

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

**Belkhir Farihane**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

## Thème

**Conception des amorces pour le gène *LL-37* exprimé par le  
macrophage au cours de l'infection par *Pseudomonas  
aeruginosa***

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

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

Année universitaire 2022/2023

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

**Belkhir Farihane**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

## Thème

**Conception des amorces pour le gène *LL-37* exprimé par le  
macrophage au cours de l'infection par *Pseudomonas  
aeruginosa***

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

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

Année universitaire 2022/2023

## Résumé

**Introduction :** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif, pathogène, responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimés. Le macrophage est cellule de la première ligne de défense de l'immunité innée qui permet d'éliminer *P. aeruginosa* par plusieurs mécanismes. Il peut produire les peptides antimicrobiens, possédant une action bactéricide, comme les cathélicidine codées par le gène *LL-37*.

**Objectif :** Conception d'amorces du gène *LL-37* 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 du gène *LL-37*, on a utilisé plusieurs outils : la base de données « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) », pour trouver des séquences spécifiques du gène *LL-37* et un outil de primer-blast fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par *in silico* PCR.

**Résultats :** L'utilisation de l'outil Primer-BLAST du site « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) », a permis d'obtenir une amorce spécifique pour le gène *LL-37* à savoir : Forward primer GCACCCCTGGCTATGACAAT, Reverse primer GAGGGTATCTCTGCCACAGC, avec un produit spécifique de 677 Pb, une température de fusion : directe 60.11°C, inverse 59.89°C, une teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens. La longueur pour les deux amorces est de 20 nucléotides.

**Conclusion :** le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier le gène *LL-37* par PCR (Polymérase Chain Réaction) constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ce gène dans l'immunité anti infectieuse.

**Mots clés :** *P. aeruginosa*, macrophage, *LL-37*, amorces

## **ABSTRACT**

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative bacterium, pathogenic, responsible for serious infections in immunocompromised people. The macrophage is a cell of the first line defense innate immunity who eliminate *P. aeruginosa* by several mechanisms. It can produce anti-microbial peptides, having a bactericidal action, like cathelicidins encoded by the gene *LL-37*.

**Objective:** Design primers of the *LL-37* gene expressed by the macrophage in order to study his role during *P. aeruginosa* infections.

**Material and methods:** In order to design specific primers for the gene *LL-37*, we used several tools: the database « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) », to find specific sequences of the gene *LL-37* and the Primer-blast tool provided by the NCBI to design primers. The results are confirmed by *in silico* PCR.

**Results:** The use of the Primer-BLAST tool of the site « [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) », allowed to obtain a specific primer for the gene *LL-37*, namely: Forward primer GCACCCCTGGCTATGACAAT, Reverse primer GAGGGTATCTCTGCCACAGC, with a specific product of 677 Pb, a melting temperature: direct 60.11°C, reverse 59.89°C, a GC content is 55% for forward primer and 60% for reverse primer. The length for both primers is 20 nucleotides.

**Conclusion:** the choice of a good pair of primers to amplify the *LL-37* gene by PCR (Polymérase Chain Réaction) is an essential step in the success of this technique and in the study of the role of this gene in anti-infective immunity.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, macrophage, *LL-37*, primers.

**مقدمة:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا ممرضة سالبة الجرام مسؤولة عن العدوى الخطيرة في الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة. البلاعم هي خلية خط الدفاع الأول للمناعة الفطرية التي تقضي على *P. aeruginosa* بعدة آليات. يمكن أن تنتج البيبتيدات المضادة للميكروبات مع عمل مبيد للجراثيم ، مثل Cathelicidine المشفرة بواسطة الجين LL-37

**الهدف:** تصميم بادئات الجين LL-37 المعبر عنها بواسطة البلاعم لدراسة دورها خلال عدوى *P. aeruginosa*.

**المواد والطرق:** من أجل تصميم بادئات محددة للجين LL-37 ، تم استخدام العديد من الأدوات: قاعدة البيانات "www.ensemble.org" ، للعثور على تسلسلات محددة للجين LL-37 وأداة أولية NCBI. لتصميم البرايمر. تم تأكيد النتائج في silico PCR

**النتائج:** أتاح استخدام أداة Primer-BLAST من موقع "www.ncbi.nlm.nih.gov" الحصول على أساس محدد للجين LL-37 ، وهو: التمهيدي الأمامي GCACCCCTGGCTATGACAAT ، التمهيدي العكسي GAGGGTATCTCTGCCACAGC ، مع منتج معين من 677 Pb ، درجة حرارة انصهار: مباشرة 60.11 درجة مئوية ، عكس 59.89 درجة مئوية ، محتوى GC هو 55% لبادئ الحاسة و 60% للبرايم المضاد. الطول لكلا البادئين هو 20 نيوكليوتيد.

**الخلاصة:** إن اختيار زوج جيد من البادئات لتضخيم الجين LL-37 بواسطة PCR (Polymérase Chain Réaction) هو خطوة أساسية في نجاح هذه التقنية وفي دراسة دور هذا الجين في المناعة المضادة للعدوى.

**الكلمات المفتاحية:** *P. aeruginosa* ، macrophage ، LL-37 ، primers

## Avant-propos

Je remercie Allah, le tout puissant, qui m'a permis d'avoir le courage et la force afin de dépasser les difficultés pour accomplir ce travail.

Je serais heureuse de remercier le Pr Mourad ARIBI, Directeur du Laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM) à l'Université de Tlemcen.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Wafa NOUARI, Maitre de conférences classes B, université de Tlemcen qui m'a aidée à réaliser ce travail grâce à ses informations précieuses, sa compréhension et ses conseils.

