3. Epidémiologie	3
1.1.4. Physiopathologie	3
1.1.5. Mécanismes de résistances aux antibiotique	3
1.1.6. Caractères biochimiques	5
1.1.7. Caractères génomiques	6
1.1.8. Facteurs de virulence	6
1.1.9. Biofilm	14
1.2. Macrophages	16
1.2.1. Généralités	16
1.2.2. Origine des Macrophages	16
1.2.3. Macrophages résidents	17
1.2.4. Morphologie	17
1.2.5. Polarisation	18
1.2.6. Macrophages M1	19
1.2.7. Macrophages M2	19
1.2.8. Propriétés antimicrobiennes des macrophages	20
1.2.9. Macrophages et homéostasie tissulaire	22
1.2.10. Macrophages dans l'homéostasie métabolique	22

Table des matières

1.2.11.	23
1.2.12.	24
1.2.13.	25
1.2.14.	26
1.2.15. Marqueurs membranaire du Macrophages	26
1.2.16. Phagocytose	27
1.2.17. Rôle des macrophages dans l'élimination du <i>P. aeruginosa</i>	27
1.3. Défensines	28
1.3.1. Généralités	28
1.3.2. Gène <i>DEFA1</i>	28
1.3.3. Protéine DEFA1	29
1.3.4. Structure	29
1.3.5. Rôles	29
1.3.6. Défensines : composants clés de l'immunité innée et adaptative	30
1.3.7. Défensines et élimination de <i>P. aeruginosa</i>	31
1.4. PCR	32
1.4.1. Définition	32
1.4.2. Acteurs de la PCR	33
1.4.3. Type de la PCR	33
1.4.4. Choix des amorces de PCR	33
1.4.5. Critères de choix de bonnes amorces	33
1.5. Problématique et objectif	34
1.5.1. Problématique	34
1.5.2. Objectif	34
1.5.3. But	34
Chapitres 2. Matériel et méthodes	34
2.1. Conception d'amorces	34
2.2. Critères de sélection d'amorces	34
2.3. La longueur d'amorces	35
2.4. La Température du fusion (Tf)	37
2.5. La spécificité et la complémentarité	40
2.6. La teneur en C/G	41
2.7. La séquence de gène DEFA1	41

Table des matières

2.8. Le design des Primers : outil Primer-Blast	44
2.9. In-silico PCR	46

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats du Primer-BLAST	
--------------------------------	--

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 5. Références bibliographiques

Table des matières

Liste des figures

Figure 1.1. Souches cliniques de <i>P.aeruginosa</i> montrant la production de pyoverdine de pyocyanine, et pyomélanine	05
Figure 1.2. La représentation Circulaire du génome du <i>P.aeruginosa</i> POA1 généré avec Www.patricbrc.org	06
Figure 1.3. Structure d'un flagelle d'une bactérie Gram-négatives	07
Figure 1.4. La structure en ruban de l'exotoxine A (ETA) de <i>P.aeruginosa</i> définissant ses domaines structuraux et fonctionnels	10
Figure 1.5. Mécanismes de régulation de QS	14
Figure 1.6. Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm	15
Figure 1.7. Origine des Macrophages	17
Figure 1.8. Polarisation des macrophages M1 et M2	18
Figure 1.9. Réaction chimique de production du NO	21
Figure 1.10. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire au repos et sous forme active	21
Figure 1.11. Réponse antimicrobiennes médiées par le macrophage	26
Figure 1.12. Localisation du gène <i>DEFA1</i> sur le chromosome 8 humain	27
Figure 1.13. Structure en 3D de la molécule <i>DEFA1</i>	28
Figure 1.14. Étapes de la PCR	31
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	35
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène <i>DEFA1</i> .	35
Figure 2.3. Caractéristiques du gène <i>DEFA1</i> .	36
Figure 2.4. La séquence du gène <i>DEFA1</i> depuis la plateforme « Ensembl ».	36
Figure 2.5. La séquence d'intérêt	37
Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.	37
Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST	38
Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST.	38
Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters.	39
Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ».	40
Figure 2.11. L'outil in silico-PCR	40

Table des matières

Figure 3.1. Les amorces.	41
Figure 3.2. Caractéristiques de la paire d'amorces choisie.	42
Figure 3.3. Confirmation des résultats par in silico-PCR.	43

Table des matières

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	2
Tableau 1.2. Différentes propriétés biologiques et physiologiques des sous populations des macrophages	20
Tableau 1.3. Marqueurs du macrophage M1 humain.	23
Tableau 1.4. Marqueurs des macrophages M2 humain	24
Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce.	42

Liste des abréviations

Liste des abréviations

A

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : L'adénosine monophosphate cyclique

Algd : GDP-mannose 6-dehydrogenase.

Algt : facteur sigma AlgT régulateur principal des gènes de la biosynthèse des alginates

AprA : La protéase alcaline

ADP: adénosine diphosphate

Arg-1 : Arginase-1

ADPRT : adénosine diphosphate ribosyl transférase

C

CupA: Chaperone Usher Path Way A

CFTR: régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique

C1q: complement component 1q

CRK-I: régulateur CT10 de kinase I

CRK-II: régulateur CT10 de kinase II

CMP: cytidine monophosphate

CPA: cellule Présentatrice d'antigène

CMH-II: complexe majeur

d'histocompatibilité

CR: Récepteur du complément

CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand

CCR5 : Récepteur de chimiokine C-C type

5

CD : cluster de différenciation

CSF1R : Récepteur du facteur 1 stimulant les colonies

CCL : C-C Motif Chemokine Ligand

C4-hsl : n-butanoyl-l-homosérine lactone

D

DNGR-1 : récepteur de groupe de lectine de cellules dendritiques NK 1

DEFA1 : défensines alpha-1

dNTPs: DésoxyNucléotides-Triphosphates

E

EPS : Substances de polymérisation extracellulaire

EMP : progéniteurs érythro-myéloïdes

ETA : Exotoxin A

EF-2 : Facteur d'élongation cellulaire 2

ExoS: L'exoenzyme S

ExoT: L'exoenzyme T

ExoU: L'exoenzyme U

ExoY: L'exoenzyme Y

F

Fe³⁺ : Ion de fer.

FAD : Di-nucléotide d'adénine de flavine

FcR : Récepteur FC

FT : Facteur de transcription

Fizz1 : Resistin-like- α

Fc: fragment cristallisé

FK : fibrose kystique

G

GMP : précurseurs de granulocyte/macrophages

GM-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

G-CSF: (Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor)

H

HNP : peptides neutrophiles humains

Liste des abréviations

I

IFN- γ : interféron-gamma

IL-6 : interleukine-6

IL-8 : Interleukine 8

IL-10 : interleukine-10

IL-4Ra : récepteur de IL-4a

IL-10R : récepteur de IL-10

IgA : immunoglobuline A

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IRF : interferon regulatory factor

K

KDO : acide 2-céto-3-désoxyoctanique

L

LPS : Lipopolysaccharide

LPC : phospholipases C

LasA : protéase

LasB : elastase

M

MexABC-oprj : Surproduction de systèmes d'efflux multidrogue

MEVAG : milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides

Mincle : Macrophage-inducible C-type lectin

MEP : muqueuse exopolysaccharidique

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

M1 : macrophage classiquement activé/pro inflammatoire

M2 : macrophage alternativement activé/réparateur

MO : membrane externe

N

Nor-NOHA : Nw-hydroxypheny-quinolone

Nk : natural killer

NF- κ B : facteur nucléaire kappa B (nuclear factor-kappa B)

NADPH : nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate

nNOS: NOS neuronale

NO: monoxyde d'azote (nitric oxide)

NOD : autoimmune disease-susceptible non obese diabetic

NOS: NO synthase

NCBI : Centre national d'information de la biotechnologie

O

OS : ostéoclastes

OddhL : n-(3-oxododécanoyl-l-hsL)

O₂⁻ : superoxyde

OH⁻ : radicaux hydroxyl

P

PAO1: *Pseudomonasa aeruginosa*
Pathogène opportuniste

PQS: 2(2-hydroxypheny-quinolone)

PvD: pyoverdine

PcH: pyocheline

PEA: *P.aeruginosa* exotoxin A

PKC: protéine kinase C

pH: potentiel hydrogène

PCR: polymerase chain reaction

pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes

Q

QS : quorum-sensing

R

RL : Rhamnolipides

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

Liste des abréviations

RT-PCR : reverse-transcriptase-polymerase chain reaction

Sp-a : protéine du surface A

Sp-d : protéine du D

SNC : système nerveux central

STAS : transducteur de signal et l'activateur de la transcription

T

TLR5 : Les récepteurs de type Toll 5

TLR4 : Les récepteurs de type Toll 4

TNF- α : Facteur de nécrose tumoral alpha

T2SS : Type II sécrétion système

T3SS : Type III sécrétion système

TAK1 : Transformer la kinase activée 1

TH1 : Cellule T helper 1

TH2 : Cellule T helper 2

TGF- β :facteur de croissance transformant beta

U

UMP : uridine monophosphate

V

VEGR : facteur de croissance d'endothélium vasculaire

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) longtemps considéré comme un microorganisme hautement opportuniste, est maintenant clairement reconnu comme un pathogène majeur chez les patients immunodéprimés (Pier et Ramphal., 2005). Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif hautement mobile, aérobie stricte avec des profils de multi-résistance. Sa tendance à provoquer des infections chez les hôtes immunodéprimés, son extrême polyvalence, sa résistance aux antibiotiques et son large éventail de facteurs de virulence en font un pathogène extrêmement difficile à traiter en médecine moderne (Wilson et Pandey, 2023).

Les macrophages, phagocytes mononucléaires, sont l'une des premières lignes de défense du système immunitaire (Wu et al., 2017; Khan et al., 2019). En réponse à différents stimuli, ces cellules peuvent se différencier en deux phénotypes distincts, les macrophages activés classiquement (M1) et les macrophages activés alternativement (M2) (Wang et al., 2019). Les macrophages M1 sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (Wang et al., 2014) et ont été associés à des activités inflammatoires, antimicrobiennes et tumoricides (Y. Wang et al., 2019). En revanche, les macrophages M2 produisent des cytokines et des chemokines impliquées dans la réponse anti-inflammatoire et favorisent la réparation des tissus (Wu et al., 2017).

Les défensines sont une famille de peptides antimicrobiens et cytotoxiques supposés être impliqués dans la défense de l'hôte. Cet agent antimicrobien est sécrété par les neutrophiles, les cellules épithéliales et le macrophage alvéolaire, et est également présent dans l'épithélium des surfaces muqueuses telles que l'intestin, les voies respiratoires, les voies urinaires et le vagin. La famille des défensines regroupe deux molécules : α -défensines et β -défensines qui sont codées par le *DEFA1* du chromosome 8 (F. Wang et al., 2016). L'étude de son expression par le macrophage au cours des infections a fait l'objet de plusieurs études.

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR, *polymerase chain reaction*) est une technique d'amplification enzymatique qui permet, à partir d'un petit fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre de copies identiques de ce fragment. La réalisation de cette technique nécessite les acteurs suivants : ADN, amorces, Taq polymérase et nucléotides. La PCR est largement utilisée en biologie pour détecter le gène responsable de maladies (Kadri, 2020).

Dans cette optique, l'objectif de ce travail est de concevoir des amorces pour le gène *DEFA1*, qui est exprimé par le macrophage afin d'étudier son implication dans l'immunité anti-infectieuse.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Généralités

En 1882, Carl Gisar, un chimiste et bactériologiste français, a découvert *Pseudomonas aeruginosa* (*P. areuginosa*) après une série d'expériences qui ont identifié ce micro-organisme par un pigment soluble dans l'eau qui virait au bleu-vert lorsqu'il était exposé à la lumière (Yeterian et al., 2010).

P. aeruginosa, initialement connu sous le nom de *Bacillus pyocyaneus*, est une bactérie polyvalente omniprésente dans l'environnement. Elle est fréquente dans le sol et l'eau, ainsi que sur les surfaces qui entrent en contact avec ces milieux. L'étymologie du mot *Pseudomonas* vient des mots grecs pseudo (qui signifie imitation) et monas (qui signifie unité). Le mot latin *aeruginosa*, qui se traduit par "herbe verte", fait référence au pigment bactérien qui donne à la colonie sa couleur unique. *P. aeruginosa* est une espèce de pseudomonas, avec 12 autres membres (Yeterian et al., 2009). Sa taxonomie est représentée dans le (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Taxonomie de *P. aeruginosa* (BENABID, 2009).

Embranchement	Prokaryota
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	Pseudomonas
Espèce	Aeruginosa

1.1.2. Morphologie et structure

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif d'une taille de 1 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. La majorité des souches sont mobiles avec un seul flagelle polaire, par contre, d'autres ont deux ou trois flagelles. La paroi cellulaire de cette bactérie est composée de trois couches : la membrane interne ou cytoplasmique, la couche de peptidoglycane et la membrane externe. Cette dernière est constituée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides (LPS). De plus, la membrane de cette bactérie se compose de plusieurs pompes d'efflux, dont mexA-mexB-opm et mexC-mexD-oprJ, qui

Chapitre 1. Revue de la littérature

jouent un rôle important dans l'injection de médicaments antimicrobiens (Xavier et al., 2010; Mulcahy et al., 2014).

1.1.3. Épidémiologie

Les infections à *P. aeruginosa* sont courantes chez les patients immunodéprimés atteints de la fibrose kystique, la bronchiectasie, la neutropénie, les brûlures, le cancer, le Sida, la transplantation d'organes, le diabète et aussi les patients admis dans des unités de soins intensifs et portant des dispositifs invasifs comme des cathéters ou des tubes endotrachéaux (Mulcahy et al., 2014) .

L'étude de l'épidémiologie hospitalière de *P. aeruginosa* est basée sur deux méthodes de génotypage complémentaires : électrophorèse sur gel de champ pulsé pour l'épidémiologie locale et le typage de séquence multilocus pour une approche macro-épidémiologique.

1.1.4. Physiopathologie

P. aeruginosa est un agent pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves et mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. Il induit des bactériémies et des infections des voies entéro-respiratoires et est impliqué dans les méningites et les ostéomyélites en infectant le système nerveux central et structures osseuses (Ben Haj Khalifa et al., 2011).

Un large éventail de maladies causées par *P. aeruginosa* et le traitement difficile et croissant requis en raison de la résistance antimicrobienne du corps s'expliquent collectivement par le fait que la bactérie possède de nombreux mécanismes de résistance et divers facteurs de virulence. La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques a été attribuée à un certain nombre de mécanismes, notamment la résistance intrinsèque aux antibiotiques, les mécanismes d'efflux et les enzymes qui rendent les antibiotiques inactifs (Pang et al., 2019).

1.1.5. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est une autre caractéristique de la colonisation chronique des isolats pulmonaires FK (Bianconi et al., 2019). *P. aeruginosa* est intrinsèquement résistante aux antibiotiques en raison de la perméabilité particulièrement faible des MO et de la présence de pompes à efflux de médicaments, de purines et de β -lactamases (Pang et al., 2019). Cependant, des mutations pathologiques et des micromutations dans les gènes codants surviennent après un traitement médicamenteux intensif (Castanheira et al., 2014), entraînant une surexpression des pompes à efflux, des cibles antibiotiques altérées et une surproduction de β -lactamases (c) une diminution de la perméabilité de l'OM en raison de la

Chapitre 1. Revue de la littérature

perte de purpurine (Freschi et al., 2018). La résistance aux antibiotiques induite par la mutation est étroitement associée à une sur stimulation (López-Causapé et al., 2015). En outre, des adaptations telles que la surproduction de gènes et la formation de biofilms, et des modifications du LPS (corrélation Lipid aminotransferase A and loss of OPS) (Huszczynski et al., 2019), et les mutations QS contribuent toutes à la résistance aux antibiotiques, et *P.aeruginosa* développe généralement un phénotype multirésistant, évitant ainsi l'éradication bactérienne (Jurado-Martín et al., 2021).

1.1.5.1. Résistance acquise

La résistance acquise est une conséquence de l'exposition aux antibiotiques, qui conduit à la sélection de mutations génétiques chromosomiques ou à l'acquisition horizontale d'éléments génétiques (plasmides, transposons, entre autres) (Breidenstein et al., 2011). Par exemple, les plasmides ne contiennent pas de gènes essentiels au fonctionnement bactérien dans des conditions normales, mais contiennent des gènes avantageux pour la croissance et la multiplication bactériennes dans des conditions défavorables, telles que les gènes de résistance aux antibiotiques, de résistance aux métaux lourds et de virulence (Rodriguez-Valera et al., 2016). Bien que l'acquisition de gènes de résistance ne soit pas aussi fréquente chez *P. aeruginosa* comme dans de nombreuses autres bactéries, il a été démontré qu'elle acquiert des carbapénémases codées par un plasmide (métallo- β -lactamases simples) capables d'hydrolyser la plupart des β -lactamines, y compris les carbapénèmes (Umadevi et al., 2011).

L'interférence avec les cibles antibiotiques est également une stratégie courante que les bactéries utilisent pour empêcher l'action des antibiotiques. Par exemple, la modification des sites cibles des quinolones est l'un de ces mécanismes de résistance. Les quinolones inhibent la réplication de l'ADB bactérien en ciblant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Munita et Arias, 2016).

1.1.5.2. Résistance adaptative

La résistance adaptative dépend des circonstances de croissance qui déclenchent des événements régulateurs dans la cellule, et la sensibilité s'inverse généralement lorsque les conditions inductrices sont supprimées. Elle est essentiellement induite par des stress environnementaux et par la présence d'antibiotiques spécifiques (Taylor et al., 2014). Chez *P. aeruginosa*, le mécanisme de résistance adaptative le mieux caractérisé est la formation de biofilm, associée au développement de la résistance aux polymyxines, aux aminosides et aux peptides antimicrobiens cationiques (Fernández et al., 2011).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.5. Caractères cultureux

P. aeruginosa peut vivre dans plusieurs températures, de 4°C à 42°C, et se porte bien à 37°C. Cette bactérie est capable de se développer de manière anaérobie sur certaines sources de carbone. C'est une bactérie aérobie stricte mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies comme récepteur final d'électron (LaBauve et Wargo, 2012).

Les colonies poussent en 24 heures et ont une forme aplatie avec un bord irrégulier et prennent avec le temps un aspect métallique irisé et se caractérisent par le parfum du syringa (aussi appelé poets jasmine). Trois types de colonies peuvent être distingués simultanément ou isolément à partir de milieux solides (Frigui et al., 2020) :

- ❖ "I" colonies de 2 à 3 mm de large à bord dentelé irrégulier, à partie centrale bombée à reflets métalliques.
- ❖ Colonies plus petites à dôme lisse "s" à bord régulier.
- ❖ Colonies muqueuses "M" gonflées, adhérentes et filamenteuses présentes dans les souches produisant une boue composée d'un polymère d'alginate.

1.1.6. Caractères biochimiques

1.1.6.1. Métabolisme et production de pigments

P. aeruginosa possède une oxydase ainsi qu'une nitrate-réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu'au stade de N gazeux), Un métabolisme oxydatif des sucres appréciable sur milieu MEVAG (milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) et une arginine-dihydrolase.

P. aeruginosa produit un certain nombre de pigments, notamment la pyoverdine (jaune-vert et fluorescent), la pyocyanine (bleu-vert), la pyorubrine (rouge-marron) et la pyomélanine (marron-noir) (Figure 1.1). Ces pigments sont impliqués dans de multiples phénomènes, tels que le *quorum sensing*, la virulence, les propriétés antioxydantes et d'acquisition du fer (Elbargisy, 2021). La plupart des colonies sont plates et étalées sur la surface de la gélose et produisent généralement deux pigments solubles : la pyocyanine (pigment de phénazine, soluble dans le chloroforme et l'eau), et la pyoverdine (insoluble dans le chloroforme mais soluble dans l'eau).

Chapitre 1. Revue de la littérature

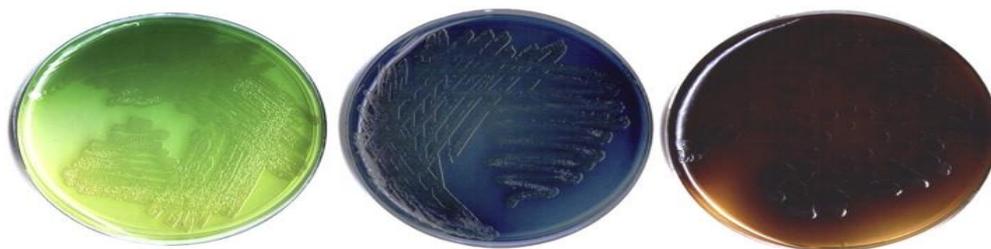


Figure 1.1. Souches cliniques de *P. aeruginosa* montrant la production de pyoverdine (vert), de pyocyanine (bleu), et pyomélanine (marron).

1.1.7. Caractères génomiques

Stotor et ses collaborateurs ont publié la séquence complète du genre *pao1* de *P. aeruginosa* en 2000. *P. aeruginosa* PAO1 est un génome très grand et complexe, codant pour 5700 gènes, dont 5584 brevets et 5584 cadres de lecture ouverts de brevets. Son génome a une taille d'environ 6,3 mbp (avec une teneur en G+C de 66,6 %) (Figure 1.2) (E. A. Ozer, Allen, et Hauser 2014). De plus, on estime que 150 gènes liés à l'adhérence, au mouvement, au risque et à la synthèse de facteurs de virulence se sont avérés codés dans le gène *Pao1* de *P. aeruginosa*. (Chevalier et al., 2017).