Je tiens à remercier les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents, qui sont toujours à mes côtés. Mon grand-père Mohammad qui m'a soutenu et cru en moi jusqu'à la fin.*

*Mes chères sœurs, Siham, Rania, nada, et mon frère Khaled*

*A mes chers amis pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements.*

*Toute personne qui m'a aidé*

*Merci infiniment*

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Résumé en Arabe</b>	
<b>Avant-propos</b>	
<b>Table des Matières</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.1. Caractéristiques	2
1.1.2. Facteur de pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.1.2.1. Facteurs de virulence associés à la bactérie	2
1.1.2.1.1. Pili	2
1.1.2.1.2. Flagelle	3
1.1.2.1.3. Lipopolysacharide	3
1.1.2.1.4. Biofilm	4
1.1.2.2. Facteurs sécrétés	5
1.1.2.2.1. Exotoxine A	5
1.1.2.2.2. Pyoverdine	5
1.1.2.2.3. Pyocyanine	5
1.1.2.2.4. Phospholipase	6
1.1.2.2.5. Exoenzymes S, T, U et Y	6
1.1.2.2.6. Protéases	6
1.2.4. Epidémiologique	7
1.2.5. Résistance de <i>P. aeruginosa</i>	7
1.2. Macrophage	8
1.2.2. Origine	8
1.2.3. Morphologie	9
1.2.4. La polarisation des macrophages	9
1.2.5. Rôles dans les réponses innées	11
1.2.5.1. Production d'agents microbicides	11
1.2.5.1.1. Métabolites de l'oxygène	11
1.2.5.1.2. Monoxyde d'azote	11

1.2.5.1.3. Enzymes lysosomales	12
1.2.5.1.4. Métabolites de pyruvate et cycle de Krebs	12
1.2.6. Phagocytoses	12
1.2.7. Rôle du macrophage dans l'élimination de <i>P. aeruginosa</i>	13
1.3. Cathélicidines	13
1.3.1. Généralités	13
1.3.2. Classification	14
1.3.3. <i>Gène LL37</i>	15
1.3.4. Rôles du <i>LL-37</i>	15
1.4. PCR (Polymérase Chain Réaction)	16
1.4.1. Définition	16
1.4.2. Composants de la PCR	16
1.4.3. Les étapes de la PCR	16
1.4.4. Acteurs de la PCR	17
1.5. Problématique et objectifs	18
1.5.1. Problématique	18
1.5.2. Objectif	18
1.5.3. But	18
<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes</b>	19
2.2. Conception des amorces pour le <i>gène LL37</i>	19
2.2.1. Recherche de la séquence du <i>gène LL37</i>	19
2.2.2. Outil Primer-Blast	21
2.2.3. Confirmation des résultats : in silico PCR	24
<b>Chapitre 3. Résultats</b>	25
3.1. Résultats de la conception des amorces	25
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST	25
3.1.2. Résultats de la confirmation par in silico-PCR	26
<b>Chapitre 4. Conclusions et perspectives</b>	28
<b>Chapitre 5. Références bibliographie</b>	29

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure du LPS	3
Figure 1.2. Structure chimique du lipide A de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 1.3. Les étapes de la formation biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	5
Figure 1.4. Origine des macrophages	9
Figure 1.5. Marqueurs et sous populations de macrophages	10
Figure 1.6. Biosynthèse de NO	12
Figure 1.7. Structure des cathélicidines	14
Figure 1.8. Localisation du gène LL37 sur le chromosome 3 humain	15
Figure 1.9. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	17
Figure 2.1. La plateforme de base de données «Ensembl»	19
Figure 2.2. Résultats de la Recherche du gène <i>LL37</i>	19
Figure 2.3. Les caractéristiques du gène <i>LL37</i>	20
Figure 2.4. La séquence du gène <i>LL37</i> selon «Ensembl»	20
Figure 2.5. La séquence de l'exon 1 du gène <i>LL37</i>	21
Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI	21
Figure 2.7. L'outil Primer BLAST	22
Figure 2.8. L'outil Primer BLAST	22
Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters	23
Figure 2.10. Validation des résultats : <i>in silico</i> PCR	24
Figure 3.1. Les paires d'amorces	25
Figure 3.2. Primer pair 1	26
Figure 3.3. Résultats du Primer-BLAST	26
Figure 3.4. Résultats de la confirmation	27

## Liste des abréviations

### A

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNsb : acide désoxyribonucléique simple brin

ADPRT : ADP ribosyl transférase

AMPc : Adenosine 3', 5' monophosphate cyclique

AprA : Protéase alcaline

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : Adénine tri-phosphate

### C

C5a : facteur chimiotactique

C3b : Complément 3b

CAMP : Cathelicidin antimicrobial peptide

CCL2 : CC chemokine ligand

CD14 : cluster of differentiation 14

CPA : cellule présentatrice antigène

CrK : protéine adaptatrice

### D

dGTP : déoxyguanosine triphosphate

### E

EPS : exopolyssacharides

ExoY : exoenzymes Y

ExoT : exoenzymes T

ExoU : exoenzymes U

ExoS : exoenzymes S

## **G**

GAP : GTPase activating protein

## **H**

H<sub>2</sub>O : Monoxyde de dihydrogène

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

## **I**

IFN- $\gamma$  : interféron gamma

IGF : facteur de croissance insulin-like

IgG : immunoglobuline de type G

IL : interleukine

INOS : inductible nitric oxide synthase

## **L**

LPS : lipopolysaccharide

## **M**

M1 : macrophage classiquement activé

M2 : macrophage alternative activé

## **N**

NADPH : nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate

NCBI : National Center for Biotechnology information

NLR : NOD-like receptors

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NO : monoxyde d'azote

## **O**

OH : radical hydroxyle

OS : ostéoclastes

O2 : l'oxygène

O2- : seperoxyde

## **P**

PAM : peptide antimicrobiens

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PCN : pyocyanine

PCR : Polymérase chain Réaction

PLC : phospholipases C

PLCH : phospholipases hémolytique

PLCN : phospholipases nom hémolytique

PRR : Pattern recognition receptor

P2X7 : récepteur purinergique

## **S**

SNC : système nerveux central SNC

## **T**

Taq Pol : Taq Polymérase

TGF-B : Facteur de croissance transformateur B

Th1 : lymphocyte T helper de type 1

Th2 : lymphocyte T helper de type 2

TLR : Toll-like receptors

## **U**

USI : unités de soins intensifs

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est un pathogène opportuniste connu pour sa résistance aux agents antimicrobiens, à la réponse immunitaire et une adaptation rapide aux conditions environnementales changeantes (Wilson & Pandey, 2023). Cette bactérie cause des problèmes majeurs de santé chez les immunodéprimés avec une morbi-mortalité élevée.

Les macrophages, cellules immunitaires innées, constituent l'une des premières lignes de défense de l'immunité innée face aux infections (Khan et al., 2019). Les macrophages ont plusieurs processus qui permettent la destruction des pathogènes et l'élimination des infections. Parmi ces processus, on note la capacité de ces cellules à produire des médiateurs de l'inflammation et des chimiokines et des cytokines (Orecchioni et al., 2019), la phagocytose et la sécrétion de plusieurs type d'agents antimicrobiens comme les peptides antimicrobiens (Xu et al., 2017).

Parmi ces peptides, le LL-37 est l'unique membre connu de la famille des cathélicidines exprimés chez l'homme. Il s'agit d'une molécule multifonctionnelle de défense de l'hôte, nécessaire aux réponses immunitaires normales aux maladies infectieuses et aux lésions tissulaires. Il a également une activité efficace contre diverses souches bactériennes, notamment *P. aeruginosa* (Bucki et al., 2010). Ce peptide est codé par le gène *LL-37* localisé sur le chromosome 3 et composé de 4 exons dont l'étude de son expression permettrait d'offrir de nouvelles pistes de traitement des infections.

La réaction en chaîne de la polymérase (*PCR, polymerase chain reaction*) est une méthode d'amplification d'un brin d'ADN spécifique à partir d'un échantillon complexe. Cette technique nécessite une enzyme, l'ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire en ajoutant des nucléotides et en utilisant des amorces. La conception de bonnes amorces constitue une étape primordiale pour réussir cette technique.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail est de concevoir des amorces spécifiques au gène LL37 exprimé par le macrophage afin d'étudier son implication au cours des infections par *P. aeruginosa*.

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

### **Chapitre 1. Revue de la littérature**

#### **1.1. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnets qui se développe dans de nombreuses différentes niches environnementales, y compris le sol, l'eau, les plantes, les animaux, les insectes et les invertébrés (Didelot et al., 2016)(Sadikot et al., 2005).

L'organisation mondiale de la santé en 2017, a publié une liste de pathogènes prioritaires, présentant 12 familles bactériennes qui constituent une menace imminente pour la santé humaine en raison de leur résistance aux agents antimicrobiens. *P. aeruginosa* était parmi les trois principaux micro-organismes (Reig et al., 2022).

*P. aeruginosa* a un génome "plastique", qui a une taille moyenne qui varie entre 5,5 et 7 Mb. Cela se traduit par une capacité métabolique extrêmement flexible et une aptitude à la production de métabolites secondaires et de polymères en utilisant différentes substances carbonées. Cette plasticité métabolique permet au *P. aeruginosa* d'avoir une propriété opportuniste et d'infecter l'homme avec un système immunitaire compromis et qui a subi un traumatisme (Mielko et al., 2019).

*P. aeruginosa* possède plusieurs d'autres propriétés uniques, telles que la formation de biofilm, l'expression de plusieurs facteurs de virulence et sa multi-résistance aux antibiotiques (Oliver et al., 2015).

##### **1.1.1. Caractéristiques**

*P. aeruginosa* est un bacille à Gram-négatif, non sporulant, aérobic et non fermentant (Wilson & Pandey, 2023). Cette bactérie peut utiliser le nitrate comme un accepteur d'électrons. Sa température de croissance est comprise entre 30°C et 37°C (Schertzer et al., 2010). *P. aeruginosa* possède de nombreux plasmides et un seul chromosome circulaire. Son génome séquencé en 2000 chez la souche PAO1 a une taille de 6.3 Mbp (Kung et al., 2010).

##### **1.1.2. Facteur de pathogénicité de *P. aeruginosa***

###### **1.1.2.1. Facteurs de virulence associés à la bactérie**

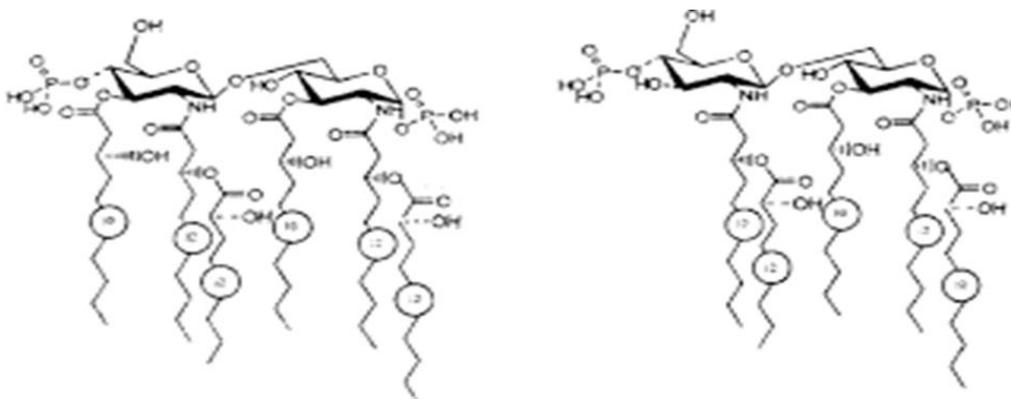
###### **1.1.2.1.1. Pili**

Les pili sont des longues structures filamenteuses situées sur les surfaces des bactéries à Gram négatif. Ils sont formés grâce à l'empilement de monomères de piline. PilA contient



## Chapitre 1. Revue de la littérature

Le LPS est présent à la surface des cellules bactériennes sous la forme d'un mélange hétérogène de structures apparentées. Une grande partie de cette hétérogénéité est due à des variations de la fraction A du lipide. Plusieurs études ont été réalisées pour caractériser les étapes de biosynthèse du lipide A chez *P. aeruginosa* (Figure 1.2). La squelette du lipide A de *P. aeruginosa* est constituée de diglucosamine doublement phosphorylé (phosphate 4-b-D-GlcNII-(1i6)-a-D-GlcNI-1 phosphate) (King et al., 2009).



**Figure 1.2. Structure chimique du lipide A de *P. aeruginosa*** (King et al., 2009).

### 1.1.2.1.4. Biofilm

La formation de biofilm par *P. aeruginosa* permet de rendre les antibiotiques inefficaces sur de nombreux environnements et de favoriser ainsi les infections chroniques. La formation du biofilm par *P. aeruginosa* se fait en cinq principales étapes (Figure 1.3) :

- (i) Le processus débute par l'adhésion réversible des bactéries planctoniques à une surface propice à leur croissance,
- (ii) Les bactéries sont ensuite attachées de manière irréversible, sous forme des microcolonies dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS),
- (iii) Les microcolonies bactériennes progressivement s'étendent leurs confluences et aboutissent à un phénotype structuré avec un espace sans colonisation,
- (iv) Ensuite, les espaces non colonisés sont remplis de bactéries qui recouvrent finalement toute la surface. Pendant ce temps, la croissance des communautés tridimensionnelles est observées,
- (v) Finalement, les bactéries se dispersent à partir de la structure sessile et rentrent à l'état planctonique pour se propager et coloniser d'autres surfaces (Rasamiravaka et al., 2015).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