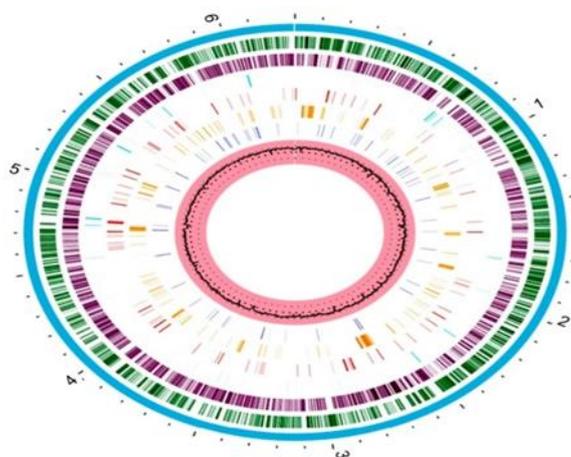


Figure 1.2. La représentation circulaire du génome du *P. aeruginosa* PAO1 généré avec www.patricbrc.org (consulté le 8 mai 2021). Ce génome contient environ 6,3 mbp. Le cercle rose qui contient un cercle noir au milieu est le pourcentage de contenu G + C (66,6%). Les barres pointillées bleues représentent les gènes qui codent pour les facteurs de virulence et la résistance aux antimicrobiens. Les cercles violets et verts sont représentés pour les régions de coda opposées et directes du genre. Le cercle bleu encercle tout le chromosome.

P. aeruginosa a un génome en mosaïque, composé de nombreux gènes centraux entrecoupés de blocs de gènes spécifiques à une souche (Freschi et al., 2018). À la suite d'études génomiques comparatives au sein de l'espèce, le génome de *P. aeruginosa* a été

Chapitre 1. Revue de la littérature

classé en trois groupes en fonction de ses caractéristiques: le génome central, le génome accessoire et le pan-génome (Freschi et al., 2019).

Les gènes de résistance de *P. aeruginosa*, tels que les pompes à efflux et les lactamases, sont situés dans le génome central (Sommer et al., 2020).

1.1.8. Facteurs de virulence

La virulence des agents pathogènes fait référence à leur capacité à infecter l'hôte et à provoquer des symptômes cliniques par le biais de facteurs favorisant l'attachement bactérien, la colonisation et l'invasion de l'hôte, la perturbation de l'intégration des tissus de l'hôte, la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte et l'épuisement des nutriments (Dickey et al., 2017; Diggle et Whiteley, 2020).

1.1.8.1. Facteurs de virulence de surface

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, les LPS et l'alginate.

1.1.8.1.1. Flagelle

Les flagelles de *P. aeruginosa* qui ressemblent à des poils tombants sur la surface bactérienne sont principalement constitués de sous-unités protéiques de type flagelline. Les flagelles fonctionnent comme un organe mobile qui permet le mouvement bactérien et la chimiotaxie. Par l'intermédiaire de la flagelline et de la protéine du flot du flagellum, les flagelles contribuent à l'adhésion bactérienne et au développement du biofilm (E. Ozer et al., 2021). Ils peuvent déclencher l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte *via* le récepteur de type Toll 5 (TLR5) et sont hautement immunogènes (Campodónico et al., 2010).

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire constitué d'un filament composé de flagelline polymérisée disposée de manière hélicoïdale (flic), d'une protéine de coiffe spécifique au type (flid), du crochet à la base du filament (flge), de deux filament-crochet protéines de jonction (flgkl) et un certain nombre de composants du corps basal à travers les membranes externes et internes (Figure 1.3) (Sampedro et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

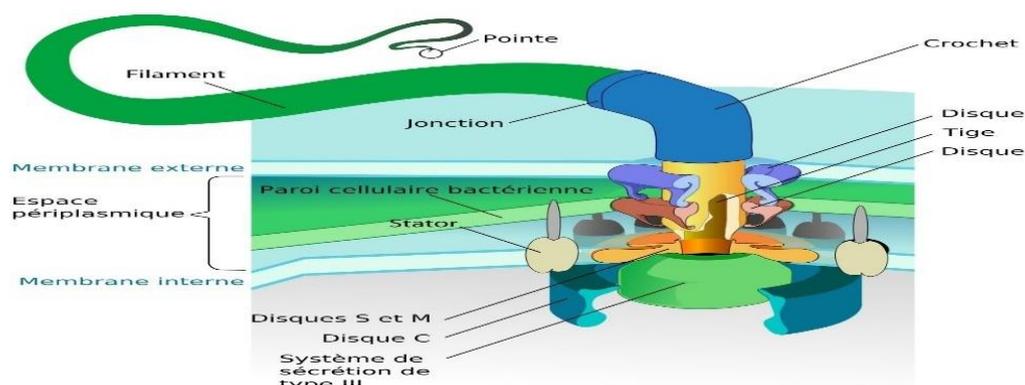


Figure 1.3. Structure d'un flagelle d'une bactérie à Gram négatif (Pallen et al., 2005)

1.1.8.1.2. Les pili de type IV

Les pili de *P. aeruginosa* de type IV sont des fimbriae motorisés constitués de copies répétées d'une protéine de 15 kDa connue sous le nom de piline. Il existe trois sous-types de pili: types IVa, types IVb, et types IVb-tad (Jacobsen et al., 2020). Les pili ont un rôle important dans la création du biofilm, la régulation des facteurs de virulence et le transfert bactérien des gènes de résistance aux prélèvements. Il est associé aux contractions, au mouvement et à l'adhésion des bactéries à diverses surfaces, à la motilité et à l'adhérence sur diverses surfaces (Talà et al., 2019). De plus, les pili de type IV permettent aux bactéries d'entrer en contact direct avec les surfaces et de contrôler le développement du biofilm en contrôlant les niveaux de molécules cycliques DI-GMP (Webster et al., 2021).

1.1.8.1.3. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Des recherches récentes ont révélé un nouveau facteur d'attachement chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type fimbriae qui sont assemblés par la voie "chaperone/usher pathway" (Cup). Trois systèmes de coupe, désignés CupA, CupB et CupC, ont été découverts chez *P.aeruginosa*. Ces facteurs d'attachement sont cruciaux pour l'adhésion aux surfaces biologiques et le développement du biofilm (Vallet et al., 2004).

1.1.8.1.4. Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, un agoniste bien connu et puissant qui induit une puissante réponse immunitaire inflammatoire innée, est un composant structural de la membrane externe de la majorité des bactéries Gram-négatif et peut être trouvé dans toutes les souches de *P. aeruginosa*. Le LPS est conceptualisé comme composé de trois domaines distincts : le lipide A, l'oligosaccharide de base et l'antigène O (également appelé polysaccharide O, O-antigène ou O-polysaccharide). Les scientifiques se sont initialement concentrés sur le

Chapitre 1. Revue de la littérature

développement de vaccins pour prévenir l'infection en ciblant les LPS, mais cela s'est avéré très difficile en raison de la variété des sérotypes et des résultats inefficaces (Maldonado et al., 2016).

Le LPS est un composant structural crucial au niveau de la surface pour protéger les cellules de l'hôte contre les dommages externes. Il constitue une barrière physique, intervient dans les interactions avec les récepteurs de l'hôte et cause des lésions tissulaires en raison de son activité endotoxique (Park et al., 2022). Enfin, le développement du biofilm et la tolérance aux antibiotiques peuvent être liés aux LPS (Chambers et al., 2017).

Le LPS peut être un puissant activateur de la réponse immunitaire de l'hôte à travers une variété de voies de transduction du signal, y compris le récepteur TLR4 et le régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). Les LPS peuvent également stimuler les neutrophiles à libérer des pièges de neutrophiles extracellulaires (filets) pour englober les agents pathogènes envahisseurs tout en épargnant les bactéries de la phagocytose (Huszczynski et al., 2019).

1.1.8.1.5. Alginate

L'alginate, également connu sous le nom de composant de muqueuse exopolysaccharidique (MEP), est l'EPS (Extracellular polymeric substances) Les substances polymères extracellulaires (EPS) sont reconnues comme le déterminant clé du processus de granulation pour maintenir la stabilité de la structure des boues granulaires aérobies, Et elle la plus étudié et une clé des biofilms muqueux de *P. aeruginosa*. Il s'agit d'un polymère asymétrique de haut poids moléculaire avec des variables de relation d'acide mannuronique et gluconique qui sont reliées par 1-4 et partiellement o-acétylées. Les enzymes de synthèse des alginates sont codées par l'opéron *algD* (Mann et al., 2012), dont l'expression est contrôlée par le facteur *algT*, dont la surexpression est efficace pour les surfaces muqueuses (Cross et al., 2020).

Bien qu'il ne soit pas nécessaire au développement du biofilm, cet exopolysaccharide est produit par les mucoïdes de *P. aeruginosa* et aide à la maturation, à la morphologie et à la stabilité du biofilm (Ghafoor et al., 2011). Il est nécessaire de se rappeler que l'alginate aide les bactéries à survivre en protégeant *P. aeruginosa* de la phagocytose par l'hôte dans les poumons et en assiégeant l'ERO libéré par les macrophages et les neutrophiles activés (Rybtke et al., 2020).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Enfin, vous pouvez interagir avec des antibiotiques appelés aminoglycosides, comme la tobramycine, pour modifier sa pénétration du biofilm et augmenter la résistance aux antibiotiques (Goltermann et al., 2017).

1.1.8.2. Les protéines sécrétées par *P.aeruginosa*

1.1.8.2.1. Les toxines sécrétées par le système de sécrétion de type I

- La protéase alcaline

La protéase alcaline, également connue sous le nom d'aeruginolysine, est une endopeptidase membranaire dépendante du zinc codée par le gène AprA (Galdino et al., 2019; Li et Lee, 2019). En plus de dégrader l'interféron gamma (Interferon-gamma, l'IFN- γ) et le Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNF- α), l'AprA a également la capacité de dégrader les composants du complément (C1q, C2 et C3), d'altérer le système immunitaire de l'hôte et d'exacerber les infections endogènes, permettant ainsi l'échappement phagocytaire (Iiyama et al., 2017). La protéase IV est significativement associée à la virulence cornéenne de *P. aeruginosa* (Bradshaw et al., 2018). En plus d'affecter le système immunitaire de l'hôte en décomposant de nombreuses molécules biologiquement importantes, telles que le composant du complément, l'immunoglobuline et les précurseurs de protéines de surfactant, la protéase IV peut également endommager les tissus de l'hôte et aggraver l'infection bactérienne en décomposant le fibrinogène, la lactoferrine, transferrine et élastine (O'Callaghan et al., 2019).

1.1.8.2.2. Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II

- Exotoxine A

L'exotoxine A, une adp-ribosyl transférase sécrétée par le T2SS dans la majorité des isolats cliniques, est le facteur le plus toxique contribuant à la pathogénicité du *P.aeruginosa* (Javanmardi et al., 2019). Il est divisé en trois domaines structuraux importants et un domaine mineur. Le domaine n-terminal (ia) est composé principalement de brins β antiparallèles et est responsable de la fixation aux cellules hôtes; le domaine médian (ii), composé de six hélices α à activité de translocation membranaire; et le domaine c-terminal

Chapitre 1. Revue de la littérature

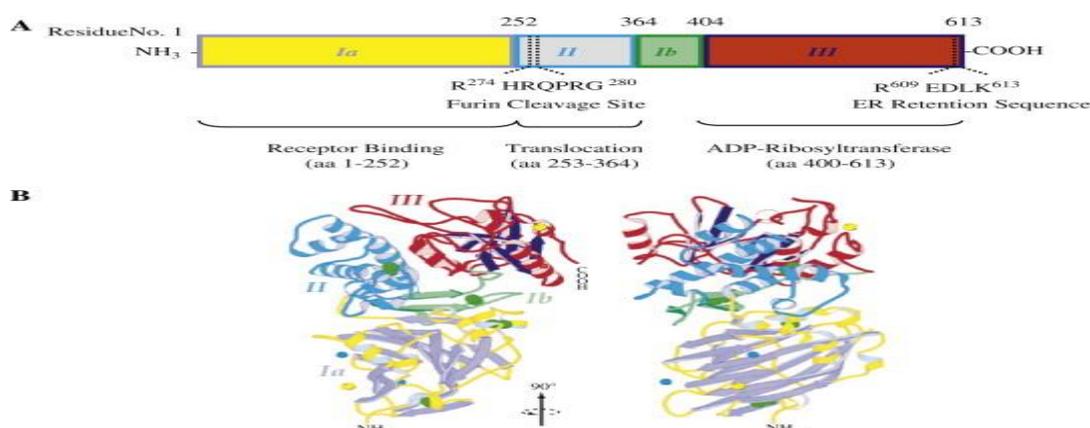


Figure 1.4 : structure en ruban de l'exotoxine A (ETA) de *P. aeruginosa* définissant ses domaines structuraux et fonctionnels

(iii) est le fragment toxique. Entre les domaines ii et iii, il existe un sous-domaine IB plus petit qui peut être éliminé sans que la toxine ne perde son activité. Le *P. aeruginosa* exotoxin A (PEA) inhibe la synthèse des protéines de l'hôte en catalysant la ribosylation de l'ADP du facteur d'élongation cellulaire 2 (EF-2), induit la mort cellulaire programmée (Michalska et Wolf 2015), inhibe la sécrétion de l'interleukine 18 (IL-18) et diminue la production du TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10)(Figure 1.4) (Schultz et al., 2000).

Figure 1.4. Structure en ruban de l'exotoxine A (ETA) de *P. aeruginosa* définissant ses domaines structuraux et fonctionnels.

Lorsque l'ETA est libéré dans l'environnement extracellulaire, il se lie aux cellules hôtes via le récepteur CD91 ou 2-macroglobuline, conduisant à l'internalisation à travers des fosses recouvertes de calathrine ou des microdomaines résistants aux détergents. Une fois à l'intérieur, il subit des changements conformationnels qui permettent son activité nécrotique irréversible au site de colonisation (Michalska et Wolf, 2015).

- Élastases

Sous le contrôle de la régulation au niveau du système, le T2SS séquestre les molécules élastiques lasa et lasb et dégrade l'élastine de l'hôte (Gellatly et Hancock, 2013).

Lasb élastase, également appelée « élastase » ou « pseudolysine », est une métalloprotéase dépendante du zinc de la famille des thermolysines qui est codée par le gène LASP. C'est la protéase la plus abondante et on pense qu'elle est le principal facteur de virulence extracellulaire (Galdino, A.C.M et al., 2017). En plus de son activité élastinolytique, il affecte également les jonctions d'autres protéines de l'hôte (Nomura et al.,

Chapitre 1. Revue de la littérature

2014), notamment comme les protéines tensioactives (sp-a et sp-d) (Kuang et al., 2011), les cytokines (TNF, IFN, IL-6 ou IL-2) (Bastaert et al. 2018), les immunoglobulines, et les composants de l'inflammasome (Yang et al., 2017), évitant la reconnaissance du TLR5 et supprimer l'activité des macrophages alvéolaires en contrôlant à un niveau inférieur la production de molécules clés et de récepteurs immunitaires inactifs (Bastaert et al., 2018). il affecte également la formation du biofilm par la régulation des rhamnolipides (RL) (Yu et al., 2014).

L'enzyme LasA, également connue sous le nom de protéase staphylolytique ou staphylolysine, agit conjointement avec l'enzyme LasB pour décomposer l'élastine (le composant principal du tissu pulmonaire). LasA décompose l'élastine, la rendant plus accessible à d'autres protéases telles que LasB, la protéase alcaline et l'élastase neutrophile. Récemment, l'expression de LasA a été corrélée à la résistance aux antibiotiques chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* (Krishnan, G et al., 2019).

- Phospholipases C (LPC)

La phospholipase est sécrétée par le T2SS et décompose les phospholipides membranaires eucaryotes et la sphingomyéline, et est produite par *P. aeruginosa* sous forme hémolytique et non hémolytique. De nombreuses études ont démontré que l'empoisonnement aux hémolytes peut entraîner la perméabilité vasculaire de l'hôte, des dommages aux organes et la mort cellulaire (Wargo et al., 2011). De faibles niveaux de LPC hypoxique peuvent augmenter l'expression de l'IL-8 et provoquer un recrutement excessif de neutrophiles impliqués dans l'inflammation pulmonaire et la destruction des tissus (Bezzetti et al., 2011).

De plus, l'hémolyte LPC inhibe l'éruption respiratoire des neutrophiles en interférant avec une voie de signalisation spécifique de la protéine kinase c (PKC) indépendante de la kinase p38, permettant à *P. aeruginosa* de survivre dans un environnement immunitaire riche en neutrophiles et, par conséquent, et donc une infection bactérienne chronique (Monturiol-Gross et al., 2021).

1.1.8.2.3. Les exotoxines sécrétées par le système de sécrétion de type III

ExoU, ExoT, ExoS et ExoY sont quatre toxines bien connues qui sont sécrétées via T3SS et présentent une toxicité variable dans divers tissus (Anantharajah et al., 2016).

ExoU est considérée comme la principale cytotoxine car elle a le plus grand impact sur la gravité de la maladie et est liée à des infections mortelles, à des lésions pulmonaires graves et à la mortalité (Pena et al., 2015). Il a une activité phospholipase A2 qui détruit de

Chapitre 1. Revue de la littérature

manière irréversible la membrane de la cellule hôte, provoquant une mort cellulaire rapide. Cette activité destructrice peut être dirigée contre les phagocytes et l'épithélium pour favoriser la dissémination bactérienne et empêcher la clairance (Hauser, 2009).

ExoY est la deuxième exotoxine la plus répandue et exprimée par plus de 89 % des isolats (Javanmardi et al., 2019; Wagener et al., 2020) C'est une adénylate cyclase soluble qui augmente les niveaux intracellulaires de divers nucléotides cycliques (cAMP, cCMP, cGMP et cUMP) lorsqu'elle est injectée dans des cellules de mammifères, activant les protéines kinases (Beckert et al., 2014). Des recherches récentes ont démontré que la protéine ExoY possède un site de liaison à l'actine qui regroupe directement les filaments d'actine de la cellule hôte (Mancl et al., 2020). ExoY inhibe considérablement la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les cellules épithéliales en contrôlant le niveau d'activation de la kinase 1 provoquée par le facteur favorisant la croissance (TAK1) (He et al., 2017).

ExoT est l'exotoxine la plus largement produite par les isolats cliniques (92 à 100 %) (Javanmardi et al., 2019), bien qu'elle ne soit pas suffisante pour la persistance bactérienne dans les poumons (Shaver et Hause, 2004). Il s'agit d'une exotoxine à bifonctionnelle avec des activités de protéine activatrice de GTPase (GAP) et d'adénosine diphosphate ribosyl transférase (ADPRT) qui agissent ensemble pour perturber la fonction de barrière épithéliale et prévenir la phagocytose (Hauser, 2009). De plus, l'activité GAP d'ExoT, avec ExoS, contribue à la rétroaction inhibition de l'injection effectrice (Armentrout et al., 2021). ExoT spécifiquement ribosylate deux protéines adaptatrices (régulateur CT10 de kinase (CRK-I et CRK-II) qui jouent un rôle dans la phagocytose, l'adhésion focale et la migration cellulaire (Sun et Barbieri, 2003). ExoT augmente également la production d'IFN- γ par les cellules tueuses naturelles (NK) dans les poumons (Vourc'h et al., 2017).

ExoS, dont la production a récemment été liée à des infections récurrentes et à des résultats cliniques moins favorables chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Sarges et al., 2020), se retrouve dans 58 à 72 % des isolats cliniques (Javanmardi et al., 2019) et possède la même activité bifonctionnelle qu'ExoT (Hauser, 2009).

1.1.8.2.4. Les exotoxines secrétées par le système de sécrétion de type V

- Rhamnolipides

Les rhamnolipides (RLS) sont la famille de biosurfactants la plus largement produite par la bactérie *P. aeruginosa* (El-Housseiny et al., 2020). Ils sont considérés comme l'un des groupes de biosurfactants les plus prometteurs en raison de leur faible toxicité, de leur forte

Chapitre 1. Revue de la littérature

activité de surface, de leur forte activité émulsifiante, de leur biodégradabilité et de leur nature respectueuse de l'environnement (shatila et al., 2020).

Alors que la surproduction de RLS empêche le développement de biofilm, de faibles concentrations améliorent la libération de LPS à la surface cellulaire, augmentant l'hydrophobicité et l'affinité pour l'adhérence initiale des bactéries à une surface (Nickzad et Déziel., 2014). En outre, les RLS présentent d'autres activités telles que des propriétés antifongiques (Sancheti et Ju., 2019), l'activité antimicrobienne et a une faible toxicité (Johann et al., 2016).

- Sidérophores

Afin de faciliter l'accumulation du fer, les bactéries sécrètent des sidérophores, qui sont des chélateurs du fer. *P. aeruginosa* produit deux sidérophores: le peptide très fluorescent pyoverdine (Pvd) et la pyochéline relativement moins lumineuse (Pch) (Cornelis., 2010). La Pvd et la Pch peuvent chélater les fers, Fe³⁺, de la transferrine et de la lactoferrine pour favoriser la croissance, et sont toutes les deux nécessaires à la virulence totale de *P. aeruginosa* (Sass et al., 2020). Malgré sa faible affinité pour le fer, la pyochéline peut être produite par la bactérie à la place de la pyoverdine, même en présence de chélateurs de fer puissants (Cunrath et al., 2020; Pan et al., 2022), ce qui indique son rôle indispensable dans la niche ferreuse.

1.1.8.3. Quorum Sensing

Le quorum sensing (QS) est essentiel à la régulation de plusieurs gènes, permettant la communication cellule-cellule et l'adaptation aux changements environnementaux, dans lequel les bactéries reconnaissent de petites molécules de signalisation autosécrétantes appelées autoinducteurs et coordonnent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les comportements de la communauté bactérienne, la virulence et la formation de biofilms (Figure 1.5) (Lee et al., 2015).

Il existe quatre voies QS chez *P.aeruginosa* : las, rhl, iqs et pqs. Chacune de ces voies utilise l'un des quatre autoinducteurs suivants : n-(3-oxododécanyloyl)-l-hsl (oddhI), n-butanoyl-l-homosérine lactone (c4-hsl) et 2-(2-hydroxyphényl)-quinolone (PQS) (Dickey., 2017). Dans certaines circonstances, lorsque la densité bactérienne est suffisante, des autoinducteurs sont produits et se combinent avec leurs récepteurs pour contrôler la transcription des gènes de toxicité associés (Yaeger et al., 2021).

Le QS joue un rôle clé dans la virulence de *P.aeruginosa*, notamment en régulant la libération de multiples facteurs de virulence (y compris l'élastase, la protéase alcaline,

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'exotoxine a, les rhamnolipides, la pyocyanine et la lipase) et en favorisant la maturation du biofilm (O'Donnell et al., 2020; Rezzoagli et al., 2020).

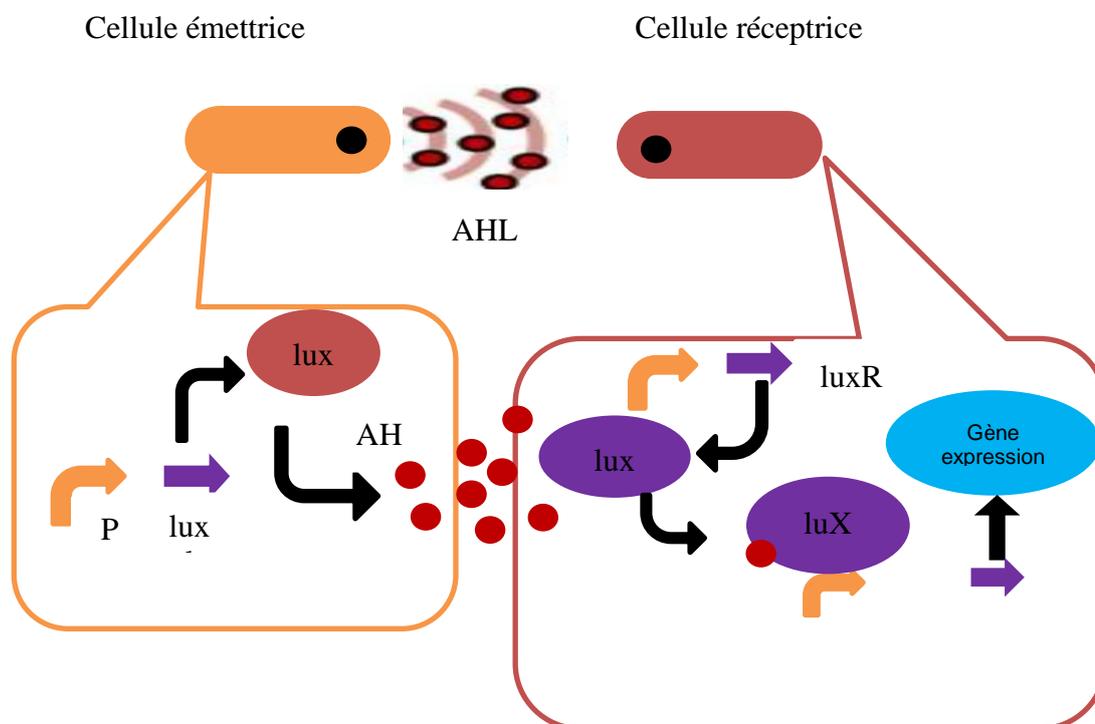


Figure 1.5. Mécanisme de régulation du QS (Elmeskini, 2011). Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été découverts, le système las et le système rhl, contrôlant à eux deux la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence. Le système las, le premier à avoir été décrit, comprend le gène lasR codant pour la protéine régulatrice LasR et le gène lasI codant pour une enzyme, auto-inducteur synthase, LasI, nécessaire à la synthèse d'un type d'AHL : N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL). Dans ce système, la communication dépend de la densité bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules appelées acylhomosérines lactones (AHL). Chez *P. aeruginosa*, le QS amplifie et coordonne l'expression de gènes dits de virulence par activation de leur transcription.

1.1.9. Biofilm

La plupart des bactéries vivent dans des biofilms, qui offrent une niche protectrice pour la survie des micro-organismes (Kumar et al., 2017; Flemming et Wuertz, 2019). Les biofilms bactériens sont définis comme des communautés microbiennes structurées encapsulées dans une substance polymère extracellulaire (eps) auto-synthétisante et attachées à un tissu ou à une surface qui comprennent des exopolysaccharides, des protéines matricielles et de l'ADN extracellulaire (T. Wang et al., 2020). Des recherches ont montré que 65 à 80 % des infections pathogènes dans les hôpitaux sont associées à des biofilms (Kumar et al., 2017; Shrestha et al., 2022). Bien que de nombreux agents antimicrobiens soient disponibles pour une utilisation clinique, ces agents inhibent uniquement les symptômes d'infection et sont incapables d'éradiquer les bactéries incrustées dans les biofilms (Li et Lee., 2019).

Chapitre 1. Revue de la littérature

La formation de biofilms permet à *P. aeruginosa* de résister aux environnements externes défavorables et favoriser sa colonisation chez l'hôte. Les biofilms peuvent également agir comme des barrières de diffusion, limitant l'entrée des antibiotiques dans les cellules bactériennes (Pang et al., 2019). La formation de biofilm favorise efficacement la colonisation de *P. aeruginosa*, améliore la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens et contrecarre le système immunitaire de l'hôte (Maurice et al., 2018; Tuon et al., 2022).

Les étapes de la formation du biofilm sont les suivantes (Figure 1.6)

- La détection des matériaux de surface par les bactéries
- Adhésion bactérienne planctonique (réversible ou irréversible) à un support
- La croissance des bactéries et le développement de microcolonies
- La maturation du biofilm
- La propagation du biofilm, la séparation des agglutinants bactériens et la colonisation ultérieure de nouvelles surfaces (Brahim, 2019).

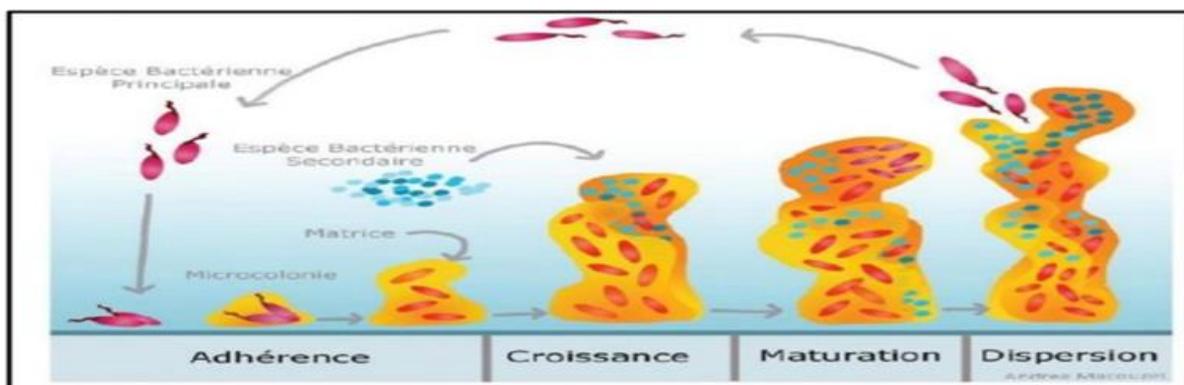


Figure 1.6. Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm (Yannick al., 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2. Macrophages

1.2.1. Généralités

Le macrophage est considéré comme un composant cellulaire clé de l'immunité innée. C'est la premières cellules immunitaires à apparaître dans le développement d'un organisme, qui agit comme le principal acteur de la défense contre les agents pathogènes et module les réponses homéostatiques et inflammatoires (Parisi et al., 2018). Il appartient au système mononucléaire des phagocytes, une famille de phagocytes professionnels qui implique aussi les monocytes et cellules dendritiques (Parisi et al., 2018).

En1882, Élie Metchnikoff a inventé le terme macrophage (vient du grec et qui signifie «gros mangeurs»). Il a été aussi le premier à décrire l'ingestion par les macrophages de particules ou de cellules, appelée phagocytose, comme réponse immunitaire protectrice (Frodermann et Nahrendorf,2018). Les macrophages jouent un rôle important dans le système immunitaire humain et remplissent diverses fonctions, notamment l'absorption et la digestion des micro-organismes(bactéries), élimination des débris et des cellules mortes et stimulation d'autres cellules impliquées dans la fonction immunitaire (Donadon et al., 2020).

1.2.2. Origine des Macrophages

Les macrophages se forment à partir des monocytes, eux-mêmes issus de la moelle osseuse. Les monocytes circulent dans le sang pendant un à trois jours avant de migrer dans les tissus, où ils deviennent des macrophages ou des cellules dendritiques (Mariani et al., 2019).

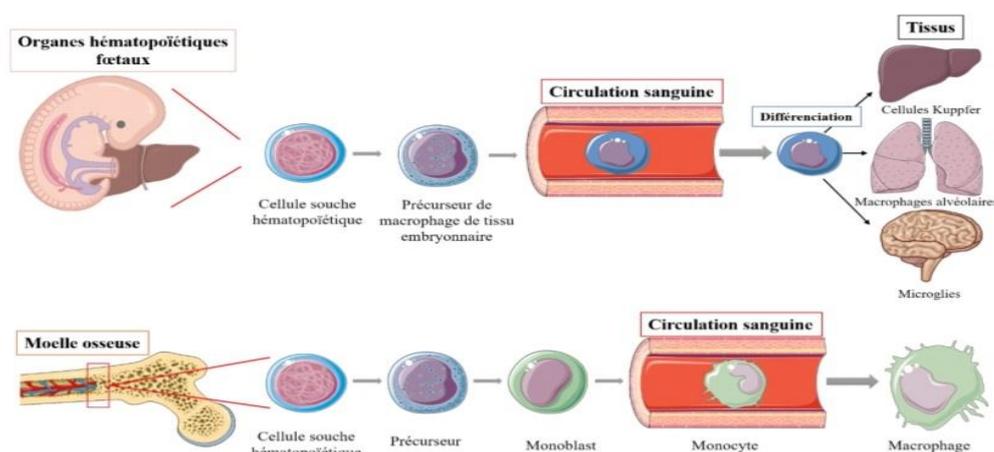
Trois principales sources peuvent être à l'origine des macrophages tissulaires :

- ❖ Le sac vitellin dans l'embryon comme source de cellules pro-génitrices par hématopoïèse primitive ;
- ❖ La deuxième vague à partir de progénitures érythro-myéloïdes (EMP) (foie fœtal) ;
- ❖ Et la moelle osseuse qui devient le centre hématopoïétique, induit chez les embryons tardifs et les organismes adultes (Dey et al., 2015; Parisi et al., 2018).

Les macrophages résidents dans le premier et le deuxième cas proviennent du sac vitellin fœtal ou de progéniteurs qui en sont dérivés (Wynn et al., 2013). Ils sont produits tout au long du développement embryonnaire, bien avant la naissance, avant que l'hématopoïèse finale ne soit établie (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Orecchioni et al., 2019). Ces macrophages ont des capacités d'auto-renouvellements et ont une signature d'expression génique différente des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Orecchioni et al., 2019).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Concernant le troisième cas, la circulation sanguine libérera des monocytes dérivés des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et ces cellules seront ensuite recrutées dans divers tissus de l'organisme (Parisi et al., 2018), où ils se différencient sous l'influence de facteurs de croissance spécifiques dont le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF, *Macrophage colony-stimulating factor*) et le facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytes (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-*



stimulating factor) en macrophages (Juhas et al., 2015).

Figure 1.7. Origine des macrophages (D'après Abbas et al., 2015).

1.2.3. Macrophages résidents

En fonction de leur localisation au niveau d'un tissu ou un organe, les macrophages tissulaires s'adaptent au microenvironnement local et peuvent prendre différents noms, y compris les microglies (système nerveux central (SNC)), les cellules kupffer (foie), les macrophages alvéolaires (poumon), les ostéoclastes (os), les histiocytes (rate et tissu conjonctif), les cellules de langerhans (peau) et les macrophages tissulaires dans l'intestin (Gordon et al., 2014).

Les macrophages résidents favorisent l'homéostasie tissulaire, tandis que les macrophages dérivés de monocytes aident principalement à la défense de l'hôte. Outre ces différences, il a été observé que les macrophages embryonnaires et adultes coexistent dans différents organes (Figure 1.7)(Davies et al., 2013; Ruytinx et al., 2018).

1.2.4. Morphologie

Les monocytes sont des cellules de 12 à 15 μm tandis que les macrophages peuvent mesurer de 25 à 50 μm . Les deux types de cellules ont un noyau rond ou en forme de rein positionné de manière excentrique. Les monocytes contiennent un ou deux noyaux qui

Chapitre 1. Revue de la littérature

disparaissent lors de la différenciation en macrophages. le cytoplasme de ces cellules est abondant en granules azur de différentes tailles et vacuoles.

Les organites sont concentrés au centre de la cellule en raison de l'adhésion des macrophages au plastique et au verre. L'appareil de Golgi est juxtaposé au noyau et le réticulum endoplasmique rugueux est dispersé dans le cytoplasme. La membrane cytoplasmique des macrophages abrite également plusieurs mitochondries et de nombreux lysosomes qui peuvent se fixer aux phagosomes. Elle est constituée de microtubules et de microfilaments d'actine, permet à la fois le mouvement et le développement de pseudopodes lors de la phagocytose (Agrawal et al., 2012).

1.2.5. Polarisation

La plasticité phénotypique est l'une des principales caractéristiques des macrophages, qui influence leurs fonctions, et qu'est définis selon deux états d'activation principaux, appelés macrophage M1 classiquement activé et M2 alternativement activés. En réponse aux stimuli internes qui sont générés rapidement en fonction de blessure ou de l'infection (Figure 1.8) (Parisi et al., 2018).

Ces deux états d'activation, reflétant la polarisation Th1/Th2 des cellules T, représente deux extrêmes d'un état dynamique. Les macrophages de type M1 sécrètent des cytokines qui inhibent la prolifération des cellules voisines et endommagent les tissus, tandis que le type M2 libèrent des cytokines qui favorisent la prolifération des cellules environnantes et la réparation des tissus (Deng et al., 2023).

La signalisation canonique de facteur de régulation de l'IFN (IRF) et transducteur de signal et activateur de transcription (STAS) (IRF/STAT) est une voie centrale dans la modulation de la polarisation des macrophages, Activation selon un type différent de cytokines, ils ont tous participé à la tendance des macrophages à répondre à un cas ou à un autre, ce qui a conduit à une expression génique par FT (Kapellos et Iqbal, 2016).

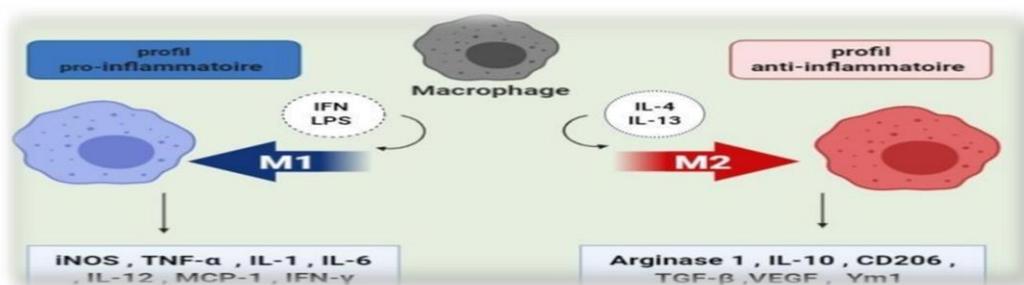


Figure 1.8. Polarisation des macrophages en M1 et M2 (Lee, 2019). TH1 : Cellule T helper 1, TH2 : Cellule T helper 2, M1 : Macrophage classiques pro-inflammatoires actives, M2 : Macrophage alternatifs anti-inflammatoires actives, IFN- γ : Interféron gamma, LPS : Les lipopolysaccharide, IL-1 : Interleukine1, IL-4 :

Chapitre 1. Revue de la littérature

Interleukine 4, IL-6 : Interleukine6, IL-10 :Interleukine 10, IL-12 :Interleukine 12, IL-13 :Interleukine 13, IL-23 :Interleukine 23, TNF- α :Facteur de nécrose tumoral alpha, iNOS :Nitric oxide synthase inductible, TGF- β :facteur de croissance transformant beta, VEGF : facteur de croissance de endothélium vasculaire.

1.2.6. Macrophages M1

Les macrophages M1 ont un profil pro-inflammatoire grâce à leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF, IL-12 et IL-18 ; IL-6, IL-23, les chimiokines CCL2/mcp1, CCL5, CCL8, CXCL12, CXCL4 (Juhas et al., 2015). Ils sont les premiers acteurs de défense contre les infections par différents agents pathogène (Galván-Peña et al., 2014). Ils présentent un rôle dans l'immunité anti-tumorale et contribuent aussi aux lésions tissulaires en générant des agents microbicides (Shapiro et al., 2011; Rhee, 2016).

Les macrophages M1 sont phénotypiquement caractérisés par l'expression de niveaux élevés de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) à l'origine de leur forte capacité de présentation antigénique), et de molécules co stimulatrices CD80/CD86, ainsi que du marqueur CD68 (chávez-galán et al., 2015). Ils permettent également de réguler positivement l'expression de la protéine intracellulaire appelée suppresseur de signalisation des cytokines 3 (SOCS3) et activent l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS2 ou iNOS) générant du monoxyde d'azote (NO, *nitric oxyde*).

1.2.7. Macrophages M2

Les macrophages se polarisent vers un profil M2 sous l'action des cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 par l'activation de STAT6 *via* le récepteur alpha de l'IL-4 (IL-4R α). Ces cytokines et d'autres telles que l'IL-10 peuvent aussi induire la polarisation vers le profil M2 en activant STAT3 *via* le récepteur de l'IL-10 (IL-10R). De plus, L'IL-33 et l'IL-21 sont également incluses pour effectuer le même processus. Les macrophages M2 se caractérise par une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 et de transformer le facteur de croissance bêta (TGF- β , *Transforming Growth Factor-Beta*). Ils ont une forte capacité de phagocytose, récupèrent les débris et les cellules apoptotiques, favorisent la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies, et possèdent des propriétés pro-angiogéniques et pro-fibriques (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

On distingue quatre sous-types de M2 en fonction des signaux inducteurs : M2a, M2b, M2c et M2d (Tableau 1.2). Le macrophage M2a est induit par l'IL-4 et l'IL-13. Le macrophage M2b est induit suite à une stimulation par des complexes immuns et produisent à la fois des cytokines pro et anti-inflammatoires telles que l'IL-10, et le TNF- α . Le macrophage M2c est induit par glucocorticoïdes. Enfin, le quatrième type M2d, est induit par

Chapitre 1. Revue de la littérature

des agonistes TLR à travers le récepteur de l'adénosine (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Enfin, l'arginase-1 (Arg1) est un marqueur important de l'activation alternative des macrophages (Duque-Correa et al., 2014).

Tableau 1.2. Différentes propriétés biologiques et physiologiques des sous populations des macrophages (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Classes des Macrophages	Cytokines permettent polarisation	qui La	Cytokines, chimiokines et autres médiateurs sécrétés	Rôles
M1	LPS, IFN- γ , TNF α		IL-6, IL-12, IL- 23, IL-27, IL-1 β , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, iNOS (Souris) Arg-2 (Souris), ROS	Réponse Th1 pro-inflammatoire, activités antimicrobiens et anti-tumorales
M2a	IL-4, IL-13		TGF- β , IL-10, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Anti-inflammatoire et Remodelage tissulaire
M2b	IL-1 β , ligand TLR, complexe immunitaire		IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , CCL1	Activation Th2 et l'Immunorégulation
M2c	TGF- β , IL-10		TGF- β , IL-10, CCL16, CCL18, CXCL13	Phagocytose des cellules apoptotiques
M2d	Ligand du récepteur de l'adénosine, ligand TLR		IL-10, VEGF	Activité Proangiogénique, progression tumorale

1.2.8. Propriétés antimicrobiennes des macrophages

1.2.8.1. Production d'agents microbicides

1.2.8.1.1. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO) est un simple radical libre gazeux (Lirk et al., 2002), une molécule de signalisation générée à partir de l'acide aminé L-arginine par l'enzyme iNOS (Tejero et Stuehr., 2013; Soufli et al., 2016). Le NO est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques et ses effets diffèrent selon le taux, la durée, le lieu de production et la nature des molécules cibles (Soufli et al., 2016). Il joue un rôle dans la neurotransmission, la vasodilatation, la défense de l'hôte contre les agents pathogènes et dans la régulation immunitaire (Xue et al., 2018).

L'iNOS synthétise le NO en deux étapes catalytiques : premièrement la L-arginine est hydroxylée par l'oxygène moléculaire (O₂) et le NADPH en N ω -hydroxy-L-arginine, puis est oxydée en L-citrulline, H₂O et NO (Kielbik et al., 2019). Cette réaction nécessite cinq électrons (Yan et al., 2020). L'iNOS transfère les électrons du NADPH, via les flavines FAD et FMN dans le domaine C-terminal réductase, à l'hème (Substance composée de fer et de

Chapitre 1. Revue de la littérature

porphyrine, présente dans l'hémoglobine, et qui sert au transport des gaz du sang) dans le domaine N-terminal oxygénase où ces électrons sont utilisés pour réduire et activer l' O_2 et pour oxyder la L-arginine en L-citrulline et NO (Figure 1.9) (Forstermann et Sessa., 2012). Dans les macrophages, le NO est responsable des réponses immunitaires antimicrobiennes et tumoricides (Jaffrey et Snyder., 1995). Il agit comme un effecteur de l'inflammation pour l'élimination des infections bactériennes et a un effet protecteur sur le corps (Xue et al., 2018).