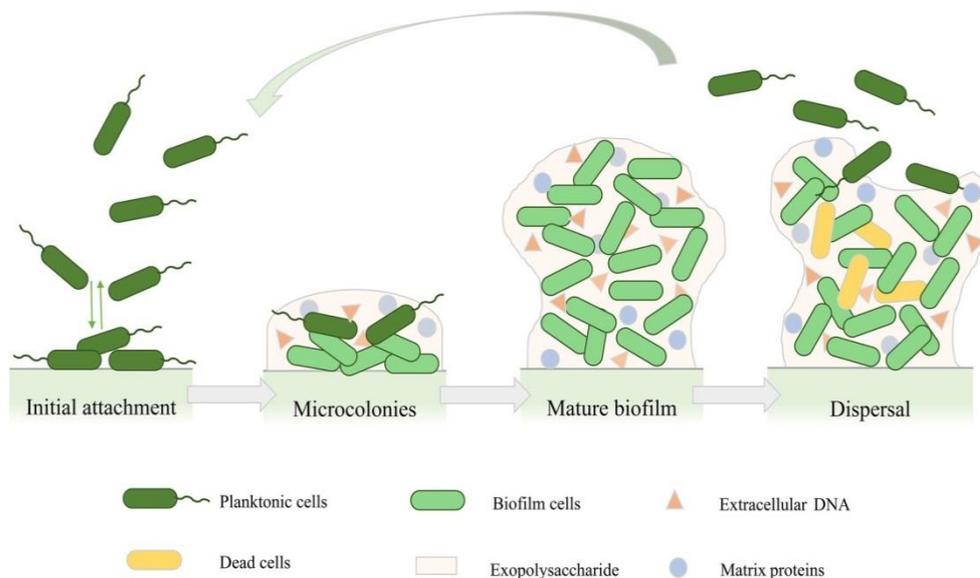


Figure.1.3. Les étapes de la formation biofilm de *P. aeruginosa* (Thi et al., 2020).

### 1.1.2.2. Facteurs sécrétés

#### 1.1.2.2.1. Exotoxine A

L'exotoxine A de *P. aeruginosa* est une molécule hautement spécifique et toxique (Wedekind et al., 2001). Cette protéine possède une activité enzymatique et appartient à la famille des mono-ADP-ribosyltransférases (Michalska & Wolf, 2015).

#### 1.1.2.2.2. Pyoverdine

*P. aeruginosa* produit un sidérophore important, la Pyoverdine, qui est important pour la virulence bactérienne et le développement de biofilms (Peek et al., 2012). Les chaînes peptidiques des pyoverdines contiennent entre 6 et 12 acides aminées (Cornelis & Dingemans, 2013).

#### 1.1.2.2.3. Pyocyanine

Un métabolite secondaire bleu redox-actif c'est La pyocyanine (PCN) fabriqué par *P. aeruginosa*. La PCN est récupéré en grandes quantités dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose et infectés par *P. aeruginosa* (Lau et al., 2004).

Il permet Une augmentation de la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) donc Il accroît le stress oxydant (Ortiz-Castro et al., 2014).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 1.1.2.2.4. Phospholipase

*P. aeruginosa* exprime une ou plusieurs phospholipases C (PLC) extracellulaires homologues, sécrétées à travers la membrane interne. Cette enzyme a une activité hémolytique (PlcN et PlcH) (Barker et al., 2004).

### 1.1.2.2.5. Exoenzymes S, T, U et Y

*P. aeruginosa* utilise un système de sécrétion spécialisé de type 3 qui libère des toxines directement dans le cytoplasme des cellules hôtes (Vance et al., 2005).

L'exoenzyme Y (ExoY) possède une activité adénylyl cyclase qui dépend de son association avec un cofacteur de la cellule hôte, et aboutit à l'augmentation de la concentration de l'AMPc (Adenosine 3', 5' monophosphate cyclique) (Morrow et al., 2016).

L'ExoU est une phospholipase hautement cytotoxique (Morrow et al., 2016). La protéine adaptatrice Crk assure la médiation de l'apoptose induite par l'ExoT. L'activité de l'ExoT /ADPRT, en ADP-ribosylant Crk, transforme cette protéine cellulaire inoffensive en une cytotoxine qui provoque une anoikis atypique en interférant avec la signalisation de survie médiée par l'intégrine (Wood et al., 2015).

L'ExoS et ExoT sont à 75% identiques au niveau des acides aminés. Elles possèdent une protéine activant la GTPase (GAP) et une activité ADP ribosyl transférase (ADPRT). De plus, elles ont affecté de manière similaire la voie Lim Kinase-cofiline, favorisant ainsi la séparation des filaments d'actine. L'activation de la cofiline a été également observée dans un modèle murin de pneumonie aigue induite par *P. aeruginosa* (Huber et al., 2014).

### 1.1.2.2.6. Protéases

*P. aeruginosa* peut produire deux principales protéases qui sont la protéase IV et la protéase alcaline. L'expression de la protéase IV au cours des infections oculaires contribue de manière significative aux dommages tissulaires. La protéase IV est une endoprotéase spécifique de la lysine et un facteur de virulence important pour la pathogenèse de *P. aeruginosa* dans l'œil et le poumon. La protéase IV mature dégrade d'importantes protéines immunologiques de l'hôte, telles que le complément et les IgG et elle compromet l'intégrité des protéines structurelles telles que l'élastine. Elle provoque également des lésions tissulaires, facilite l'infection bactérienne et dégrade les protéines de liaison au fer (la lactoferrine et la transferrine) (Conibear et al., 2012).

Protéase alcaline (AprA) permet d'inhiber l'opsonisation des bactéries par le C3b et la formation de l'agent chimiotactique C5a. Elle bloque également le dépôt de C3b par les

## Chapitre 1. Revue de la littérature

voies classiques et lectines, alors la voie alternative n'a pas été affectée. Les essais de dégradation du sérum ont révélé que L'AprA dégrade à la fois les protéines C1 et C2 humaines. Cependant, les essais de réplétion ont démontré que le mécanisme d'action de l'inhibition du complément est le clivage du C2. Enfin, l'AprA de *P. aeruginosa* interfère avec l'activation du complément par la voie classique et la voie des lectines *via* le clivage de C2 (Laarman et al., 2012).