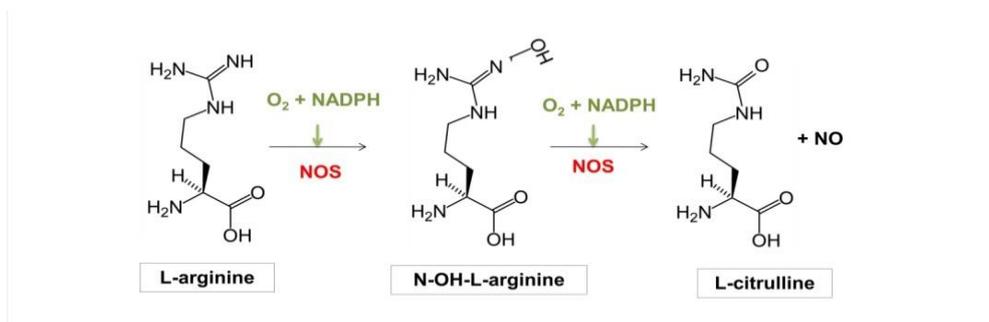


Figure 1.9. Réaction chimique de production du NO.

1.2.8.1.2. Métabolites de l'oxygène

Le rôle essentiel des espèces réactives de l'oxygène (ROS), dans les mécanismes de destruction des micro-organismes, fut établi, à la fin des années 50, avec la découverte d'une pathologie héréditaire grave, le "syndrome de la granulomateuse septique". Ce syndrome fatal se caractérise par une réduction considérable de l'activité bactéricide des cellules phagocytaires, résultant de l'incapacité de coupler l'activation de «l'explosion respiratoire» au processus phagocytaire. Ceci est la conséquence de désordres moléculaires du complexe NADPH-oxydase (Morel et al., 1991). Les métabolites de l'oxygène sont un moyen de défense très important chez les monocytes/macrophages et les neutrophiles. Ils sont produits par un complexe protéique membranaire appelé NADPH oxydase (phox) (Lijia et al., 2012).

Chapitre 1. Revue de la littérature

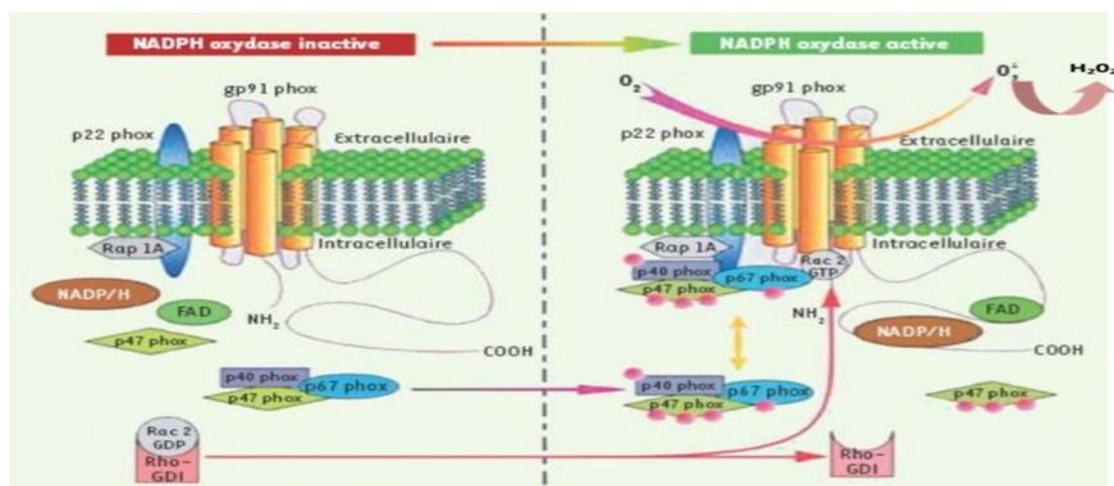


Figure 1.10. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire au repos et sous forme active (DeLeoet al., 1996 modifiée).

La membrane (où se trouve le site catalytique, le cytochrome b558 composé de gp91phox et p22phox) et le cytosol (où sont localisées les protéines régulatrices p47phox, p40phox et p67phox). Après stimulation, les protéines cytosoliques migrent vers la membrane et s'associent au cytochrome b558 pour former une NOX2 active par l'intermédiaire de protéines G. Les autres isoformes de la NOX (NOX1, 3, 4, 5 et Duox1 et 2) partagent toutes une homologie de séquence avec gp91phox. Les NOX1, 3 et 4 forment un hétérodimère avec p22phox, et des homologues des protéines cytosoliques régulatrices de NOX2 (p47phox et p67phox), appelés NOXA1 et NOXO1, impliqués dans leur activité. NOX5 et les Duox1 et 2 possèdent des structures supplémentaires, des domaines dits « mains E-F »2, qui rendent leur activité oxydase dépendante du calcium. Enfin, les Duox possèdent une très longue région extracellulaire ayant une forte homologie de séquence avec les peroxydases et peuvent produire H₂O₂.

1.2.8.1.3. Enzymes lysosomales

Au cours de la phagocytose, les macrophages produisent des enzymes spécifiques qui interviennent dans la digestion de la particule ingérée. Ces enzymes sont souvent contenues dans des vacuoles appelées lysosomes. Ces protéines sont des hydrolases qui ne sont actives qu'à un pH égal à 5. Parmi ces enzymes, on note : les phosphatases (phosphatases acides et phosphodiesterase), les exonucléases (désoxyribonucléases, ribonucléases acides), les protéases (cathepsine et collagénase), les enzymes dégradantes (glucosaminoglycolyse), galactosidase et lysozymes (Basset et al., 2003).

1.2.9. Macrophage et homéostasie tissulaire

Les macrophages jouent de nombreux rôles dans le développement en façonnant l'architecture des tissus allant du cerveau à l'os. Ils permettent de moduler l'homéostasie et la physiologie normale en régulant diverses activités, notamment le métabolisme et la connectivité neuronale, et en détectant les dommages. Les macrophages résidents régulent l'homéostasie tissulaire en agissant comme des cellules sentinelles et en répondant aux changements physiologiques ainsi qu'aux défis extérieurs (Wynn et al., 2013).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.10. Macrophage dans l'homéostasie métabolique

Les organes métaboliques des mammifères comme le foie, le pancréas et le tissu adipeux sont composés de cellules parenchymateuses et stromales, y compris les macrophages, qui fonctionnent ensemble pour maintenir l'homéostasie métabolique (Wculek et al., 2022). En régulant cette interaction, les mammifères sont capables de s'adapter radicalement aux changements de leur environnement et de leur apport en nutriments. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, l'activation innée des macrophages entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , l'IL6 et l'IL1 β , qui favorisent collectivement la résistance périphérique à l'insuline pour diminuer le stockage des nutriments (Odegaard et al., 2013). Cette adaptation métabolique est absolument nécessaire pour monter une défense efficace contre les agents pathogènes bactériens et viraux, car presque toutes les cellules immunitaires activées utilisent préférentiellement la glycolyse pour alimenter leurs fonctions de défense de l'hôte (Olefsky et Glass, 2010).

1.2.11. Marqueurs membranaires du Macrophage

Le macrophage exprime plusieurs marqueurs tels que CD14, CD16, CD64, CD68, CD71 et CCR5. Ces derniers dépendent du groupe macrophage et de ses conditions environnementales locales. Il y a très peu de macrophages uniques et un certain nombre de signes sont souvent nécessaires pour déterminer votre type de cellule (Rószter T, 2015). Les tableaux 1.3 et 1.4 résument les marqueurs du macrophage M1 et M2, respectivement.

Tableau 1.3. Marqueurs du macrophage M1 humain.

Espèces	Type de Macrophages	Marqueurs	Type de Marqueurs
Humain	M1	CD14	Surface
Humain	M1	CD16/CD32	Surface
Humain	M1	CD32	Surface
Humain	M1	CD64	Surface
Humain	M1	CD68	Surface
Humain	M1	CD80	Surface
Humain	M1	CD86	Surface
Humain	M1	CD369(Dectine-1)	Surface

Chapitre 1. Revue de la littérature

Humain	M1	CMH-II	Surface
Humain	M1	STAT1	Surface

Tableau 1.4. Marqueurs des macrophages M2 humain

Marqueurs	M2 Humain	Type de Marqueurs
Arg1	-	Sécrété
Fizz1	-	Surface
IL-10	+	Sécrété
CD206	+	Surface
IL-1Ra	+	Surface
CD150	+	Surface
CD115	+	Surface
CD204	+	Surface
CD163	+	Surface
CD209(DC-SIGN)	+	Surface
FceR1	+	Surface
VSIG4	+	Surface
CSF1R	-	Surface
STAT6	+	Facteur intracellulaire/ de transcription

1.2.12. Phagocytose

La phagocytose correspond à la reconnaissance et l'ingestion de particules de plus de 0,5 μm dans une vésicule dérivée de la membrane plasmique, appelée phagosome. Les macrophages peuvent ingérer des agents pathogènes microbiens, mais surtout aussi des cellules apoptotiques. De cette façon, ils contribuent à l'élimination de milliards de cellules qui se renouvellent chaque jour. Ainsi, la phagocytose devient essentielle non seulement pour l'élimination des microbes, mais aussi pour l'homéostasie tissulaire (Rabinovitch 1995).

Le reconnaissance des particules est réalisée par un certain nombre de récepteurs membranaires qui initient des cascades de signalisation et favorisent la phagocytose. Ces récepteurs peuvent être divisés en récepteurs non opsoniques et récepteurs opsoniques. Les récepteurs non opsoniques peuvent reconnaître directement des groupes

Chapitre 1. Revue de la littérature

moléculaires à la surface des cibles phagocytaires. Parmi ces récepteurs, il y a des molécules de reconnaissance de type lectine, telles que CD169 et CD33, des lectines de type c apparentées, telles que dectin-2, Mincle (Macrophage-inducible C-type lectin) ou DNGR-1 (Canton et al., 2013), et dectin-1, qui est un récepteur du bêta-glucane fongique (Dambuza et Brown 2015). Fait intéressant, les récepteurs TLR sont des détecteurs de particules étrangères, mais ils ne fonctionnent pas comme des récepteurs phagocytaires. Cependant, ils collaborent souvent avec d'autres récepteurs non opsoniques pour stimuler l'ingestion (Kawai et Akira, 2011; Iwasaki et Medzhitov, 2015).

Les récepteurs opsoniques reconnaissent et ciblent les opsonines dérivées de l'hôte qui se lient aux particules étrangères. Les opsonines comprennent les anticorps, le complément, la fibronectine, les lectines liant le mannose et la globuline grasse du lait (lactadhérine) (Flannagan, 2012). Les récepteurs phagocytaires opsoniques les mieux caractérisés et peut-être les plus importants sont le récepteur Fc (FcR) et le récepteur du complément (CR). Les FcR se lient au fragment Fc de l'immunoglobuline (Ig) G (Iwasaki et Medzhitov., 2015; Rosales et Uribe-Querol., 2017) ou des IgA (Bakema et Van Egmond., 2011). Les récepteurs du complément, tels que CR3, se lient à iC3b déposé sur la particule après activation du complément (Gorgani et al., 2008).

Lors de la reconnaissance d'une particule cible, le récepteur phagocytaire initie une cascade de signalisation qui remodèle les lipides de la membrane plasmique et module le cytosquelette d'actine pour étendre la membrane plasmique autour de la particule (Freeman et Grinstein, 2014). Dans cette partie du processus, les récepteurs phagocytaires sont également impliqués à leur tour et coopèrent pour compléter la formation des phagosomes (Ostrowski, 2016).

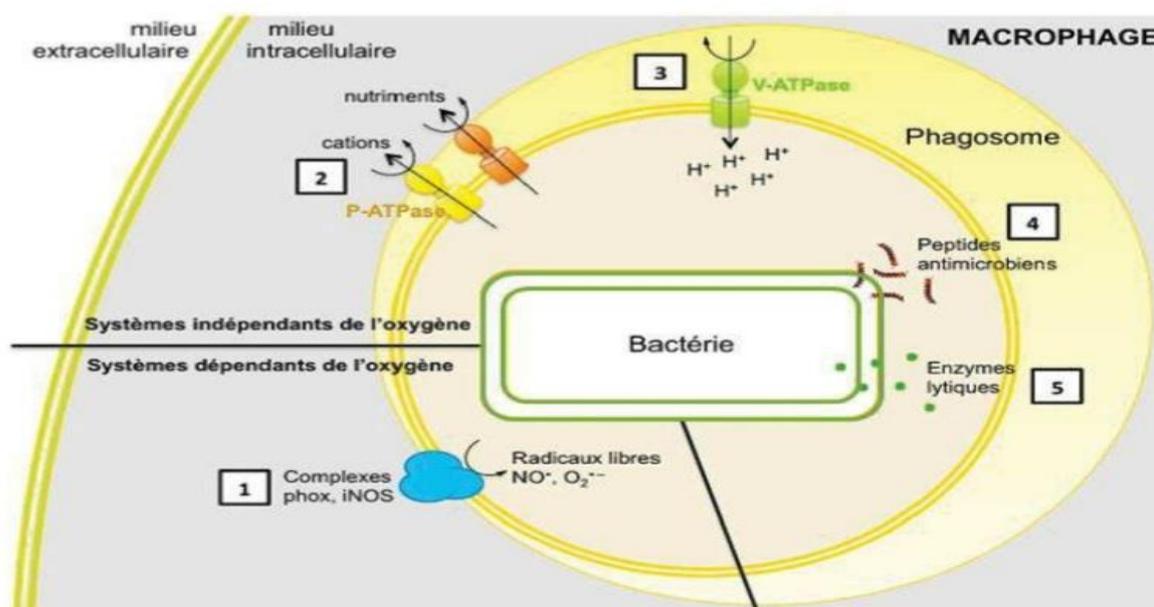
Une fois la particule est internalisée à l'intérieur du phagosome précoce, ce dernier peut fusionner avec des vésicules issues du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi pour former un phagosome intermédiaire (Campbell-Valois et al., 2012). La formation de ce dernier est un processus dynamique impliquant la fusion des vésicules endocytaires et la fission des vésicules sécrétoires, entraînant un remodelage de la membrane et une acidification progressive du phagosome. Plus tard, ce phagosome intermédiaire se transforme en une vacuole microbicide, le phagolysosome, en fusionnant avec des lysosomes et en modifiant sa membrane et ses caractéristiques intérieures par un processus appelé maturation du phagolysosome (Levin-Konigsberg et Mantegazza, 2021).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.13. Rôle du macrophage dans l'élimination du *P. aeruginosa*

Les macrophages jouent un rôle central dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, agissant comme des cellules phagocytaires maîtresses et des régulateurs immunitaires, notamment par la sécrétion de cytokines. Les macrophages alvéolaires résidents sont les premières cellules immunitaires susceptibles de rencontrer *P. aeruginosa* dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Ces cellules peuvent absorber et tuer les bactéries pathogènes par différents mécanismes (Figure 1.11) (Lavoie et al., 2011).

Deux types de systèmes antimicrobiens sont distingués dans les macrophages : les systèmes dépendants de l'oxygène qui impliquent la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [1], et les systèmes indépendants de l'oxygène qui peuvent impliquer une privation de nutriments [2], une acidification des vacuoles phagocytaires [3] et production de défensines et de autres peptides antimicrobiens [4] et l'action des enzymes



lysosomales.

Figure 1.11. Réponses antimicrobiennes médiées par le macrophage. D'après (Thèse de doctorat, C. Belon. 2015).

1.3. Défensines

1.3.1. Généralités

Les Défensines sont une famille de petits peptides cationiques jouant le rôle de défense de l'hôte (2 à 5 kDa), avec une structure centrale repliée stabilisée par trois liaisons disulfure intramoléculaires. La première défensine des mammifères, également connue sous le nom de protéine microbicide cationique, a été découverte en 1980 par

Chapitre 1. Revue de la littérature

Lehrer et ses collègues utilisant des macrophages pulmonaires de lapin (Xu et Lu, 2020). Les défensines ont été largement étudiées depuis leur découverte initiale pour leurs activités antimicrobiennes étendues et leurs fonctions immunomodulatrices dans des contextes physiologiques et pathogènes. Enfin, les défensines sont présentées comme le "Swiss army knife" de l'immunité innée contre les agents pathogènes microbiens.

1.3.2. Gène *DEFA1*

Le gène *DEFA1*, codant la protéine défensine alpha 3, se localise sur le chromosome 8, à un emplacement refroidi: 8p23.1 du chromosome 8 en position 23.1. (fourni par refseq, mai 2010). Le gène humain *DEFA1* (également connu sous le nom de *DEFA1*, *DEFA2*, *MRS*, *DEFA1b* ; identifiant de gène 1667) code pour une protéine précurseur de 94 acides aminés (uniprot p59665) avec un peptide signal n-terminal (a.a. 1-19) et un propeptide (a.a. 20 -38) séquence (Figure 1.12).

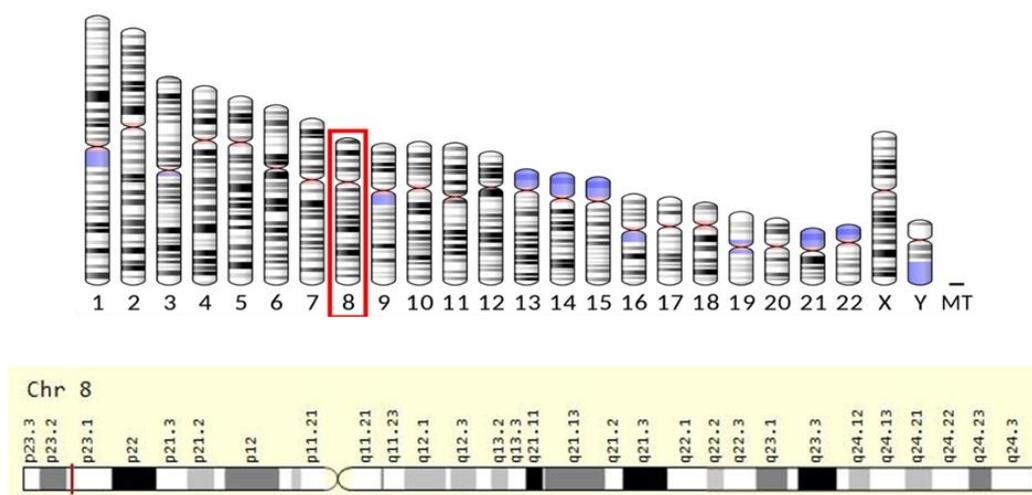


Figure 1.12. Localisation du gène *DEFA1* sur le chromosome 8 humain (d'après Genetics Home Reference).

1.3.3. Protéine *DEFA1*

Les membres de la famille des défensines ont une séquence protéique très similaire et se distinguent par un motif cystéine conservé. La protéine défensine alpha 1 se trouve dans les granules microbicides des neutrophiles et joue probablement un rôle dans la défense de l'hôte médiée par les phagocytes. ces peptides présentent plusieurs activités biologiques, notamment la destruction non oxydative des micro-organismes ingérés, le chimiotactisme des monocytes.

Chapitre 1. Revue de la littérature

À ce jour, six α -défensines humaines ont été identifiées, qui sont ensuite divisées en deux grandes classes en fonction de leurs profils d'expression et de leurs structures géniques : les défensines myéloïdes ou peptides neutrophiles humains (HNP)1 à 4 et les défensines (entériques) humaines 5 et 6 (Lehrer et Lu., 2012). Les granules contenant des HNP subissent normalement une sécrétion restreinte et sont généralement destinés à la fusion avec des phagolysosomes, où des concentrations élevées de HNP tuent directement les microbes phagocytés. HD5 et HD6 sont exprimés de manière constitutive et sécrétés par les cellules de Paneth au fond de la petite crypte intestinale (Clevers et Bevins, 2013).

1.3.5. Structure

Les défensines sont de petits peptides cationiques riches en cystéine présents dans les leucocytes et les cellules épithéliales. Les 3 types de défensines de mammifères, α , β et circulaires, ont des structures en feuillet β stabilisées par 3 liaisons disulfures et diffèrent dans leur distribution et leur connexion de 6 résidus cystéine (Figure 1.13). Ils présentent une activité antimicrobienne pour un large éventail d'organismes, y compris les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, les champignons et les virus enveloppés et non enveloppés (Chang et al., 2005).



Figure 1.13. Structure en 3d de la molécule DEFA1 (Pazgier,2010).

1.3.6. Rôles

Les défensines sont des molécules effectrices du système immunitaire inné qui agissent *via* des propriétés de type antibiotique contre un large éventail d'agents infectieux, y compris les bactéries, les champignons et les virus ou qui favorisant l'activation et la maturation de certaines CPA (Zhao et al., 2013). Ces protéines interagissent avec le précurseur essentiel de la synthèse de la paroi cellulaire, le lipide II, pour inhiber la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne (De Leeuw et al., 2010). Elles induisent également la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interféron de type I (IFN) dans les cellules dendritiques

Chapitre 1. Revue de la littérature

plasmacytoïdes (pDC) en déclenchant la dégradation de NFKBIA (NFKBI Inhibitor Alpha : is a Protein Coding gene) et la translocation nucléaire d'IRF1(Interferon Regulatory Factor 1 : is a Prorin Godige gene), nécessaires à l'activation des pDC (F. Wang et al., 2016).

1.3.7. Défensines: composants clés de l'immunité innée et adaptative

L'expression constitutive des défensines fournit une première ligne de défense contre la colonisation de l'hôte par des agents pathogènes. Les défensines peuvent activer la voie classique du complément et ont le potentiel de modifier la réponse inflammatoire en régulant la production de cytokines et l'expression des molécules d'adhésion. Toutes ces observations suggèrent un rôle clé des défensines dans l'immunité innée (Chaly et al., 2000). De plus, les α -défensines humaines sont chimiotactiques pour les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T à une concentration d'environ 10^{-10} , ce qui suggère leur importance dans la formation de la réponse immunitaire adaptative (Tang et al., 1999).