### 1.2.4. Epidémiologique

*P. aeruginosa* cause des infections nosocomiales, représentant 11 à 13,8 % de toutes les infections lorsqu'un isolat microbiologique est identifiable. Dans les unités de soins intensifs (USI), *P. aeruginosa* est généralement responsable d'un pourcentage plus élevé, avec des taux de 13,2 à 22,6 % rapportés (Angeletti et al., 2018).

De nombreuses études ont identifié *P. aeruginosa* comme un pathogène important chez les brûlés. La surveillance microbiologique a montré qu'une fréquence de la colonisation des plaies par *P. aeruginosa* augmente de manière significative au cours de la première semaine d'hospitalisation. *P. aeruginosa* est souvent identifié comme l'isolat infectieux le plus fréquent dans les unités de soins représentant environ 9 % des infections urinaires dans l'ensemble de l'hôpital et jusqu'à 16,3 % des infections urinaires chez les patients des unités de soins intensifs. Cette bactérie est souvent responsable d'infections urinaires nosocomiales chez les patients porteurs de sondes urinaires. D'autre part, elle a été identifiée comme la cause la plus fréquente de bronchopneumonie bactérienne, représentant 16 cas sur 98. Lorsque les transplantés pulmonaires développent une bronchiolite oblitérante, *P. aeruginosa* devient une cause importante de pneumonie tardive (Driscoll et al., 2007).

### 1.2.5. Résistance de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est intrinsèquement résistante à de nombreux agents antibactériens, y compris de nombreuses  $\beta$ -lactamines, les macrolides, les tétracyclines, les Co-trimoxazoles, et la plupart des fluoroquinolones (Lee et al., 2010). Par contre, elle est sensible aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux uréido-pénicillines (pipéracilline), aux combinaisons B-lactamines /B-lactamases (pipéracilline /acide clavulanique), aux céphalosporines de quatrième génération et à certaines céphalosporines de troisième génération (céfépime), les aminosides (tobramycine), les monobactams (aztréonam), certaines fluoroquinolones (ciprofloxacine), les carbapénèmes (cilastatine, méropénème) et les polymyxines (colistine) (Bialvaei & Samadi Kafil, 2015).

Suite à une exposition antérieure aux antituberculeux, *P. aeruginosa* peut développer une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques. Le risque d'émergence d'une résistance à la

## Chapitre 1. Revue de la littérature

suite d'une exposition antibactérienne varie selon le médicament utilisé, mais il a été particulièrement associé à la ciprofloxacine et à l'imipénème (El Kary et al., 2016).

La résistance aux fluoroquinolones est due à un effet d'efflux actif et à des mutations dans les cibles de l'antibiotique (principalement l'ADN gyrase). De plus, la résistance aux carbapénèmes est principalement liée à une diminution de l'expression de l'OprDporine. Enfin, les pompes d'efflux et les B-lactamases jouent souvent des rôles secondaires importants, en particulier dans la médiation de la résistance au méropénem (Driscoll et al., 2007).

### 1.2. Macrophage

Le macrophage a été découvert pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Elie Metchnikoff en 1882. Il a été aussi le premier à décrire un processus d'ingestion des cellules par le macrophage, appelée phagocytose (Epelman et al., 2014). Le macrophage est cellule multifonctionnelle du système immunitaire innée qui joue un rôle important dans l'élimination des infections et l'homéostasie tissulaire (Verschoor et al., 2012).

#### 1.2.2. Origine

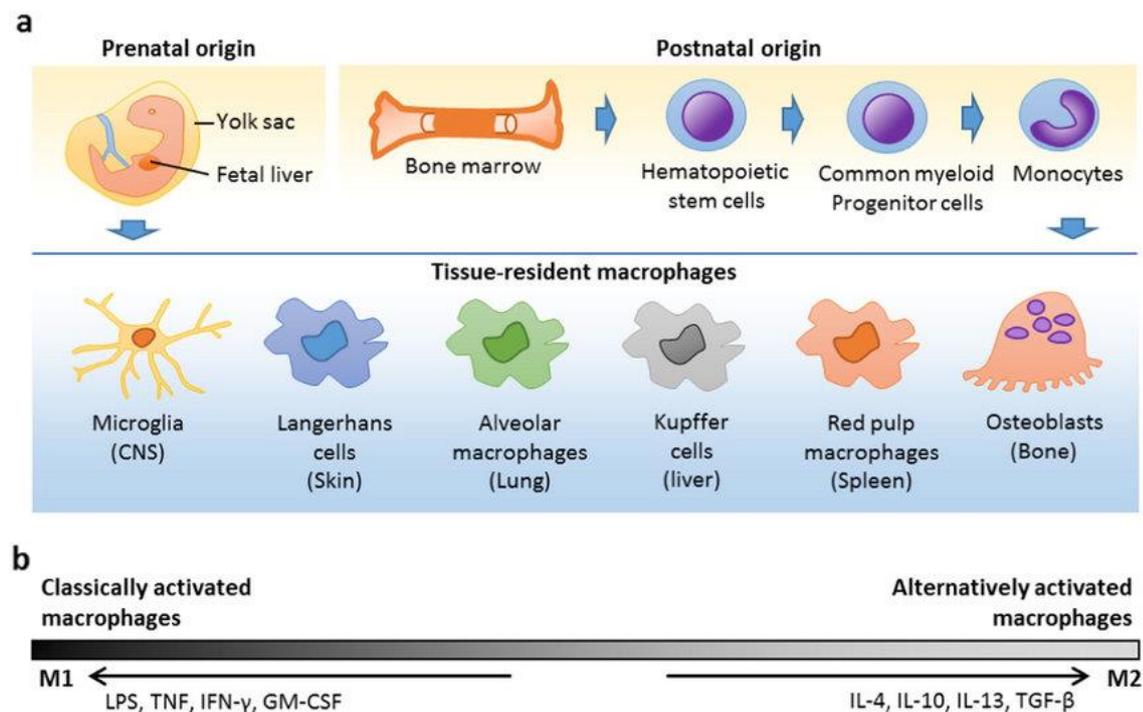
L'origine des macrophages tissulaires résidents sont en fait établis au cours du développement embryonnaire et persistent à l'âge adulte indépendamment de l'apport de monocytes sanguins à l'état d'équilibre (Epelman et al., 2014).