1.3.8. Défensines et élimination de *P. aeruginosa*

Les rôles préventifs de DEFA1 ont été signalés dans l'infection bactérienne, et il a été constaté que la majorité des microbes cibles dans les mesures antimicrobiennes avec DEFA1 étaient des œillets humains (Bruhn et al., 2007). Par conséquent, DEFA1 est capable de tuer les bactéries *P. aeruginosa* ou d'inhiber sa croissance par de nombreux mécanismes antimicrobiens tels que la perturbation de la membrane directe (Lehrer et Lu.,2012), et l'inhibition de la formation de la paroi cellulaire bactérienne (Schneider et al. 2010). Defa1 peut également réduire l'infection à *P. aeruginosa* en neutralisant la détoxification (Kim et al., 2005). HNP-1(DEFA1) sécrété par l'infiltration des neutrophiles dans l'infection à *P. aeruginosa* induit la libération de TNF- α et IFN- γ des macrophages, qui, à leur tour, augmentent la phagocytose des agents pathogènes par les macrophages - une étape essentielle de la clairance bactérienne (Soehnlein et al.,2008). HNP1 inhibe également la fuite phagosomale et la multiplication intracellulaire (Arnett et al., 2011).

1.4. PCR

1.4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique enzymatique créée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985 (Garibyan et Avashia., 2013). Elle s'appuie sur l'utilisation de l'enzyme ADN polymérase, enzyme dont le principe de fonctionnement de base est de produire de nombreuses copies d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un extrait d'ADN. Étant donné que la PCR peut amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités

Chapitre 1. Revue de la littérature

faibles d'extrait d'ADN, on pourrait dire qu'il s'agit d'une technique de purification ou de clonage .Aujourd'hui, la PCR est un outil indispensable en biologie moléculaire et cellulaire pour ses avantages dans l'accélération du clonage acellulaire d'un fragment d'ADN (Kadri., 2020).

1.4.2. Acteurs de la PCR

1.4.2.1. L'ADN

L'élément le plus crucial de cette technique est l'ADN à partir duquel on obtient les fragments amplificateurs (Ghannam et Varacallo,2023).

1.4.2.2. Les amorces

Vous devez avoir au moins une paire d'oligonucléotides synthétisés chimiquement pour appliquer cette technique. Ce dernier devrait compléter les deux extrémités de la séquence à amplifier. Toute les amorces est conçue pour un objectif spécifique et fondamental; L'une est la reconnaissance totale de la séquence dans la partie supérieure de la partie ADN du brin 5'- 3 d'intérêt, tandis que l'autre est l'identification, avec la même méthodologie, sur la séquence située en haut du brin complémentaire (3'-5 ') du fragment d'ADN lui-même (Pelt-Verkuil et al.,2008).

1.4.2.3. Taq polymérase

L'ADN polymérase permet la réplication. Nous utilisons une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. Cette polymérase (Taq polymérase) a la particularité remarquable de résister à des températures de l'ordre de 100°C, qui sont généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines. *Thermus aquaticus* trouve sa température de confort à 72°C, température optimale pour l'activité de sa polymérase (Kadri.,2020).

1.4.2.4. Les nucléotides

Ce sont les composants utilisés par l'enzyme susmentionnée pour synthétiser des brins d'ADN complémentaires. connus sous le nom de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) (Ghannam et Varacallo,2023).

1.4.3. Étapes de la PCR

La technique PCR est réalisée en trois étapes fondamentales, la fin de chaque étape est importante pour la suivante.

Chapitre 1. Revue de la littérature

La PCR est réalisée par un mélange d'extrait d'ADN, de Taq polymérase, d'amorces et de quatre dNTPs dans des tubes à puits placés dans un thermocycleur (Uhel et al.,2019).

La dénaturation

C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue en élevant la température. La première période est réalisée à une température de 94°C, appelée température de dénaturation. A cette température, l'ADN matrice, qui sert de matrice lors de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent être maintenues à une température supérieure à 80°C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin (ADN simple brin) (Kadri.,2020).

Hybridation

La deuxième étape est l'hybridation. Elle est réalisée à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, appelée température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences simple brin complémentaires des régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que l'ADN matriciel long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

Elongation

Élongation des amorces (70 °c à 72 °c) : l'ADN polymérase (Taq polymérase) allonge les amorces en incorporant des dNTP "désoxynucléotides triphosphates" complémentaires à la séquence de la matrice en cours d'hybridation.

Chapitre 1. Revue de la littérature

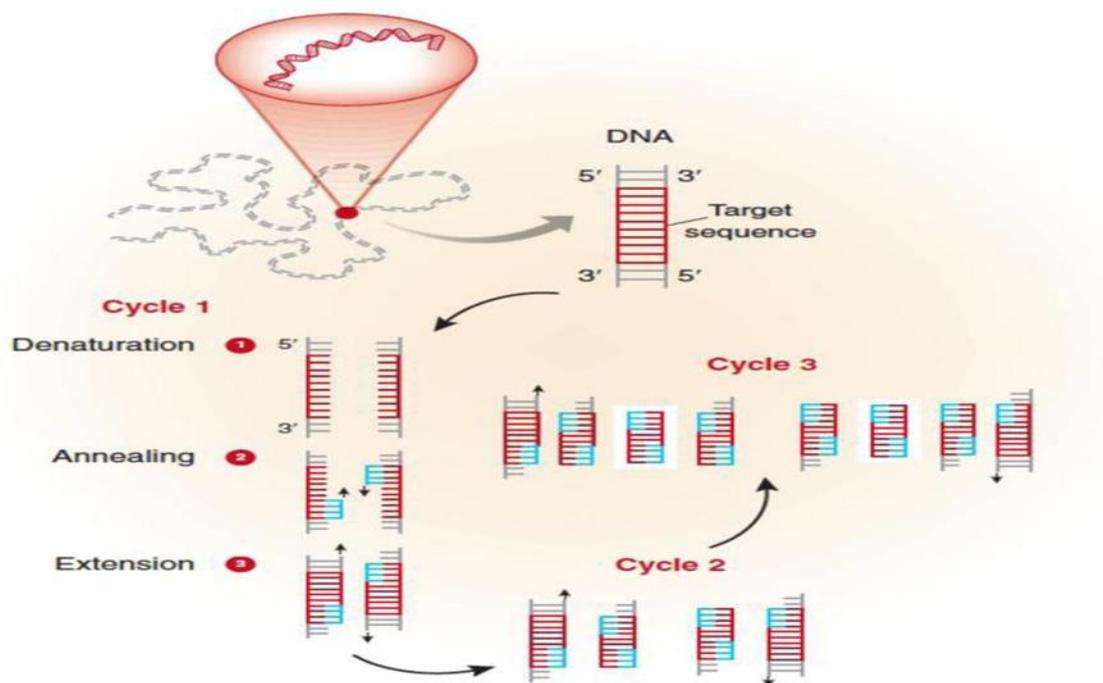


Figure 1.14. Étapes de la PCR (Ghannam et Varacallo., 2023).

1.4.4. Types de la PCR

1.4.4.1. PCR qualitative

La PCR qualitative est utilisée pour détecter la présence ou l'absence d'un produit ADN particulier (Garibyan et Avashia, 2013).

1.4.4.2. PCR quantitative

Elle a été développée dans les années 1980 afin de fournir un niveau spécifique d'ADN ou d'ARN dans un échantillon biologique. Ce type de PCR implique la détection d'un signal fluorescent qui est produit d'une façon proportionnelle au processus d'amplification du résultat de PCR (Kadri,2020).

1.4.5. Choix des amorces de PCR

Sélection des amorces PCR une paire d'amorces sens et antisens a été conçue pour la réaction PCR. ces deux amorces sont de courts oligonucléotides simple brin complémentaires et très spécifiques des extrémités 3' de chaque brin d'ADN à amplifier. Ils sont également nécessaires pour que l'ADN polymérase puisse s'amorcer et synthétiser le nouveau brin d'ADN cible (Anil Kumar et Chordia, 2015).

Chapitre 1. Revue de la littérature

C'est pourquoi la spécificité et l'efficacité de l'amplification PCR dépendent principalement du choix de ces amorces (Welch, 2012).

1.4.6. Critères de choix de bonnes amorces

Certains paramètres doivent être pris en compte pour déterminer l'efficacité et la précision optimales des préfixes :

- Longueur d'amorce optimale, environ 18 à 30 bases;
- teneur en G-C d'amorce équilibrée, un rapport d'environ 40 à 60% (Welch, 2012).
- Une Température de fusion (T_m) similaire pour la formation d'un complexe amorce-matrice stable (Ozturk et Can, 2017).
- Vérification de la composition nucléotidique dans une extrémité 3' d'amorce (Chuang et al., 2013)
- Eviter la formation des Structures secondaires, comme les auto-dimères, les épingles à cheveux et les dimères croisés (Chavali et al., 2005)

1.5. Problématique et objectif

1.5.1. Problématique

Le système immunitaire est toujours en guerre contre les organismes infectieux qui s'infiltrent dans le corps. De nombreuses infections ont été efficacement éliminées grâce aux macrophages. Néanmoins, certains agents pathogènes infectieux peuvent développer des mécanismes de défense pour contourner les systèmes immunitaires et résister aux lysosomes cellulaires. Par ailleurs, le gène *DEFA1* joue un rôle crucial dans l'immunité anti-infectieuse. En raison de son recrutement, il a également le potentiel de moduler la réponse inflammatoire en régulant la production de cytokines et l'expression des molécules d'adhésion ainsi qu'en améliorant l'activation et la maturation de certains CPA, suggérant que le gène *DEFA1* est impliqué dans les macrophages au sein de l'infection.

1.5.2. Objectif

Conception d'amorces spécifiques du gène *DEFA1* exprimé par les macrophages au cours de l'inflammation, de l'auto-immunité et de l'immunité anti-infectieuse.

1.5.3. But

Montre la relation entre le gène *DEFA1* et le rôle du macrophage dans l'immunité anti-infectieuse par les techniques de biologie moléculaire.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorces

La conception des amorces est un processus essentiel pour une PCR réussie. ces amorces déterminent la sensibilité, la spécificité et la robustesse de la technique. une mauvaise conception de l'amorce peut empêcher une PCR réussie (Bustin et al., 2020).

Une amorce doit être orientée durant la conception dans le sens 5'>3' et le brin d'amorce complémentaire dans l'autre sens 3'> 5'.

2.2. Critères de sélection d'amorce

Plusieurs paramètres doivent être respectés lors de la sélection des amorces. le plus important d'entre eux :

2.3. La longueur d'amorces

Pour une pcr réussie, la longueur de base de la séquence doit être comprise entre 18 et 24 et la température de recuit doit être inférieure à 50 °c. Plus la durée de l'amorce spécifique est longue, plus l'efficacité d'hybridation est faible (Lorenz, 2012).

2.4. La Température du fusion (Tf)

Pour un meilleur résultat, la température de fusion doit être comprise entre 55 et 75°C (Higgins et al., 2022).

2.5. La spécificité et la complémentarité

Il faut que les amorces soient spécifiques et uniques de la région à amplifier du génome car l'amplification d'une autre région du génome donnera des produits aspécifiques. De plus, les amorces ne doivent présenter aucune homologie à l'intérieur ou entre les amorces, car elles peuvent former des structures à double brin (épingle à cheveux), ce qui conduit alors à une hybridation désordonnée (Jiang et al., 2018).

2.6. La teneur en C/G

Ce paramètre est spécifié sous la forme d'une valeur en pourcentage destinée à indiquer la proportion de nucléotides "G" et "C" qui apparaissent dans l'amorce. Le GC idéal pour une amorce se situe généralement entre 40 et 60% sans poly-C et poly-G (Chuang et al., 2013).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

La séquence à l'extrémité 3'

La mise en œuvre de l'extrémité 3' des amorces est essentielle pour réduire le processus d'élimination, car elle favorise davantage les liaisons hydrogène entre les résidus CG, évitant ainsi le phénomène d'intégration (Ferrara et al., 2018).

2.7. La séquence de gène *DEFA1*

La conception des amorces consiste dans un premier temps à extraire la séquence du gène *DEFA1* de la base de données 'ensembl' via le site internet 'www.ensembl.org', ceci est décrit dans la figure 2.1

The screenshot shows the Ensembl website search interface. At the top, there are navigation links: BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, and More. A search bar contains the text 'Human' and 'DEFA1'. A red box labeled '1. Choisir l'espace' highlights the 'Human' dropdown menu. Another red box labeled '2. écrire le gène indiquer' highlights the 'DEFA1' input field. A third red box labeled '3. Cliquez sur Go' highlights the 'Go' button. Below the search bar, there are options for 'All genomes' and 'Favourite genomes'. The 'Favourite genomes' section lists Human (GRCv38.p13), Mouse (GRCm39), and Zebrafish (GRCz11). On the right side, there are sections for 'Ensembl Release 109 (Feb 2023)' and 'Ensembl Rapid Release'.

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl. (1) Spécifier l'espèce Humaine puis (2) inscrire le nom du gène *DEFA1* ensuite (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats (encadrer en rouge).

The screenshot shows the search results page for the gene *DEFA1*. The search criteria are 'Only searching Human' and 'DEFA1'. The results show 14 matches. The first result is highlighted with a red box and contains the text 'DEFA1 (Human Gene) ENSG0000020647'. The result includes a description: 'DEFENSIN, ALPHA 1, INCLUDED; DEFA1, INCLUDED; HUMAN NEUTROPHIL PEPTIDE 1, INCLUDED; HNP1, INCLUDED; CRYPTDIN, INCLUDED; RETROCYCLIN, INCLUDED' is an external reference matched to Gene ENSG0000020647. Below the description, there are links for 'Variant table', 'Phenotypes', 'Location', 'External Refs.', 'Regulation', 'Orthologues', and 'Gene tree'. The second result is 'DEFA1-201 (Human Transcript) ENST00000382679' with a description: 'DEFENSIN, ALPHA 1, INCLUDED; DEFA1, INCLUDED; HUMAN NEUTROPHIL PEPTIDE 1, INCLUDED; HNP1, INCLUDED; CRYPTDIN, INCLUDED; RETROCYCLIN, INCLUDED' is an external reference matched to Gene ENSG0000020647. Below the description, there are links for 'Variant table', 'Phenotypes', 'Location', 'External Refs.', 'Regulation', and 'Gene tree'. The third result is 'DEFA1-202 (Human Transcript) ENST00000382692' with a description: 'DEFENSIN, ALPHA 1, INCLUDED; DEFA1, INCLUDED; HUMAN NEUTROPHIL PEPTIDE 1, INCLUDED; HNP1, INCLUDED; CRYPTDIN, INCLUDED; RETROCYCLIN, INCLUDED' is an external reference matched to Gene ENSG0000020647. Below the description, there are links for 'Variant table', 'Phenotypes', 'Location', 'External Refs.', 'Regulation', and 'Gene tree'.

Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *DEFA1*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene **DEFA1** (ENSG00000206047). The 'Sequence' tab is highlighted with a red box. The page displays the following information:

- Gene: DEFA1** ENSG00000206047
- Description:** defensin alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2761]
- Gene Synonyms:** DEF1, DEFA2, HNP-1, MRS
- Location:** Chromosome 8: 6,977,649-6,980,092 reverse strand. GRCh38:CM000670.2
- About this gene:** This gene has 2 transcripts ([splice variants](#)), 1 gene allele, [171 orthologues](#) and [5 paralogues](#).
- Transcripts:** [Show transcript table](#)
- Summary:** Name: [DEFA1](#) (HGNC Symbol)

Figure 2.3. Caractéristiques du gène DEFA1. La plateforme de la base de données montre les différentes caractéristiques du gène DEFA1, ensuite il faut cliquer sur « Séquence » pour afficher la séquence du gène (encadrer en rouge).

The screenshot shows the DNA sequence of the DEFA1 gene. The sequence is displayed with exons highlighted in red and introns in black. The sequence is as follows:

```

>Chromosome: GRCh38: 8:6977049:6980092: -1
GAACCCAAAATGTCCTGTTCCACATAGCAACAGAAAGCCAGGTAGCACTCACTGTCACCT
CGGTGTTCCAGACATCCGAGCTGAGCCAAAGTCCCTGTTGATTGTTTTTATGGTTAGAGC
CCAGGTCCTGGGACACTGCTTTAGAAACACATTCGAAATCCTGCTGTGTGGCAGGTGG
CATTCCGATCCCAATCTCTTTGCAGGGCGTACTACTGTGATACGGAGCCAGGCTGTCCAG
AGCCCTTAATATTCCTTGTGTGAGGTAAGTTCAGCTTACCCAGAGCCCAATGCATCCAG
GGTCAACTGTTTAGAGGCCATTGAGAATCCATAGTTGGTTCGCTGGCTGGCCGTGGCCAG
GGCTGACCAAGGTAGATGAGAGGTTCTCTGTGGAGTTCTACTTTAACTCCACCTCCCA
CCAAATTCCTCAACTGCTCTCCACCCAGCAATTTAATGGAGCCAGAGAAAGTAAACC
CCCAAAAGGAGGAGGAGCTTTAAAGAGCTTTAAAGAGCTTTAAAGAGCTTTAAAGAGCT
GGCTGCTCCTTGCTATAGAAGACTGGGACAGAGGACTGCTGCTGCCCTCTGCTGGTCA
CCTGCTAGCTAGAGGATCTTAAAGTACTCAAAAAGTAAACCTTACACTGAGTITTCAT
TATTGAAGCTATAGCTCCATGCTGAGCTGTGAGCTGTGGCCAGCCAGAGAGAAAGCAAG
GGCCGAAATCCCTGCTAGGAACCTGTCTGGAGCCTTGGTGACTGCTGGGAGGATGGCT
TCCAGTAACTTAATAGAGAACTCAAGCAGTTTCTTCTAAACACACATGTCACATGTC
TCGTTGACATGTCAGTAGAGACTATCACAGGCTCTTGGAGCAATCTTTGAGAGAAAC
CAATTTAGCTGCTGCTGCTTTTCAATCAGTTTGTGATTTTGGCAATGAGTGTG
GGAAATCCCTATGATTCAGATATTTGCCCTTCGGCCATGTAAGTTTGCAGAAATTTT
CTCTCATTTCTGGGTTATCTTTTCACTCCGTTGATTTGTTCTCTTGGCTGTGAGATGCT
TTAGCCTTAAAGAGGAGGAGCTTTGATTTTCCCTTTTATGGCTGTGGCTTTGGTGT
CATAGCCAAAGAAATCATTACCTACATCAATGCAAAAAGCTTTATGCTTATACACTCT
AGTAGTTTATGGTTCAGTTTACATTTAGGTTTCAATTCATCTGAGTTGATGTTTC
TACATGGTGTGAGATAAAGATTTAAATACATACATATATAAATCATGAGGTAAGTGTAGA
CATATAATATAGCAATGTTTAAATGTTTACTGAGGCTCAAGGTGAGGTTGGAATAAAGT
TTCTTTTTTACTTAAACCACTCTGTCTGCTGAGCTGATTTGACCTTTAGGCTGATAA
AATCATTGCTCTCCACCTGATTTCTTCAAGGAGTACTTCAAGCCCAAGCTTCAAAAA
CCTTTGTATAGGATGGTCACTGATCTGAGGATGATCTGAGGATTAATGCTCCCTATGCAAT
CACTCATATAGACACCCAGAACTTAGACCTCCAGAGAACAGCAGGACCCATCTTGAGAA
AATAGAGACTTTGTTCCCTGAGCTGTTGAAATCAAGTGCATTTCTATCTTTTGG
AATGTTAAAGAGTAACTCATATATTTAAAGAGGTAAGCCAGAGTAACTAAGCAGGTT
CTTCTGTTCAATTAAGTCCCAACTAGCCAGACATTAAGGATAGAGATATACAGT
CATGAAACTGGGAGAACAGGAGCATTGAGAACCTTGGAGCCAATGGGCCCTCTTATA
AAATGCCACCTGCTCTCACTGAGATGAGGAGGTTCTTGTCTCCGAGCCTTCTCCCA
GTAGAGCTATAAATCCAGGTGGCTCCTGCTCCGACAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTCCAGGTGACCCAGCCATGAGGACCTCCGCTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTCCAGCCAGGCTGAGCCACTCCAGGCAAGAGCTGATGAGGTTGCTGAGCCGCCGAG
CAGATTCAGGCAATCCGAGAGGCTGTTGTTCCCTGCAAGGAGCAAAAGCTGCTGCT
CCAAAGCATCCAGTGGAGAGGCAAGGATGAGGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GGAGAGAGGTTCCAGAGTTGGTCTCAGCAGCTATGTCAGTGGGCTTCACTTAGA
ATCTCTGGGCTTGAATTTCTCATCTAGAAATGAAACAGAGAGCCAAATTAACATGAGAA
ACTTATTTCCGAAAGGCTGTGCTCCAAAGAACCTGTGGTAAATTCAGTAGTTTGGAG
TATGAAAGACAGACTAGTTTCTGGATTAAGCAAGTACACTAGTTGTAAGAGAA
CATTACTCTATCTACAGAGAGCTTTTAAAGACTGACAGCAAGCTGAGGATATGTT
AGGTTGTGTGTGATAGGGAGGAAATGCAAAATGAGAGCAAGAGGAAATGAGTCTCAA
TCTGAGTGAAGCACTGCTGCTGCTGTTTATCCATGCAAGTGGGTTTCTGCTGCTA
AGGCTGCAATGAGCCAGCATCACTGTCAAGTGAATGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTCTTACCACTGCTAACTCCATAACTTAAATTTCTCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAAAGAGTGGCTGCTTGGGAGAAATCCGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AACCTGCTATCCAGGAAAGACTTGGGCTTGTGCTGCTGAGCTTGCAGAAAAGAAA
AATGAGCTCAAAATTTGCTTTGAGAGCTACAGGAAATGCTATTAAGCTGCTGCTGCTG
CTCAATTTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TCTTAAATGTTGATATGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AATCAAAATTTGAAACAATAAAAATCCAAATTTAGAAATTTCAAGCAGAGTTTGGG
CTTCAGATCCAAATGAAAGAGAGGCCATGACACCACTGATTTCCGACCCACTGCT
CTGCTTTTGAAGCTGGCTGATTTCTGCTGAGACTGCTTCAAGAGCTGGGTTGGTGG
GGCAAAACATGGTGTCACTTACATTTCAATGAGCTCAAAAATCATTACTTCTGGGGA
AAAAAAACCATCTCTGTGCTAAAGAAATGAGGTTTCAATGAAACAATGTCAGATGTCAT
ATTTCTTTTAAAGACATAGGTTTACATGAGTCCAGCAAAAACCTTCAATCAGAGGG
AAATGGGTTTAAAGAGGAGCCCTCCAGCCAGCTTACTAAGACCTGGATTTCAAAATCATA
AAGTGTCTTACAGCCAGAAAACACACACACAAATGCTCCA
    
```