Trois sources principales peuvent être à l'origine des macrophages tissulaires : (i) Le sac vitellin qui se trouve dans l'embryon en tant que source de cellules progénitrices par hématopoïèse primitive, (ii) Le foie fœtal où l'hématopoïèse a lieu s'est déplacée du sac vitellin (Sreejit et al., 2020), le premier et le deuxième cas se produisent durant la période de développement de l'embryon (Wynn et al., 2013). Des capacités d'auto-renouvellement sont présentes dans ces macrophages (Orecchioni et al., 2019). Et enfin (iii) la moelle osseuse qui devient le centre hématopoïétique induit chez adultes et les embryons tardifs. Dans ce dernier, les monocytes dérivés de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse sont libérés dans la circulation sanguine et recrutés vers divers tissus du corps (Parisi et al., 2018).

Le terme macrophages englobe un groupe important et hétérogène de phagocytes résidants dans les tissus. Les macrophages au niveau du cerveau (système nerveux central (SNC)) sont appelées microglie, dans le foie : les cellules de Kupffer, dans la peau : les cellules de Langerhans, dans l'os : les ostéoclastes, dans les poumons : les macrophages alvéolaires et dans la rate et tissu conjonctif : les histiocytes (Gordon et al., 2014).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Les macrophages dérivés des monocytes contribuent principalement à la défense de l'hôte, alors que les macrophages résidents favorisent l'homéostasie tissulaire. Par ailleurs, il a été observé que les macrophages embryonnaires et adultes coexistent dans différents organes (Figure 1.4) (Nelson et al., 2020).



**Figure 1.4. Origine des macrophages** (Hettinger et al., 2013).

### 1.2.3. Morphologie

Les monocytes sont des cellules de 12 à 15  $\mu\text{m}$  tandis que les macrophages mesurent entre 25 et 50  $\mu\text{m}$ . Les deux types de cellules ont un noyau rond, ou avoir la forme d'un rein. Le cytoplasme des macrophages est riche en particules azurophiles et vacuoles de différentes tailles. Ce sont des cellules qui possèdent de nombreuses mitochondries et plusieurs lysosomes situés près de la membrane plasmique qui peuvent avoir une liaison avec les phagosomes. Le cytosquelette des macrophages composées de microtubules et de microfilaments d'actine est bien développé et permet son mouvement ainsi que la formation du pseudopodes lors de la phagocytose (Sivridis et al., 2002).

### 1.2.4. Polarisation des macrophages

## Chapitre 1. Revue de la littérature

La polarisation a été utilisée pour la première fois en 1986 par Mosmann pour décrire deux populations des lymphocytes T helper. Deux principales sous-populations lymphocytaires, sont classé selon l'environnement cytokinique en cellules T helper de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2) en fonction de stimulus rencontré (Mantovani et al., 2004).

Les macrophages sont une population de cellules très hétérogènes. En répondant à des stimuli externes, et sont polarisés vers le phénotype M1 et M2 (Figure 1.5) (Feito et al., 2019).

Les macrophages M1, ont été induits par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) et les composants bactériens comme le LPS. Ce qui signifie qu'ils répondent aux infections bactériennes à travers une régulation positive des gènes codants les chimiokines comme CCL2 et CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand) et les cytokines comme l'IL-6, l'IL-12, l'IL-1B. Ils peuvent aussi produisent de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'activation de iNOS (inductible nitric oxide synthase) (Ruytinx et al., 2018).

L'IL-4 et l'IL-13 induit les macrophages M2 par un une activation alternative. Ces macrophages produisent des chimiokines telles que CCL1, CCL13, CCL18, CCL22 et CCL24 et des niveaux élevés de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le facteur de croissance tumorale TGF-B (*transforming growth factor -B*) (Atri et al., 2018). Ce phénotype joue un rôle antiinflammatoire et est impliqué dans la réparation tissulaire et la cicatrisation.

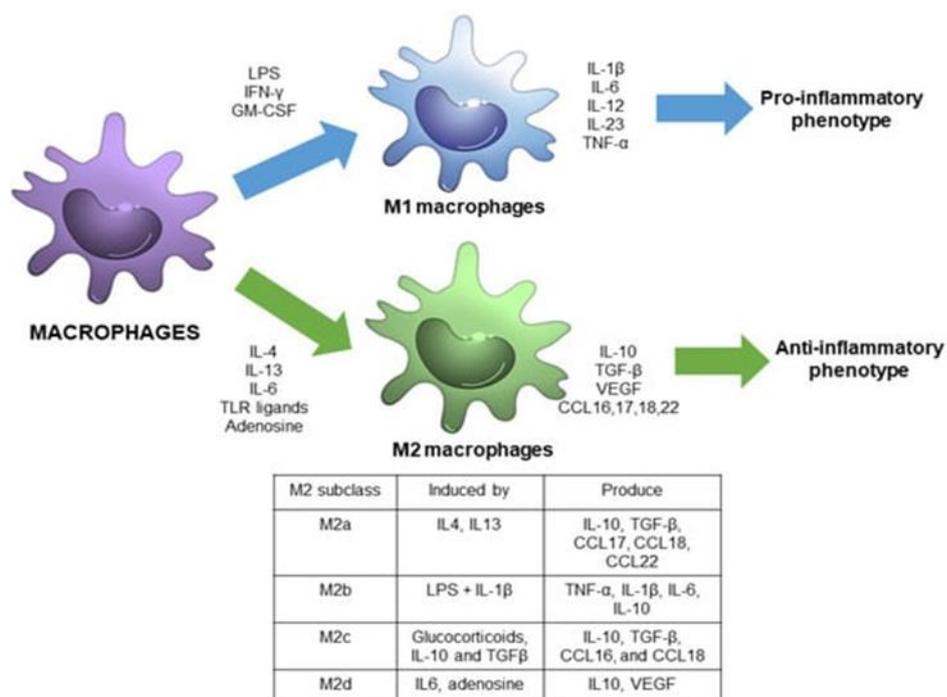


Figure 1.5. marqueurs et sous populations de macrophages (Pérez & Rius-Pérez, 2022).

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

Les macrophages M2 peuvent être divisés en trois sous classes : M2a, M2b et M2c. Les M2a sont stimulés par l'IL-4 et l'IL-13 et ils sécrètent des facteurs pro-fibrotiques tels que la fibronectine, le facteur de croissance insuline-like (IGF) et le facteur de croissance transformateur B (TGF- $\beta$ ). Les M2b sont activés par l'activation des complexes immunitaires et les M2c par l'IL10 (Yao et al., 2019).