Figure 2.4. La séquence du gène DEFA1 depuis la plateforme « Ensembl ». Il faut sélectionner une partie de la séquence et la copier sur un document Word. Les séquences codantes (69 Exons) sont représentées en rouge et les séquences non codantes (Introns) sont représentées en noir.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Pour faciliter la recherche des amorces, il faut sélectionner une partie avant l'exon de la séquence et une partie après l'exon et ensuite encadrer la région d'intérêt (Fig 2.5)

```
CTTTCTTGTCAATTATTAGCTCCAACCTAGCACAGACATTTAAAGGTACAGATGTATACTAG
CATGAAACTGGGAGAACAGGAGCATTTCGAGCAACCTTGAGACCAATGGGCCTCTCTTATA
AAATGCACACCTCCTCTCACTGAGATTGAGGAAGGTTTCTTGTCTCCGAGCCTTCTCCCA
GTAGAGCTATAAATCCAGGCTGGCTCCTCCCTCCCCACACAGCTGCTCCTGCTCTCCCTC
CTCCAGGTGACCCCAGCCATGAGGACCCCTCGCCATCCTTGCTGCCATTCTCCTGGTGGCC
CTGCAGGCCCCAGGCTGAGCCACTCCAGGCAAGAGCTGATGAGGTTGCTGCAGCCCCGGAG
CAGATTGCAGCGGACATCCCAGAAGTGGTTGTTTCCCTTGCCATGGGACGAAAAGCTTGCT
CCAAAAGCATCCAGGTGAGAGAGGCAAGGCATGCAGAGCTGCTAAGTCTAGAGGGGAAGGACG
GGAGAGAGGTTCCAGAGTTGGGTCTCAGCAGTCTATGTCACCTGAGGTGGCTTCACTTAGA
ATCTCTGGGCATTTGATTTTCTCATCTAGAAATTGAACAGAGAGCCAAATAAACATGAGAA
ACTTTATTTCTCCAAAAGACTTGATTCCAAGAAAAGCTCTGTGAAATTCACCTAAGTTTCAGA
```

Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

2.8. Le design des Primers : outil Primer-Blast

Afin de concevoir des amorces spécifiques de la séquence d'intérêt du gène DEFA1 qu'on veut amplifier, nous avons utilisé l'outil Primer-BLAST (Figure 2.6). Cet outil se trouve dans la base de données « National Center for Biotechnology Information (NCBI) » (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les figures 2.6, 2.7 et 2.8 représentent les étapes à suivre pour l'utilisation de cet outil.

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top, there is a search bar with a dropdown menu set to 'All Databases' and a 'Search' button. Below the search bar, there is a navigation menu with 'All Resources' selected. A red box highlights the 'Resource List (A-Z)' link in the left sidebar. Another red box highlights the '1. Cliquez' button in the main content area. A third red box highlights the '2. Cliquez' button in the left sidebar. The main content area displays a list of databases, including 'Assembly', 'BioCollections', and 'BioProject (formerly Genome Project)'. The 'BioProject' entry is highlighted.

Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

[PSSM Viewer](#)

Allows users to display, sort, subset and download position-specific score matrices (PSSMs) either from CDD records or from Position Specific Iterated (PSI)-BLAST protein searches. The tool also can align a query protein to the PSSM and highlight positions of high conservation.

[Phenotype-Genotype Integrator \(PheGenI\)](#)

Supports finding human phenotype/genotype relationships with queries by phenotype, chromosome location, gene, and SNP identifiers. Currently includes information from dbGaP, the NHGRI GWAS Catalog, and GTEx. Displays results on the genome, on sequence, or in tables for download.

Primer-BLAST

The Primer-BLAST tool uses Primer3 to design PCR primers to a sequence template. The potential products are then automatically analyzed with a BLAST search against user specified databases, to check the specificity to the target intended.

[ProSplign](#)

A utility for computing alignment of proteins to genomic nucleotide sequence. It is based on a variation of the Needleman Wunsch global alignment algorithm and specifically accounts for introns and splice signals. Due to this algorithm, ProSplign is accurate in determining splice sites and tolerant to sequencing errors.

[PubChem Power User Gateway \(PUG\)](#)

PUG provides access to PubChem services via a programmatic interface. PUG allows users to download data, initiate chemical structure searches, standardize chemical structures and interact with the E-utilities. PUG can be accessed using either standard URLs or via SOAP.

[PubChem Standardization Service](#)

Standardization, in PubChem terminology, is the processing of chemical structures in the same way used to create

Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST

Figure 2.8. L'Outil Primer-BLAST. (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, ensuite (2) copier la région d'intérêt encadrer du document Word et la coller dans la case « Enter accession, gi, or FASTA sequence » (encadrer en rouge), puis (3) supprimer les espaces entre les lignes (indiquer par la flèche rouge et l'espace en bleu), ensuite (4,5,6,7) on détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primers).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Afin d'optimiser les résultats, certains paramètres doivent être pris en considération lors de

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template ?

Search mode Automatic ?

Database Genomes for selected eukaryotic organisms (primary assembly only) ? 1

Exclusion Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences ?

Organism Homo sapiens Add organism ? 2

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. ?

Entrez query (optional) ?

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. ? Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer. ?

Max target amplicon size 4000 ?

Allow splice variants Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

Get Primers 4

Show results in a new window Use new graphic view ? 3

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

la conception des amorces (Fig 2.9).

Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters. Faites défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », puis (3) cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'affichent dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

2.9. Caractéristiques d'une bonne amorce

Après avoir visualisé les résultats des amorces, nous sélectionnons une paire d'amorces qui répond aux critères suivants :

- Il doit contenir moins de 1000 bases car la PCR n'amplifie pas les séquences supérieures à 1000 bases
- Sa teneur en GC doit être proche de 40%.
- Les températures de l'hybridation de deux préfixes (sens et anti-sens) doivent être aussi proches que possible l'une de l'autre, car lors de la technique PCR, la température de l'hybridation est programmée à une seule valeur.
- Tous les produits non spécifiés pour l'appât spécifié doivent être supérieurs à 1 000 bases.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.10. *In-silico* PCR

Nous avons soumis les séquences des amorces sélectionnées pour une analyse de confirmation, afin de vérifier la fiabilité des amorces et ceci grâce à une investigation PCR *in silico* (PCR virtuelle) qui est réalisée par le logiciel de la plateforme « ucsc genome browser (genome.ucsc.edu.) (Fig 2.10).

The image shows the UCSC Genome Browser interface. At the top, the logo for the University of California Santa Cruz Genomics Institute is visible. Below the logo is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. The 'Tools' menu is open, showing a list of tools: Blat, In-Silico PCR, Table Browser, LiftOver, Gene Sorter, Variant Annotation Integrator, Data Integrator, Genome Graphs, Gene Interactions, and Other Tools. The 'In-Silico PCR' option is highlighted. Below the menu, there is a list of tool descriptions: Genome Browser, BLAT, In-Silico PCR, Table Browser, and LiftOver. The 'UCSC In-Silico PCR' tool page is also visible, showing a search form with fields for Genome, Assembly, Target, Forward Primer, Reverse Primer, Max Product Size, Min Perfect Match, Min Good Match, and Flip Reverse Primer. Below the form, there is an 'About In-Silico PCR' section with a description and configuration options.

Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ».
(1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », puis (2) cliquer sur « Tools », ensuite (3) cliquer sur « *in silico* PCR ».

Chapitre 3. Résultats

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats du Primer-BLAST

La conception des amorces pour le gène *DEFA1* est passée par plusieurs étapes. tout d'abord, le site Ensembl a été utilisé afin d'obtenir l'intégrité du gène *DEFA1*. ce gène est composé de 3 exons. dans cette étude, nous avons sélectionné l'exon 2. nous avons ensuite utilisé le programme primer-blast dans la base de données ncbi. ce dernier nous a permis d'obtenir 10 paires d'amorces pour le gène *DEFA1* à partir de l'exon 2.

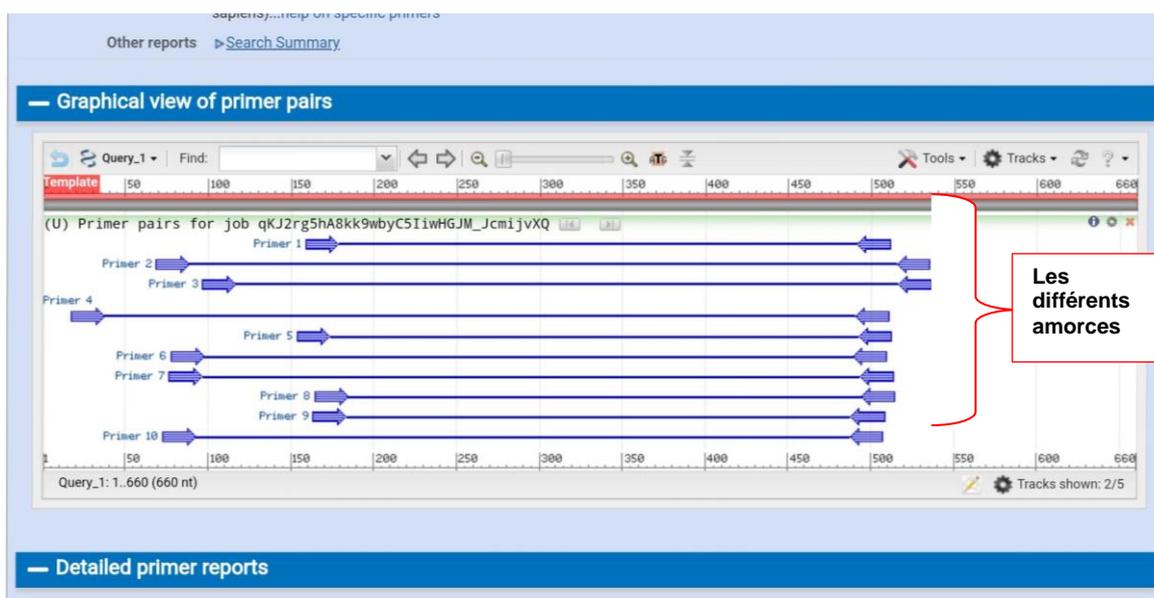


Figure 3.1. Les amorces. La page des résultats s'affiche comme en dessus, en rouge c'est la séquence complète et les flèches en bleu représentent les différentes amorces.

La paire d'amorce numéro 1 a été choisie (Fig 3.2) car elle répond aux critères mentionnés précédemment et qui sont représentés dans tableau 3.1 ci-dessous :

Chapitre 3. Résultats

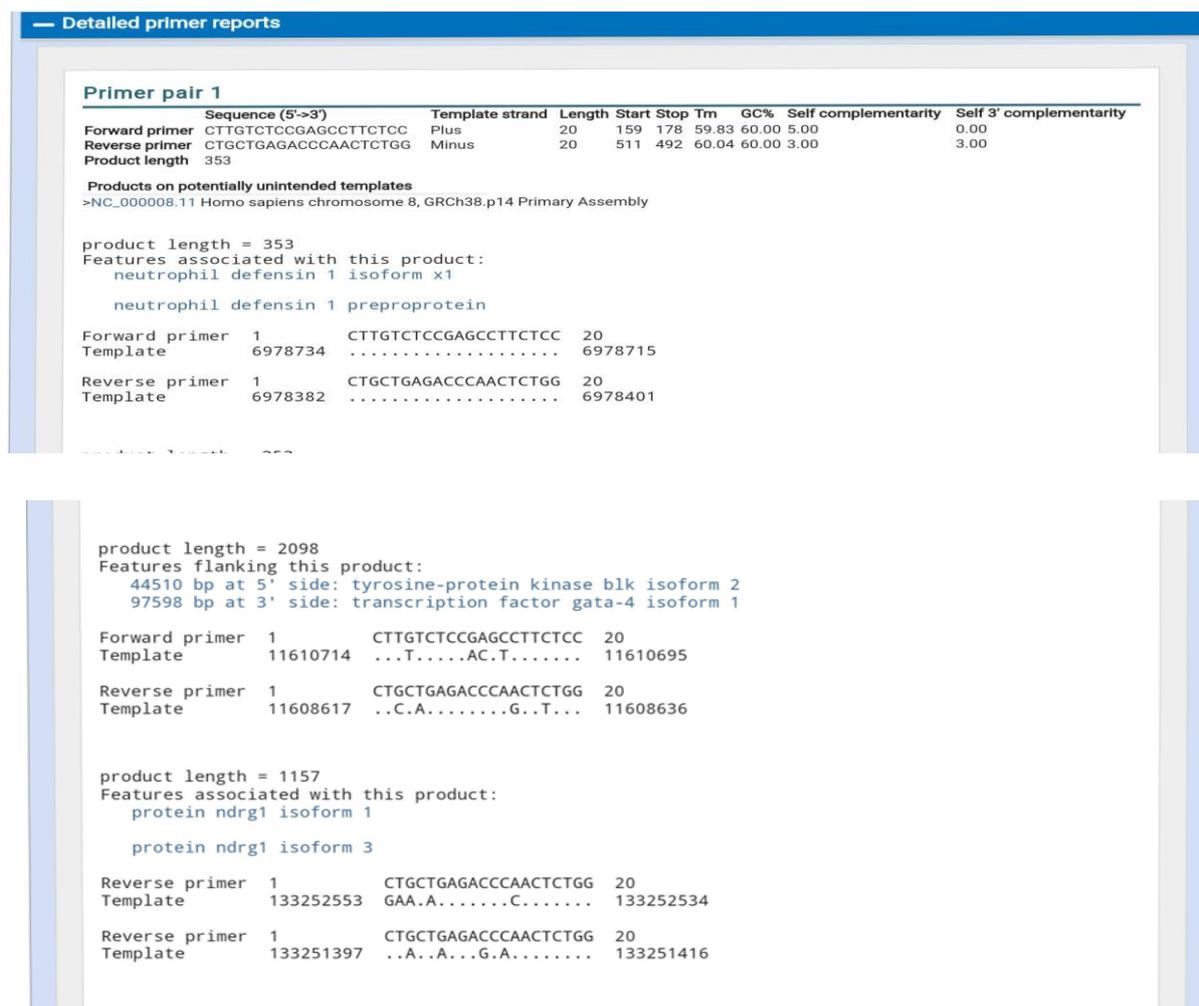


Figure 3.2. Caractéristiques de la paire d'amorces choisie.

Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce.

Les critères	Taux optimale	Notre amorce
Longueur	16 à 28 nucléotides	20 nucléotides pour les deux amorces sens et anti-sens
Température de fusion	50 C et 62 C	Amorces sens (59.83 C) Amorces anti-sens (60.04 C)
Teneur en CG	40 à 60%	Amorces sens (60%) Amorces anti-sens (60%)
Amorce spécifique	Inférieur à 1000 pb	353pd
Produits aspécifiques	Supérieur à 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les principales causes de décès dans le monde sont les maladies infectieuses. 17 millions de décès par an parmi la population mondiale.

Parmi les actions de l'organisme dans la lutte contre ces maladies l'utilisation de la molécule defa1 par plusieurs types de cellules, notamment les macrophages. La molécule est cruciale pour la défense contre les agents pathogènes infectieux . contexte se concentrer sur la mesure de son niveau au cours de l' infection en examinant comment il est exprimé par les macrophages à l'aide de techniques de biologie moléculaire comme la PCR.

Les macrophages se caractérisent par une grande plasticité d'où leur rôle d'agents anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. Les macrophages M1 ont le potentiel d'induire des réponses inflammatoires et des marqueurs dont *DEFA1*. Les macrophages M1 ont le potentiel d'induire des réponses inflammatoires et des marqueurs dont defa1 car ce dernier induit des cytokines pro-inflammatoires qui aident à l'expression des macrophages M1 lors de l'infection. Compte tenu du rôle prédominant que joue *DEFA1* dans le processus inflammatoire, il est judicieux d'étudier l'expression du gène dans divers processus physiopathologiques. cela comprend le développement d'amorces spécifiques qui entourent la séquence d'ADN d'intérêt, ce qui est une étape critique pour réussir la PCR.

Au cours de ce travail, nous avons eu accès à la séquence génomique du gène *DEFA1*, et dans ce dernier, nous avons pu concevoir précisément deux amorces pour identifier une région d'intérêt au niveau de l'exon 02 du gène *DEFA1*. cela sera utilisé pour amplifier le gène à l'aide de la PCR.

On a eu comme résultats à l'aide de l'outil primer-blast un couple d'amorces bien spécifique nécessaire à l'amplification de l'exon 02, la séquence de l'amorce sens (forward primer) : 5' CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC 3' et la séquence de l'amorce anti-sens (reverse primer) : 5'CTGCTGAGACCCAACTCTGG 3'.

Sur le plan perspective, les amorces conçues dans cette étude sont indispensables à toute étude de recherche ultérieure liée à l'expression du gène *DEFA1* afin de détecter la présence ou l'absence de mutations ou de constater les différences génétiques au niveau de ce gène et aussi ses différentes fonctions dans plusieurs maladies.

Ce travail m'a permis de me familiariser avec différents outils dans le domaine de la bioinformatique tels que la recherche de séquences génétiques dans des bases de

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

données, le développement d'amorces spécifiques à l'aide de programmes informatiques, et ainsi connaître les propriétés essentielles en temps opportun procédure PCR.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Chapitre 5. Références bibliographiques

A

Agrawal, Hitesh, Sunil S. Tholpady, Anthony E. Capito, David B. Drake, et Adam J. Katz. 2012. « Macrophage phenotypes correspond with remodeling outcomes of various acellular dermal matrices ». *Open Journal of Regenerative Medicine* 01 (03): 51-59. <https://doi.org/10.4236/ojrm.2012.13008>.

Anantharajah, Ahalieyah, Marie-Paule Mingeot-Leclercq, et Françoise Van Bambeke. 2016. « Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (9): 734-49. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.011>.

Armentrout, Erin I., Emma C. Kundracik, et Arne Rietsch. 2021. « Cell- type- specific Hypertranslocation of Effectors by the *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System ». *Molecular Microbiology* 115 (2): 305-19. <https://doi.org/10.1111/mmi.14617>.

Arnett, Eusondia, Robert I. Lehrer, Pratikhya Pratikhya, Wuyuan Lu, et Stephanie Seveau. 2011. « Defensins Enable Macrophages to Inhibit the Intracellular Proliferation of *Listeria Monocytogenes*: Defensins Inhibit *Listeria* Multiplication in Macrophages ». *Cellular Microbiology* 13 (4): 635-51. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01563.x>.

B

Bakema, J E, et M Van Egmond. 2011. « The Human Immunoglobulin A Fc Receptor FcαRI: A Multifaceted Regulator of Mucosal Immunity ». *Mucosal Immunology* 4 (6): 612-24. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.36>.

Basset, Christelle, John Holton, Rachel O'Mahony, et Ivan Roitt. 2003. « Innate Immunity and Pathogen–Host Interaction ». *Vaccine* 21 (juin): S12-23. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00195-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00195-6).

Bastaert, Fabien, Saadé Kheir, Vinciane Saint-Criq, Bérengère Villeret, Pham My-Chan Dang, Jamel El-Benna, Jean-Claude Sirard, Romé Voulhoux, et Jean-Michel Sallenave. 2018. « *Pseudomonas aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation ». *Frontiers in Immunology* 9 (juillet): 1675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01675>.

Beckert, Urike, Sabine Wolter, Christina Hartwig, Heike Bähre, Volkhart Kaefer, Daniel Ladant, Dara W. Frank, et Roland Seifert. 2014. « ExoY from *Pseudomonas Aeruginosa* Is a Nucleotidyl Cyclase with Preference for CGMP and CUMP Formation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450 (1): 870-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.088>.

Ben Haj Khalifa, Anis, Didier Moissenet, Hoang Vu Thien, et Mohamed Khedher. 2011. « Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation ». *Annales de biologie clinique* 69 (4): 393-403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>.

Bezzetti, Valentino, Pio d'Adamo, Alessandro Rimessi, Carmen Lanzara, Sergio Crovella, Elena Nicolis, Anna Tamanini, et al. 2011. « Phospholipase C-B3 Is a Key Modulator of IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells ». *The Journal of Immunology* 186 (8): 4946-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003535>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Bianconi, Irene, Silvia D'Arcangelo, Alfonso Esposito, Mattia Benedet, Elena Piffer, Grazia Dinnella, Paola Gualdi, et al. 2019. « Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study ». *Frontiers in Microbiology* 9 (janvier): 3242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03242>.

Bradshaw, Jessica L., Armando R. Caballero, Michael A. Bierdeman, Kristen V. Adams, Haley R. Pipkins, Aihua Tang, Richard J. O'Callaghan, et Larry S. McDaniel. 2018. « *Pseudomonas Aeruginosa* Protease IV Exacerbates Pneumococcal Pneumonia and Systemic Disease ». Édité par Sarah E. F. D'Orazio. *MSphere* 3 (3): e00212-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00212-18>.

Breidenstein, Elena B.M., César De La Fuente-Núñez, et Robert E.W. Hancock. 2011. « *Pseudomonas Aeruginosa*: All Roads Lead to Resistance ». *Trends in Microbiology* 19 (8): 419-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.

Bruhn, Oliver, Petra Regenhard, Matthias Michalek, Sven Paul, Christoph Gelhaus, Sascha Jung, Georg Thaller, et al. 2007. « A Novel Horse α -Defensin: Gene Transcription, Recombinant Expression and Characterization of the Structure and Function ». *Biochemical Journal* 407 (2): 267-76. <https://doi.org/10.1042/BJ20070747>.

C

Campbell-Valois, François-Xavier, Matthias Trost, Magali Chemali, Brian D. Dill, Annie Laplante, Sophie Duclos, Shayan Sadeghi, et al. 2012. « Quantitative Proteomics Reveals That Only a Subset of the Endoplasmic Reticulum Contributes to the Phagosome ». *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (7): M111.016378-1-M111.016378-13. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016378>.

Campodónico, Victoria L., Nicolás J. Llosa, Martha Grout, Gerd Döring, Tomás Maira-Litrán, et Gerald B. Pier. 2010. « Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas Aeruginosa* as Vaccines ». *Infection and Immunity* 78 (2): 746-55. <https://doi.org/10.1128/IAI.00806-09>.

Canton, Johnathan, Dante Neculai, et Sergio Grinstein. 2013. « Scavenger Receptors in Homeostasis and Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 13 (9): 621-34. <https://doi.org/10.1038/nri3515>.

Castanheira, Mariana, Janet C. Mills, David J. Farrell, et Ronald N. Jones. 2014. « Mutation-Driven β -Lactam Resistance Mechanisms among Contemporary Ceftazidime-Nonsusceptible *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from U.S. Hospitals ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (11): 6844-50. <https://doi.org/10.1128/AAC.03681-14>.

Chaly, Y. V., E. M. Paleolog, T. S. Kolesnikova, I. I. Tikhonov, E. V. Petratchenko, et N. N. Voitenok. 2000. « Neutrophil Alpha-Defensin Human Neutrophil Peptide Modulates Cytokine Production in Human Monocytes and Adhesion Molecule Expression in Endothelial Cells ». *European Cytokine Network* 11 (2): 257-66.

Chambers, Jacob R., Kathryn E. Cherny, et Karin Sauer. 2017. « Susceptibility of *Pseudomonas Aeruginosa* Dispersed Cells to Antimicrobial Agents Is Dependent on the Dispersion Cue and Class of the Antimicrobial Agent Used ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (12): e00846-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00846-17>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Chang, Theresa L., Jesus Vargas, Armando DelPortillo, et Mary E. Klotman. 2005. « Dual Role of α -Defensin-1 in Anti-HIV-1 Innate Immunity ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (3): 765-73. <https://doi.org/10.1172/JCI21948>.

Chavali, S., A. Mahajan, R. Tabassum, S. Maiti, et D. Bharadwaj. 2005. « Oligonucleotide Properties Determination and Primer Designing: A Critical Examination of Predictions ». *Bioinformatics* 21 (20): 3918-25. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti633>.

Chevalier, Sylvie, Emeline Bouffartigues, Josselin Bodilis, Olivier Maillot, Olivier Lesouhaitier, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange, Alain Dufour, et Pierre Cornelis. 2017. « Structure, Function and Regulation of *Pseudomonas Aeruginosa* Porins ». *FEMS Microbiology Reviews* 41 (5): 698-722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.

Chuang, Li-Yeh, Yu-Huei Cheng, et Cheng-Hong Yang. 2013. « Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction ». *Biotechnology Letters* 35 (10): 1541-49. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.

Clevers, Hans C., et Charles L. Bevins. 2013. « Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts ». *Annual Review of Physiology* 75 (1): 289-311. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>.

Cornelis, Pierre. 2010. « Iron Uptake and Metabolism in Pseudomonads ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (6): 1637-45. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2550-2>.

Cross, Ashley R., Vishnu Raghuram, Zihuan Wang, Debayan Dey, et Joanna B. Goldberg. 2020. « Overproduction of the AlgT Sigma Factor Is Lethal to Mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par George O'Toole. *Journal of Bacteriology* 202 (20). <https://doi.org/10.1128/JB.00445-20>.

Cunrath, Olivier, Gwenaëlle Graulier, Ana Carballido-Lopez, Julien Pérard, Anne Forster, Valérie A Geoffroy, Pamela Saint Auguste, et al. 2020. « The Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* Optimizes the Production of the Siderophore Pyochelin upon Environmental Challenges ». *Metallomics* 12 (12): 2108-20. <https://doi.org/10.1039/d0mt00029a>.

D

Dambuzza, Ivy M, et Gordon D Brown. 2015. « C-Type Lectins in Immunity: Recent Developments ». *Current Opinion in Immunology* 32 (février): 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.002>.

Davies, Luke C, Stephen J Jenkins, Judith E Allen, et Philip R Taylor. 2013. « Tissue-Resident Macrophages ». *Nature Immunology* 14 (10): 986-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.

De Leeuw, Erik, Changqing Li, Pengyun Zeng, Chong Li, Marlies Diepeveen-de Buin, Wei-Yue Lu, Eefjan Breukink, et Wuyuan Lu. 2010. « Functional Interaction of Human Neutrophil Peptide-1 with the Cell Wall Precursor Lipid II ». *FEBS Letters* 584 (8): 1543-48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>.

Deng, Lishuang, Zhijie Jian, Tong Xu, Fengqin Li, Huidan Deng, Yuancheng Zhou, Siyuan Lai, Zhiwen Xu, et Ling Zhu. 2023. « Macrophage Polarization: An Important Candidate Regulator for Lung Diseases ». *Molecules* 28 (5): 2379. <https://doi.org/10.3390/molecules28052379>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Dey, Adwitia, Joselyn Allen, et Pamela A. Hankey-Giblin. 2015. « Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes Versus Tissue Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 5 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00683>.

Dickey, Seth W., Gordon Y. C. Cheung, et Michael Otto. 2017. « Different Drugs for Bad Bugs: Antivirulence Strategies in the Age of Antibiotic Resistance ». *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (7): 457-71. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>.

Diggle, Stephen P., et Marvin Whiteley. 2020. « Microbe Profile: Pseudomonas Aeruginosa: Opportunistic Pathogen and Lab Rat: This Article Is Part of the Microbe Profiles Collection. » *Microbiology* 166 (1): 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>.

———. 2021. « Corrigendum: Microbe Profile: Pseudomonas Aeruginosa: Opportunistic Pathogen and Lab Rat ». *Microbiology* 167 (8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001073>.

Donadon, Matteo, Guido Torzilli, Nina Cortese, Cristiana Soldani, Luca Di Tommaso, Barbara Franceschini, Roberta Carriero, et al. 2020. « Macrophage Morphology Correlates with Single-Cell Diversity and Prognosis in Colorectal Liver Metastasis ». *Journal of Experimental Medicine* 217 (11): e20191847. <https://doi.org/10.1084/jem.20191847>.

Duque-Correa, María A., Anja A. Kühl, Paulo C. Rodriguez, Ulrike Zedler, Sandra Schommer-Leitner, Martin Rao, January Weiner, et al. 2014. « Macrophage Arginase-1 Controls Bacterial Growth and Pathology in Hypoxic Tuberculosis Granulomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (38). <https://doi.org/10.1073/pnas.1408839111>.

E

Elbargisy, Rehab Mohammed. 2021. « Optimization of Nutritional and Environmental Conditions for Pyocyanin Production by Urine Isolates of Pseudomonas Aeruginosa ». *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (1): 993-1000. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.031>.

El-Housseiny, Ghadir S., Khaled M. Aboshanab, Mohammad M. Aboulwafa, et Nadia A. Hassouna. 2020. « Structural and Physicochemical Characterization of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas Aeruginosa P6 ». *AMB Express* 10 (1): 201. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01141-0>.

F

Fernández, Lucía, Elena B.M. Breidenstein, et Robert E.W. Hancock. 2011. « Creeping Baselines and Adaptive Resistance to Antibiotics ». *Drug Resistance Updates* 14 (1): 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>.

Flannagan, Ronald S., Valentin Jaumouillé, et Sergio Grinstein. 2012. « The Cell Biology of Phagocytosis ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 (1): 61-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>.

Flemming, Hans-Curt, et Stefan Wuertz. 2019. « Bacteria and Archaea on Earth and Their Abundance in Biofilms ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (4): 247-60. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>.

Forstermann, U., et W. C. Sessa. 2012. « Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function ». *European Heart Journal* 33 (7): 829-37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Freeman, Spencer A., et Sergio Grinstein. 2014. « Phagocytosis: Receptors, Signal Integration, and the Cytoskeleton ». *Immunological Reviews* 262 (1): 193-215. <https://doi.org/10.1111/imr.12212>.

Freschi, Luca, Claire Bertelli, Julie Jeukens, Matthew P Moore, Irena Kukavica-Ibrulj, Jean-Guillaume Emond-Rheault, Jérémie Hamel, et al. 2018. « Genomic Characterisation of an International *Pseudomonas Aeruginosa* Reference Panel Indicates That the Two Major Groups Draw upon Distinct Mobile Gene Pools ». *FEMS Microbiology Letters* 365 (14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny120>.

Freschi, Luca, Antony T Vincent, Julie Jeukens, Jean-Guillaume Emond-Rheault, Irena Kukavica-Ibrulj, Marie-Josée Dupont, Steve J Charette, Brian Boyle, et Roger C Levesque. 2019. « The *Pseudomonas Aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity ». Édité par Bill Martin. *Genome Biology and Evolution* 11 (1): 109-20. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>.

Frigui, S., A. A. Messadi, et L. Thabet. 2020. « [Not Available] ». *Annals of Burns and Fire Disasters* 33 (4): 304-11.

Frodermann, Vanessa, et Matthias Nahrendorf. 2018. « Macrophages and Cardiovascular Health ». *Physiological Reviews* 98 (4): 2523-69. <https://doi.org/10.1152/physrev.00068.2017>.

G

Galdino, Anna Clara M., Marta H. Branquinha, André L. S. Santos, et Lívia Viganor. 2017. « *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host ». In *Pathophysiological Aspects of Proteases*, édité par Sajal Chakraborti et Naranjan S. Dhalla, 381-97. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16.

Galdino, Anna Clara M., Lívia Viganor, Alexandre A. De Castro, Elaine F. F. Da Cunha, Thaís P. Mello, Larissa M. Mattos, Marcos D. Pereira, et al. 2019. « Disarming *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target ». *Frontiers in Microbiology* 10 (août): 1701. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01701>.

Galvão-Peña, Silvia, et Luke A. J. O'Neill. 2014. « Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization ». *Frontiers in Immunology* 5 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00420>.

Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Gellatly, Shaan L., et Robert E.W. Hancock. 2013. « *Pseudomonas Aeruginosa*: New Insights into Pathogenesis and Host Defenses ». *Pathogens and Disease* 67 (3): 159-73. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.

Ghafoor, Aamir, Iain D. Hay, et Bernd H. A. Rehm. 2011. « Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5238-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>.

Ghannam, Mousa G., et Matthew Varacallo. 2023. « Biochemistry, Polymerase Chain Reaction ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Goltermann, Lise, et Tim Tolker-Nielsen. 2017. « Importance of the Exopolysaccharide Matrix in Antimicrobial Tolerance of *Pseudomonas Aeruginosa* Aggregates ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (4): e02696-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02696-16>.

Gordon, Siamon, Annette Plüddemann, et Fernando Martinez Estrada. 2014. « Macrophage Heterogeneity in Tissues: Phenotypic Diversity and Functions ». *Immunological Reviews* 262 (1): 36-55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>.

Gorgani, Nick N., Jeannie Q. He, Kenneth J. Katschke, Karim Y. Helmy, Hongkang Xi, Micah Steffek, Philip E. Hass, et Menno Van Lookeren Campagne. 2008. « Complement Receptor of the Ig Superfamily Enhances Complement-Mediated Phagocytosis in a Subpopulation of Tissue Resident Macrophages ». *The Journal of Immunology* 181 (11): 7902-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7902>.

H

Hauser, Alan R. 2009. « The Type III Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa*: Infection by Injection ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (9): 654-65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.

He, Chenxi, Yilong Zhou, Feng Liu, Haipeng Liu, Hao Tan, Shouguang Jin, Weihui Wu, et Baoxue Ge. 2017. « Bacterial Nucleotidyl Cyclase Inhibits the Host Innate Immune Response by Suppressing TAK1 Activation ». Édité par Beth McCormick. *Infection and Immunity* 85 (9): e00239-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00239-17>.

Huszczynski, Steven M., Joseph S. Lam, et Cezar M. Khursigara. 2019. « The Role of *Pseudomonas Aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology ». *Pathogens* 9 (1): 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>.

I

Iiyama, Kazuhiro, Eigo Takahashi, Jae Man Lee, Hiroaki Mon, Mai Morishita, Takahiro Kusakabe, et Chisa Yasunaga-Aoki. 2017. « Alkaline Protease Contributes to Pyocyanin Production in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *FEMS Microbiology Letters* 364 (7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx051>.

Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. 2015. « Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System ». *Nature Immunology* 16 (4): 343-53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>.

J

Jacobsen, Theis, Benjamin Bardiaux, Olivera Francetic, Nadia Izadi-Pruneyre, et Michael Nilges. 2020. « Structure and Function of Minor Pilins of Type IV Pili ». *Medical Microbiology and Immunology* 209 (3): 301-8. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00642-5>.

Jaffrey, Samie R., et Solomon H. Snyder. 1995. « Nitric Oxide: A Neural Messenger ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11 (1): 417-40. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002221>.

Javanmardi, Fatemeh, Amir Emami, Neda Pirbonyeh, Abdolkhalegh Keshavarzi, et Mahrokh Rajaei. 2019. « A Systematic Review and Meta-Analysis on Exo-Toxins Prevalence in Hospital Acquired *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates ». *Infection, Genetics and Evolution* 75 (novembre): 104037. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104037>.

Johann, Sarah, Thomas-Benjamin Seiler, Till Tiso, Kerstin Bluhm, Lars M. Blank, et Henner Hollert. 2016. « Mechanism-Specific and Whole-Organism Ecotoxicity of Mono-

Chapitre 5. Références bibliographiques

Rhamnolipids ». *Science of The Total Environment* 548-549 (avril): 155-63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.066>.

Juhas, Ulana, Monika Ryba-Stanisławowska, Patryk Szargiej, et Jolanta Myśliwska. 2015. « Different pathways of macrophage activation and polarization ». *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 69 (avril): 496-502. <https://doi.org/10.5604/17322693.1150133>.

Jurado-Martín, Irene, Maite Sainz-Mejías, et Siobhán McClean. 2021. « Pseudomonas Aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (6): 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.

K

Kadri, Karim. 2020. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.

Kao, Cheng-Yen, Shu-Sheng Chen, Kuei-Hsiang Hung, Hsiu-Mei Wu, Po-Ren Hsueh, Jing-Jou Yan, et Jiunn-Jong Wu. 2016. « Overproduction of Active Efflux Pump and Variations of OprD Dominate in Imipenem-Resistant Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Patients with Bloodstream Infections in Taiwan ». *BMC Microbiology* 16 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0719-2>.

Kapellos, Theodore S., et Asif J. Iqbal. 2016. « Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation ». *Mediators of Inflammation* 2016: 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/6591703>.

Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2011. « Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity ». *Immunity* 34 (5): 637-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>.

Kielbik, Szulc-Kielbik, et Klink. 2019. « The Potential Role of INOS in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (7): 1751. <https://doi.org/10.3390/ijms20071751>.

Kim, Chun, Nadesan Gajendran, Hans-Willi Mittrücker, Matthias Weiwad, Young-Hwa Song, Robert Hurwitz, Matthias Wilmanns, Gunter Fischer, et Stefan H. E. Kaufmann. 2005. « Human α -Defensins Neutralize Anthrax Lethal Toxin and Protect against Its Fatal Consequences ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (13): 4830-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500508102>.

Kuang, Zhizhou, Yonghua Hao, Brent E. Walling, Jayme L. Jeffries, Dennis E. Ohman, et Gee W. Lau. 2011. « Pseudomonas Aeruginosa Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A ». Édité par Santanu Bose. *PLoS ONE* 6 (11): e27091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027091>.

Kumar, Anil, et Nikita Chordia. 2015. « In Silico PCR Primer Designing and Validation ». In *PCR Primer Design*, édité par Chhandak Basu, 1275:143-51. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_10.

Kumar, Ashutosh, Anwar Alam, Mamta Rani, Nasreen Z. Ehtesham, et Seyed E. Hasnain. 2017. « Biofilms: Survival and Defense Strategy for Pathogens ». *International Journal of Medical Microbiology* 307 (8): 481-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

L

LaBauve, Annette E., et Matthew J. Wargo. 2012. « Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Current Protocols in Microbiology* 25 (1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>.

Lavoie, Elise G., Tamding Wangdi, et Barbara I. Kazmierczak. 2011. « Innate Immune Responses to *Pseudomonas Aeruginosa* Infection ». *Microbes and Infection* 13 (14-15): 1133-45. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.

Lee, Jasmine, Jien Wu, Yinyue Deng, Jing Wang, Chao Wang, Jianhe Wang, Changqing Chang, Yihu Dong, Paul Williams, et Lian-Hui Zhang. 2013. « A Cell-Cell Communication Signal Integrates Quorum Sensing and Stress Response ». *Nature Chemical Biology* 9 (5): 339-43. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>.

Lehrer, Robert I., et Wuyuan Lu. 2012. « α -Defensins in Human Innate Immunity: α -Defensins ». *Immunological Reviews* 245 (1): 84-112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x>.

Levin-Konigsberg, Roni, et Adriana R. Mantegazza. 2021. « A Guide to Measuring Phagosomal Dynamics ». *The FEBS Journal* 288 (5): 1412-33. <https://doi.org/10.1111/febs.15506>.

Li, Xi-Hui, et Joon-Hee Lee. 2019. « Quorum Sensing-Dependent Post-Secretional Activation of Extracellular Proteases in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (51): 19635-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011047>.

Lijia, Zhang, Siqi Zhao, Xiaoxiao Wang, Chunfu Wu, et Jingyu Yang. 2012. « A Self-Propelling Cycle Mediated by Reactive Oxide Species and Nitric Oxide Exists in LPS-Activated Microglia ». *Neurochemistry International* 61 (7): 1220-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.002>.

Lirk, Philipp, Georg Hoffmann, et Josef Rieder. 2002. « Inducible Nitric Oxide Synthase - Time for Reappraisal ». *Current Drug Target -Inflammation & Allergy* 1 (1): 89-108. <https://doi.org/10.2174/1568010023344913>.

López-Causapé, Carla, Estrella Rojo-Moliner, María D Macià, et Antonio Oliver. 2015. « The Problems of Antibiotic Resistance in Cystic Fibrosis and Solutions ». *Expert Review of Respiratory Medicine* 9 (1): 73-88. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.995640>.

M

Maldonado, Rita F., Isabel Sá-Correia, et Miguel A. Valvano. 2016. « Lipopolysaccharide Modification in Gram-Negative Bacteria during Chronic Infection ». Édité par Chris Whitfield. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (4): 480-93. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>.

Mancl, Jordan M., Cristian Suarez, Wenguang G. Liang, David R. Kovar, et Wei-Jen Tang. 2020. « *Pseudomonas Aeruginosa* Exoenzyme Y Directly Bundles Actin Filaments ». *Journal of Biological Chemistry* 295 (11): 3506-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012320>.

Mann, Ethan E., et Daniel J. Wozniak. 2012. « *Pseudomonas* Biofilm Matrix Composition and Niche Biology ». *FEMS Microbiology Reviews* 36 (4): 893-916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Mariani, Samanta Antonella, Zhuan Li, Siobhan Rice, Carsten Krieg, Stamatina Fragkogianni, Mark Robinson, Chris Sebastiaan Vink, Jeffrey William Pollard, et Elaine Dzierzak. 2019. « Pro-Inflammatory Aorta-Associated Macrophages Are Involved in Embryonic Development of Hematopoietic Stem Cells ». *Immunity* 50 (6): 1439-1452.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.003>.

Maurice, Nicholas M., Brahmchetna Bedi, et Ruxana T. Sadikot. 2018. « *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 58 (4): 428-39. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>.

Michalska, Marta, et Philipp Wolf. 2015. « *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing ». *Frontiers in Microbiology* 6 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.

Monturiol-Gross, Laura, Fabian Villalta-Romero, Marietta Flores-Díaz, et Alberto Alape-Girón. 2021. « Bacterial Phospholipases C with Dual Activity: Phosphatidylcholinesterase and Sphingomyelinase ». *FEBS Open Bio*, novembre, 2211-5463.13320. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13320>.

Mulcahy, Lawrence R., Vincent M. Isabella, et Kim Lewis. 2014. « *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in Disease ». *Microbial Ecology* 68 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>.

Munita, Jose M., et Cesar A. Arias. 2016. « Mechanisms of Antibiotic Resistance ». Édité par Indira T. Kudva et Qijing Zhang. *Microbiology Spectrum* 4 (2): 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

N

Nickzad, A., et E. Déziel. 2014. « The Involvement of Rhamnolipids in Microbial Cell Adhesion and Biofilm Development - an Approach for Control? » *Letters in Applied Microbiology* 58 (5): 447-53. <https://doi.org/10.1111/lam.12211>.

Nomura, Kazuaki, Kazufumi Obata, Takashi Keira, Ryo Miyata, Satoshi Hirakawa, Ken-ichi Takano, Takayuki Kohno, Norimasa Sawada, Tetsuo Himi, et Takashi Kojima. 2014. « *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase Causes Transient Disruption of Tight Junctions and Downregulation of PAR-2 in Human Nasal Epithelial Cells ». *Respiratory Research* 15 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-21>.