### **1.2.5. Rôles dans les réponses innées**

#### **1.2.5.1. Production d'agents microbicides**

##### **1.2.5.1.1. Métabolites de l'oxygène**

la NADPH (nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate) oxydase produisent des métabolites de l'oxygène qui est impliquée dans la formation du seperoxyde ( $O_2^-$ ) (Chuong Nguyen et al., 2015).

Le radical hydroxyle (OH) et Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) des oxydants extrêmement puissants sécrétés dans les phagosomes et impliqués dans la dégradation des agents pathogènes. L' $H_2O_2$  permet également d'induire la production de NO en augmentant l'expression de l'iNOS par le LPS (Prolo et al., 2014).

##### **1.2.5.1.2. Monoxyde d'azote**

Oxyde nitrique ou, Le NO est une molécule de signalisation générée à partir de l'acide aminé l'arginine par l'enzyme iNOS exprimée par les macrophages (Soufli et al., 2016). L'iNOS, un médiateur clé des réponses immunitaires et de l'inflammation, synthétise le NO en deux étapes catalytiques. L'arginine est d'abord hydroxylée par l'oxygène ( $O_2$ ) et du NADPH en Nw-hydroxy-L-arginine, puis ce dernier est oxydé en L-citrulline,  $H_2O$  et NO (**Figure 1.6**) (Szulc-Kielbik et al., 2019). Il est responsable des réponses immunitaires antimicrobiennes et tumoricides et impliqué dans des fonctions de régulation et la protection cellulaire (Jaffrey & Snyder, 1995).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

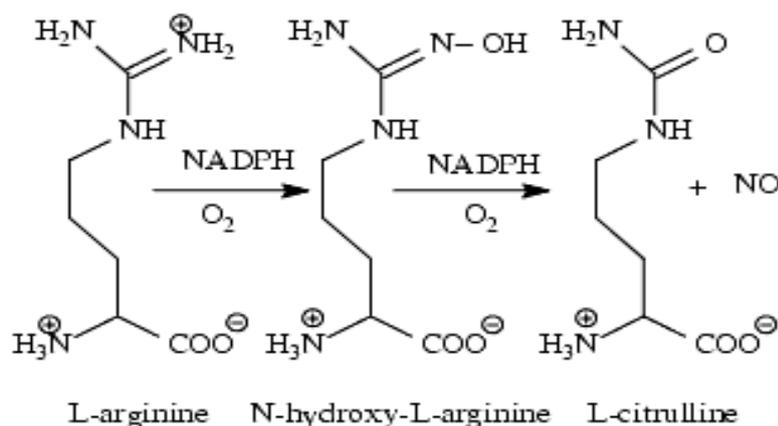


Figure 1.6. Biosynthèse de NO (Bosca et al., 2005).

### 1.2.5.1.3. Enzymes lysosomales

Au cours de la phagocytose, les macrophages produisent certaines enzymes qui digèrent les particules ingérées. Ces enzymes, contenues dans les lysosomes comprennent des hydrolases acides et des protéases neutres (Lackman et al., 2007). Les macrophages sécrètent également des peptides tels que les cathélicidines, et régulent les réponses immunitaires adaptatives en augmentant la production d'anticorps de type IgG exercent une activité antibactérienne directe (Hakala et al., 2003).

### 1.2.5.1.4. Métabolites de pyruvate et cycle de Krebs

L'activation des macrophages par le LPS entraîne une augmentation de la production de lactate et une production accrue de produits intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, le malate ou le citrate. Le pyruvate formé lors de la glycolyse est dicarboxylé en acétyl coA par le pyruvate déshydrogénase, qui constitue le point de départ de cycle de Krebs. Le cycle de Krebs produit directement une seule molécule d'ATP (Diskin & Pålsson-McDermott, 2018).

### 1.2.6. Phagocytoses

Les macrophages pour éliminer les microbes, les cellules sénescents et tumorales et les débris par un mécanisme appelé phagocytose. Il s'agit d'un mécanisme essentiel pour l'homéostasie tissulaire et les défenses anti-infectieuses. Ce processus débute par la reconnaissance la liaison du récepteur de surface du phagocyte à un antigène (Hirayama et al., 2017). Les macrophages expriment un nombre restreint de récepteurs phagocytaires, PRR (Pattern recognition receptor) qui reconnaissent des motifs conservés sur les agents pathogènes appelés PRR (Moretti & Blander, 2014).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Le processus de phagocytose se déroule en 4 étapes (Martinet et al., 2009). D'abord, Le macrophage, grâce à ces récepteur PRR, reconnaît les PAMPs de la bactérie et y adhère. Ensuite, des extensions de la membrane cytoplasmique forment des pseudopodes et entoure la bactérie. Une fois la bactérie est à l'intérieur d'un phagosome, les macrophages sécrètent les enzymes digestives qui permettent la digestion de la bactérie. Et enfin, les résidus issus de la digestion de la bactérie sont rejetés à l'extérieur de la cellule par exocytose (Maxfield et al., 2020).

### 1.2.8. Rôle du macrophage dans l'élimination de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* peut induire une réponse autophagique chez les macrophages. En plus de l'induction de cytokines inflammatoires et de l'autophagie, l'infection conduit également à l'assemblage d'un complexe intracellulaire appelé inflammasome, qui est un grand complexe composé de plusieurs molécules, dont un certain type de récepteurs de type NLR (*NOD like Receptors*) appartenant à l'une ou l'autre des familles NLR (par exemple, NLRP1, NLRP3 ou IPAF). L'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) a été activé lors d'une infection à *P. aeruginosa*. Plus important encore, sa disparition a réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ /IL-18 et a diminué l'autophagie, ce qui a altéré l'élimination de *P. aeruginosa* dans les macrophages. Dans l'ensemble, l'inflammasome NLRP3 peut jouer un rôle important dans la modulation de l'autophagie et de la clairance bactérienne dans les macrophages, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre la relation hôte-pathogène au cours de l'infection (Deng et al., 2016).

Processus apoptotique *P. aeruginosa*. Nos résultats montrent que face à ce pathogène, les macrophages répondent par une réponse pro-inflammatoire et une action microbicide pour détruire l'agent infectieux. Cependant, dans le même temps, l'augmentation d'une réponse pro-inflammatoire suite au traitement bactérien favorise la clairance des cellules apoptotiques par ces macrophages et contribue à la résolution de l'inflammation locale (Jäger et al., 2021).