O

Odegaard, Justin I., Kirthana Ganeshan, et Ajay Chawla. 2013. « Adipose Tissue Macrophages: Amicus Adipem? » *Cell Metabolism* 18 (6): 767-68. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.011>.

O'Donnell, J. Nicholas, Monique R. Bidell, et Thomas P. Lodise. 2020. « Approach to the Treatment of Patients with Serious Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infections ». *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, août, phar.2449. <https://doi.org/10.1002/phar.2449>.

Olefsky, Jerrold M., et Christopher K. Glass. 2010. « Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance ». *Annual Review of Physiology* 72 (1): 219-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Orecchioni, Marco, Yanal Ghosheh, Akula Bala Pramod, et Klaus Ley. 2019. « Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10 (mai): 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.

Ostrowski, Philip P., Sergio Grinstein, et Spencer A. Freeman. 2016. « Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis ». *Developmental Cell* 38 (2): 135-46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.023>.

Ozer, Eden, Karin Yaniv, Einat Chetrit, Anastasya Boyarski, Michael M. Meijler, Ronen Berkovich, Ariel Kushmaro, et Lital Alfonta. 2021. « An inside Look at a Biofilm: *Pseudomonas Aeruginosa* Flagella Biotracking ». *Science Advances* 7 (24): eabg8581. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8581>.

Ozer, Egon A, Jonathan P Allen, et Alan R Hauser. 2014. « Characterization of the Core and Accessory Genomes of *Pseudomonas Aeruginosa* Using Bioinformatic Tools Spine and AGEnt ». *BMC Genomics* 15 (1): 737. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>.

Ozturk, Ahmet Rasiit, et Tolga Can. 2017. « A Multiplex Primer Design Algorithm for Target Amplification of Continuous Genomic Regions ». *BMC Bioinformatics* 18 (1): 306. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1716-7>.

P

Pallen, Mark J., Charles W. Penn, et Roy R. Chaudhuri. 2005. « Bacterial Flagellar Diversity in the Post-Genomic Era ». *Trends in Microbiology* 13 (4): 143-49. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.008>.

Pan, Sz-Yun, Yung-Luen Shih, Hsin-Hui Huang, Li-Hua Li, Yi-Tsung Lin, et Tsuey-Ching Yang. 2022. « The Involvement of PaclRA System of *Stenotrophomonas Maltophilia* in the Uptake of *Pseudomonas Aeruginosa* Pyochelin and Intraspecies Competition for Iron Acquisition ». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 55 (2): 273-81. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.03.001>.

Pang, Zheng, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, et Zhenyu Cheng. 2019. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies ». *Biotechnology Advances* 37 (1): 177-92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.

Parisi, Luca, Elisabetta Gini, Denisa Baci, Marco Tremolati, Matteo Fanuli, Barbara Bassani, Giampietro Farronato, Antonino Bruno, et Lorenzo Mortara. 2018. « Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? » *Journal of Immunology Research* 2018: 1-25. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>.

Park, Won Sun, Jeonghan Lee, Giyoun Na, SaeGwang Park, Su-Kil Seo, Jung Sik Choi, Won-Kyo Jung, et Il-Whan Choi. 2022. « Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammation Activation in *Pseudomonas Aeruginosa* LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF-KB Pathway ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1228. <https://doi.org/10.3390/ijms23031228>.

Pena, C., G. Cabot, S. Gomez-Zorrilla, L. Zamorano, A. Ocampo-Sosa, J. Murillas, B. Almirante, et al. 2015. « Influence of Virulence Genotype and Resistance Profile in the

Chapitre 5. Références bibliographiques

Mortality of *Pseudomonas Aeruginosa* Bloodstream Infections ». *Clinical Infectious Diseases* 60 (4): 539-48. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>.

R

Rabinovitch, Michel. 1995. « Professional and Non-Professional Phagocytes: An Introduction ». *Trends in Cell Biology* 5 (3): 85-87. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)88955-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)88955-2).

Rezzoagli, Chiara, Martina Archetti, Ingrid Mignot, Michael Baumgartner, et Rolf Kümmerli. 2020. « Combining Antibiotics with Antivirulence Compounds Can Have Synergistic Effects and Reverse Selection for Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par Hinrich Schulenburg. *PLOS Biology* 18 (8): e3000805. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000805>.

Rhee, Inmoo. 2016. « Diverse Macrophages Polarization in Tumor Microenvironment ». *Archives of Pharmacal Research* 39 (11): 1588-96. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0820-y>.

Rodriguez-Valera, Francisco, Ana-Belen Martin-Cuadrado, et Mario López-Pérez. 2016. « Flexible Genomic Islands as Drivers of Genome Evolution ». *Current Opinion in Microbiology* 31 (juin): 154-60. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.014>.

Rosales, Carlos, et Eileen Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity ». *BioMed Research International* 2017: 1-18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.

Ruytinx, Pieter, Paul Proost, Jo Van Damme, et Sofie Struyf. 2018. « Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions ». *Frontiers in Immunology* 9 (septembre): 1930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01930>.

Rybtke, Morten, Peter Østrup Jensen, Claus Henrik Nielsen, et Tim Tolker-Nielsen. 2020. « The Extracellular Polysaccharide Matrix of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms Is a Determinant of Polymorphonuclear Leukocyte Responses ». Édité par Manuela Raffatellu. *Infection and Immunity* 89 (1): e00631-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00631-20>.

S

Sampedro, Inmaculada, Rebecca E. Parales, Tino Krell, et Jane E. Hill. 2014. « *Pseudomonas* Chemotaxis ». *FEMS Microbiology Reviews*, octobre, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081>.

Sancheti, Ashwin, et Lu-Kwang Ju. 2019. « Eco-friendly Rhamnolipid Based Fungicides for Protection of Soybeans from *Phytophthora Sojae* ». *Pest Management Science* 75 (11): 3031-38. <https://doi.org/10.1002/ps.5418>.

Sarges, Edilene Do Socorro Nascimento Falcão, Yan Corrêa Rodrigues, Ismari Perini Furlaneto, Marcos Vinícios Hino De Melo, Giulia Leão Da Cunha Brabo, Kátia Cilene Machado Lopes, Ana Judith Pires Garcia Quaresma, Luana Lima, et Karla Valéria Batista Lima. 2020. « *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System Virulotypes and Their Association with Clinical Features of Cystic Fibrosis Patients ». *Infection and Drug Resistance* Volume 13 (octobre): 3771-81. <https://doi.org/10.2147/IDR.S273759>.

Sass, Gabriele, Laura C Miller Conrad, Terrence-Thang H Nguyen, et David A Stevens. 2020. « The *Pseudomonas Aeruginosa* Product Pyochelin Interferes with *Trypanosoma*

Chapitre 5. Références bibliographiques

Cruzi Infection and Multiplication *in Vitro* ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 114 (7): 492-98. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz136>.

Schneider, Tanja, Thomas Kruse, Reinhard Wimmer, Imke Wiedemann, Vera Sass, Ulrike Pag, Andrea Jansen, et al. 2010. « Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II ». *Science* 328 (5982): 1168-72. <https://doi.org/10.1126/science.1185723>.

Schultz, Marc J., Peter Speelman, Sebastiaan A.J. Zaat, C.Erik Hack, Sander J.H. Deventer, et Tom Poll. 2000. « The Effect of *Pseudomonas* Exotoxin A on Cytokine Production in Whole Blood Exposed to *Pseudomonas Aeruginosa* ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 29 (3): 227-32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01527.x>.

Shapiro, Haim, Aviv Lutaty, et Amiram Ariel. 2011. « Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism ». *The Scientific World JOURNAL* 11: 2509-29. <https://doi.org/10.1100/2011/397971>.

Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaili, Fatemeh Mardani, Bita Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, et Amirhossein Sahebkar. 2018. « Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6425-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.

Shaver, Ciara M., et Alan R. Hauser. 2004. « Relative Contributions of *Pseudomonas Aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung ». *Infection and Immunity* 72 (12): 6969-77. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004>.

Shrestha, Looniva, Hai-Ming Fan, Hui-Ren Tao, et Jian-Dong Huang. 2022. « Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches ». *Pathogens* 11 (3): 292. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030292>.

Soehnlein, Oliver, Ylva Kai-Larsen, Robert Frithiof, Ole E. Sorensen, Ellinor Kenne, Karin Scharffetter-Kochanek, Einar E. Eriksson, Heiko Herwald, Birgitta Agerberth, et Lennart Lindbom. 2008. « Neutrophil Primary Granule Proteins HBP and HNP1–3 Boost Bacterial Phagocytosis by Human and Murine Macrophages ». *Journal of Clinical Investigation* 118 (10): 3491-3502. <https://doi.org/10.1172/JCI35740>.

Sommer, Lea M., Helle K. Johansen, et Søren Molin. 2020. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* and Adaptation to Complex Dynamic Environments ». *Microbial Genomics* 6 (5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000370>.

Soufli, Imene, Ryma Toumi, Hayet Rafa, et Chafia Touil-Boukoffa. 2016. « Cytokines and Nitric Oxide in Immunopathogenesis of IBD and Potential Therapeutic Approaches ». In *New Insights into Inflammatory Bowel Disease*, édité par Samuel Huber. InTech. <https://doi.org/10.5772/65001>.

Sun, Jianjun, et Joseph T. Barbieri. 2003. « *Pseudomonas Aeruginosa* ExoT ADP-Ribosylates CT10 Regulator of Kinase (Crk) Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32794-800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304290200>.

T

Talà, Lorenzo, Adam Fineberg, Philipp Kukura, et Alexandre Persat. 2019. « *Pseudomonas Aeruginosa* Orchestrates Twitching Motility by Sequential Control of Type IV Pili

Chapitre 5. Références bibliographiques

Movements ». *Nature Microbiology* 4 (5): 774-80. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0378-9>.

Tang, Yi-Quan, Jun Yuan, George Ösapay, Klara Ösapay, Dat Tran, Christopher J. Miller, Andre J. Ouellette, et Michael E. Selsted. 1999. « A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins ». *Science* 286 (5439): 498-502. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.498>.

Taylor, Patrick K., Amy T.Y. Yeung, et Robert E.W. Hancock. 2014. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: Towards the Development of Novel Anti-Biofilm Therapies ». *Journal of Biotechnology* 191 (décembre): 121-30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>.

Tejero, Jesús, et Dennis Stuehr. 2013. « Tetrahydrobiopterin in Nitric Oxide Synthase ». *IUBMB Life* 65 (4): 358-65. <https://doi.org/10.1002/iub.1136>.

Tuon, Felipe Francisco, Leticia Ramos Dantas, Paula Hansen Suss, et Victoria Stadler Tasca Ribeiro. 2022. « Pathogenesis of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm: A Review ». *Pathogens* 11 (3): 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>.

U

Uhel, F., L. Zafrani, et Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française. 2019. « Nouvelles techniques de biologie moléculaire ». *Médecine Intensive Réanimation*. <https://doi.org/10.3166/rea-2019-0119>.

Umadevi, Sivaraman, Noyal M Joseph, Kandha Kumari, Joshy M Easow, Shailesh Kumar, Selvaraj Stephen, Sreenivasan Srirangaraj, et Sruthi Raj. 2011. « Detection of Extended Spectrum Beta Lactamases, Ampc Beta Lactamases and Metallobetalactamases in Clinical Isolates of Ceftazidime Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Brazilian Journal of Microbiology* 42 (4): 1284-88. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400006>.

V

Vallet, Isabelle, Stephen P. Diggle, Rachael E. Stacey, Miguel Cámara, Isabelle Ventre, Stephen Lory, Andrée Lazdunski, Paul Williams, et Alain Filloux. 2004. « Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa*: Fimbrial Cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT ». *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2880-90. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2880-2890.2004>.

Vourc'h, Mickael, Antoine Roquilly, Alexis Broquet, Gaele David, Philippe Hulin, Cedric Jacqueline, Jocelyne Caillon, Christelle Retiere, et Karim Asehnoune. 2017. « Exoenzyme T Plays a Pivotal Role in the IFN- γ Production after *Pseudomonas* Challenge in IL-12 Primed Natural Killer Cells ». *Frontiers in Immunology* 8 (octobre): 1283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01283>.

W

Wang, Fang, Linan Qiao, Xing Lv, Anna Trivett, Rui Yang, Joost J. Oppenheim, De Yang, et Ning Zhang. 2016. « Alarmin Human α Defensin HNP1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells by Triggering NF-KB and IRF1 Signaling Pathways ». *Cytokine* 83 (juillet): 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.015>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Wagener, Brant M., Naseem Anjum, Sarah C. Christiaans, Morgan E. Banks, Jordan C. Parker, Adam T. Threet, Rashidra R. Walker, et al. 2020. « Exoenzyme Y Contributes to End-Organ Dysfunction Caused by *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study ». *Toxins* 12 (6): 369. <https://doi.org/10.3390/toxins12060369>.

Wang, Tietao, Yihang Qi, Zhihan Wang, Jingru Zhao, Linxuan Ji, Jun Li, Zhao Cai, Liang Yang, Min Wu, et Haihua Liang. 2020. « Coordinated Regulation of Anthranilate Metabolism and Bacterial Virulence by the GntR Family Regulator MpaR in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Molecular Microbiology* 114 (5): 857-69. <https://doi.org/10.1111/mmi.14584>.

Wargo, Matthew J., Maegan J. Gross, Sathish Rajamani, Jenna L. Allard, Lennart K. A. Lundblad, Gilman B. Allen, Michael L. Vasil, Laurie W. Leclair, et Deborah A. Hogan. 2011. « Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (3): 345-54. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0374OC>.

Wculek, Stefanie K., Gillian Dunphy, Ignacio Heras-Murillo, Annalaura Mastrangelo, et David Sancho. 2022. « Metabolism of Tissue Macrophages in Homeostasis and Pathology ». *Cellular & Molecular Immunology* 19 (3): 384-408. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9>.

Webster, Shanice S., Calvin K. Lee, William C. Schmidt, Gerard C. L. Wong, et George A. O'Toole. 2021. « Interaction between the Type 4 Pili Machinery and a Diguanylate Cyclase Fine-Tune c-Di-GMP Levels during Early Biofilm Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (26): e2105566118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105566118>.

Welch, Hazel M. 2012. « The Polymerase Chain Reaction ». In *Metastasis Research Protocols*, édité par Miriam Dwek, Susan A. Brooks, et Udo Schumacher, 878:71-88. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_5.

Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, et Jeffrey W. Pollard. 2013. « Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease ». *Nature* 496 (7446): 445-55. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.

X

Xavier, Danilo E, Renata C Picão, Raquel Girardello, Lorena Cc Fehlberg, et Ana C Gales. 2010. « Efflux Pumps Expression and Its Association with Porin Down-Regulation and β -Lactamase Production among *Pseudomonas Aeruginosa* Causing Bloodstream Infections in Brazil ». *BMC Microbiology* 10 (1): 217. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-217>.

Xu, Dan, et Wuyuan Lu. 2020. « Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity ». *Frontiers in Immunology* 11 (mai): 764. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00764>.

Xue, Qingjie, Yingchun Yan, Ruihua Zhang, et Huabao Xiong. 2018. « Regulation of INOS on Immune Cells and Its Role in Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3805. <https://doi.org/10.3390/ijms19123805>.

Y

Yaeger, Luke N., Victoria E. Coles, Derek C. K. Chan, et Lori L. Burrows. 2021. « How to Kill *Pseudomonas* —Emerging Therapies for a Challenging Pathogen ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1496 (1): 59-81. <https://doi.org/10.1111/nyas.14596>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Yan, Simin, Thomas C. Resta, et Nikki L. Jernigan. 2020. « Vasoconstrictor Mechanisms in Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension: Role of Oxidant Signaling ». *Antioxidants* 9 (10): 999. <https://doi.org/10.3390/antiox9100999>.

Yang, Jungmin, Kang-Mu Lee, Sangjun Park, Yoeseop Cho, Eunju Lee, Jong-Hwan Park, Ok Sarah Shin, Junghyun Son, Sang Sun Yoon, et Je-Wook Yu. 2017. « Bacterial Secretant from *Pseudomonas aeruginosa* Dampens Inflammasome Activation in a Quorum Sensing-Dependent Manner ». *Frontiers in Immunology* 8 (mars). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00333>.

Yeterian, Emilie, Lois W. Martin, Iain L. Lamont, et Isabelle J. Schalk. 2009. « An Efflux Pump Is Required for Siderophore Recycling by *Pseudomonas Aeruginosa*: Siderophore Recycling by an Efflux Pump ». *Environmental Microbiology Reports* 2 (3): 412-18. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x>.

Yu, Hua, Xiaomei He, Wei Xie, Junzhi Xiong, Halei Sheng, Shaodong Guo, Chunji Huang, Di Zhang, et Kebin Zhang. 2014. « Elastase LasB of *Pseudomonas Aeruginosa* Promotes Biofilm Formation Partly through Rhamnolipid-Mediated Regulation ». *Canadian Journal of Microbiology* 60 (4): 227-35. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0667>.

Z

Zhao, Le, W. David Tolbert, Bryan Ericksen, Changyou Zhan, Xueji Wu, Weirong Yuan, Xu Li, Marzena Pazgier, et Wuyuan Lu. 2013. « Single, Double and Quadruple Alanine Substitutions at Oligomeric Interfaces Identify Hydrophobicity as the Key Determinant of Human Neutrophil Alpha Defensin HNP1 Function ». Édité par Giovanni Maga. *PLoS ONE* 8 (11): e78937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078937>.

ملخص

مقدمة: الزانفة الزنجارية (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا ممرضة مسؤولة عن العدوى الحادة أو المزمنة. تعد الخلايا البالعة في طليعة الدفاع المناعي الفطري الذي يقضي على هذا العامل الممرض بعدة آليات. يمكن أن تنتج هذه الخلية مواد مضادة للميكروبات لها تأثير مبيد للجراثيم. هذه المواد تسمى الببتيدات المضادة للميكروبات، مثل الديفينسين التي يتم ترميزها بواسطة الجين *DEFA1*.

الهدف: تصميم بادئات للجين *DEFA1* الذي يعبر عنه البلاعم لدراسة دوره
المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات محددة للجين *DEFA1*، استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية. ثم استخدام قاعدة بيانات www.Ensemble.org للبحث عن تسلسلات محددة من الجين *DEFA1* وتم استخدام أداة التفجير التمهيدي التي يوفرها NCIB لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج في *in silico* PCR.

النتائج: أتاح استخدام أداة التمهيدي التفجير الحصول على أساس خاص بجين *DEFA1*، وهو: F primer
CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC R primer CTGCTGAGACCAACTCTGG مع منتج محدد 353 bp (Tm F) التمهيدي
59.83 درجة مئوية، R التمهيدي: 60.04 درجة مئوية)، محتوى GC هو 60% لبادئ الحاسة و 60% للبادئ المضاد للمعنى وبطول 20 نيوكليوتيد للبادئين.

الاستنتاجات: تصميم زوج جيد من البادئات يساعد على النجاح في تقنية PCR، وبالتالي التضخيم الصحيح للجين *DEFA1* ودراسة دوره أثناء الالتهابات البكتيرية.

الكلمات الرئيسية: ص. الزنجارية، الخلايا البالعة، *DEFA1*، Primer-BLAST، التمهيدي.

Résumé

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie pathogène responsable d'infections aiguës ou chroniques. Le macrophage est une cellule de l'immunité innée qui permet d'éliminer ce pathogène par plusieurs mécanismes. Cette cellule peut produire des substances antimicrobiennes qui ont un effet bactéricide. Ces substances sont nommées peptides antimicrobiens, telles que les défensines qui sont codées par le gène *DEFA1*.

Objectif : Concevoir des amorces pour le gène *DEFA1* exprimé par le macrophage afin d'étudier son rôle au cours des infections à *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques pour le gène *DEFA1*, nous avons utilisé des outils de bioinformatique. La base de données www.ensemble.org a été utilisée pour rechercher des séquences spécifiques du gène *DEFA1* et l'outil de primer-blast fourni par NCIB a été utilisé pour concevoir des amorces. Les résultats ont été confirmés par *in silico* PCR.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *DEFA1* à savoir : F primer CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC, R primer CTGCTGAGACCAACTCTGG avec un produit spécifique de 353 pb, Tm (F primer 59,83°C, R primer : 60,04°C), la teneur en GC est de 60% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusions : Concevoir une bonne paire d'amorces aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène *DEFA1* et l'étude de son rôle au cours des infections bactériennes.

Mots clé : *P. aeruginosa*, macrophage, *DEFA1*, Primer-BLAST, amorces.

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) is a pathogenic bacterium responsible for acute or chronic infections. Macrophage is a cell of the innate immune which eliminates this pathogen through several mechanisms. This cell can produce antimicrobial substances that have a bactericidal effect. These substances are called antimicrobial peptides, such as the defensins which are encoded by the *DEFA1* gene.

Objective: to design primers for the *DEFA1* gene expressed by the macrophage in order to study its role during *P. aeruginosa* infection.

Material and methods: in order to design specific primers for the *DEFA1* gene, we used bioinformatics tools. the www.ensemble.org database was used to search for specific sequences of the *DEFA1* gene and the primer-blast tool provided by NCIB was used to design primers. the results were confirmed by *in silico* PCR.

Results: the use of the primer-blast tool provided a primer specific to the *DEFA1* gene: F primer CTTGTCTCCGAGCCTTCTCC, R primer CTGCTGAGACCAACTCTGG with a specific product of 353 bp, Tm (F primer 59.83°C, R primer: 60.04°C), the GC content is 60% for the sense primer and 60% for the antisense primer and a length of 20 nucleotides for the two primers.

Conclusions: designing a good pair of primers helps to succeed the PCR technique, and therefore the correct amplification of the *DEFA1* gene and the study of its role during bacterial infections.

Keywords: *P. aeruginosa*, Macrophage, *DEFA1*, Primer-BLAST, primers.