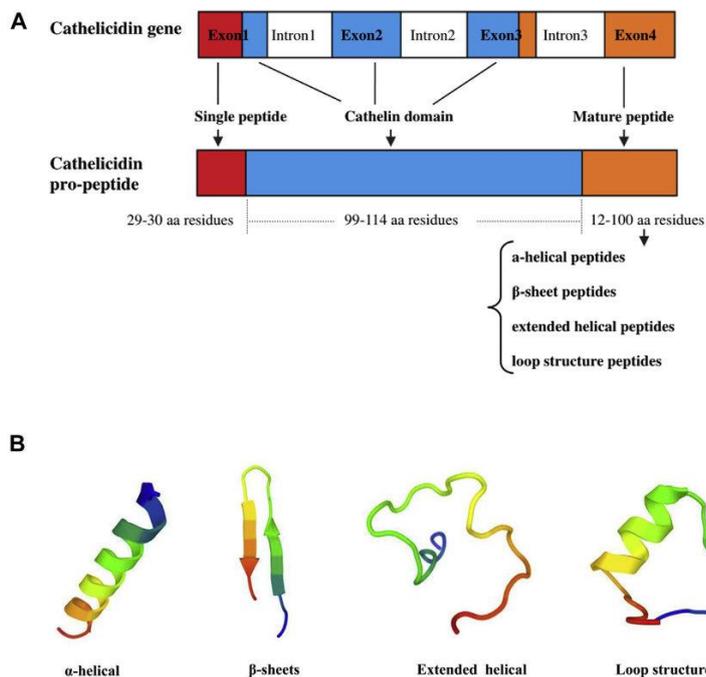
## 1.3. Cathélicidines

### 1.3.1. Généralités

Il existe chez l'homme deux catégories principales de peptide antimicrobiens (PAM) de l'hôte, les défensines et les cathélicidines. Les cathélicidines sont une famille des PAM cationiques qui jouent un rôle dans l'inflammation et la réparation des tissus, affectent la composition du microbiote intestinal et présentent des propriétés protectrices contre la colite induite chez la souris (Ridyard & Overhage, 2021). Les cathélicidines se caractérisent par un domaine N-terminal hautement de type cathéline conservé composé d'environ 100 résidus

## Chapitre 1. Revue de la littérature

d'acides aminés et d'une zone peptidique antimicrobienne à son extrémité C-terminale (**Figure 1.7**) (Dürr et al., 2006).



**Figure 1.7. Structure des cathélicidines** (Dürr et al., 2006). (A) présentation schématique du gène de la cathélicidine et du pro-peptide. De plus, des couleurs équivalentes aux régions pro-peptidiques montrent que l'exon code pour cette région est spécifique. (B) présentation de diagramme pour la structure secondaire de la cathélicidine, y compris la feuille b, l'hélice  $\alpha$ , l'hélice étendue et la structure en boucle.

Chez l'homme, le seul peptide découvert de cette famille est *LL-37*. C'est un peptide cationique codé par le gène *CAMP*, est produit par de nombreux types de cellules, telles que les cellules épithéliales de surface et glandulaires, des cellules lymphocytaires, des cellules neutrophiles et des cellules macrophages résidant dans les voies respiratoires (Bals & Wilson, 2003). *Le LL37* est également connu par sa possibilité de l'utiliser en tant qu'alternative aux antibiotiques pour les infections bactériennes. Il peut modifier et stimuler les réponses immunitaires en permettant le recrutement de cellules immunitaires et en stimulent la réponse inflammatoire (Ahmed et al., 2019). De plus, il a été montré que ce peptide peut éliminer plusieurs infections virales par des virus sensibles, enveloppés et non enveloppés (Bals & Wilson, 2003). Il possède une activité étendue contre les bactéries à Gram négatives, à Gram positives, ainsi contre les champignons (Ridyard & Overhage, 2021).

### 1.3.2. Classification

Selon les séquences d'acides aminés, les cathélicidines matures peuvent être classées en trois groupes :

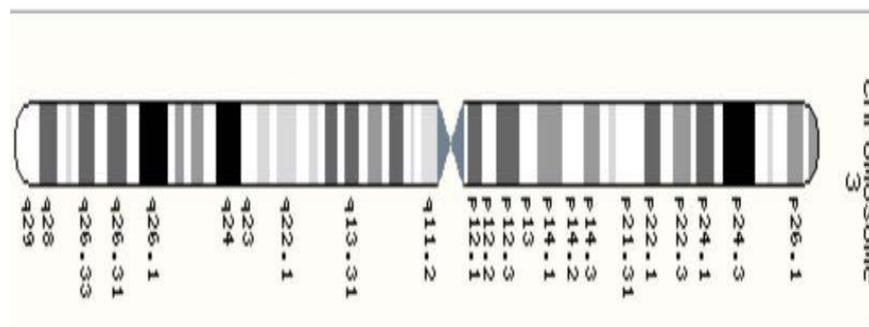
- Groupe I - peptides linéaires,  $\alpha$ -hélicoïdaux, par exemple LL-37/hCAP-18 de l'homme.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

- Groupe II - peptides avec un nombre pair de cystéines reliées par des ponts disulfures, par exemple les protéines peptides de la cathélicidine porcine.
- Groupe III - peptides présentant une proportion anormalement élevée d'une ou de deux cystéines, par exemple PR-39 provenant de leucocytes porcins (Bals & Wilson, 2003).

### 1.3.3. Gène LL37.

Les auteurs ont utilisé la technique de l'hybridation fluorescente *in situ* et l'ADN hybride appliqué à des cellules somatiques de hamsters. Au cours de cette période, le gène situé sur le chromosome 3 est organisé en 4 exons (D'après NCBI), à un emplacement de 3q21.31. (**Figure 1.8**) (Moreno-Angarita et al., 2020). Ce gène est un peptide c-terminal libéré à partir de la protéine cathélicidine humaine de 18 kDa (Nagaoka et al., 2006).



**Figure 1.8. Localisation du gène LL37 sur le chromosome 3 humain (D'après NCBI).**

### 1.3.4. Rôles du LL-37

Le peptide LL-37 a un rôle essentiel dans la réponse précoce de l'hôte face aux pathogènes, grâce à son activité antibactérienne à large spectre (Kusaka et al., 2017). Il s'agit d'une molécule multifonctionnelle de défense de l'hôte est un puissant tueur de divers micro-organismes. Il a la capacité de prévenir les effets immunostimulants des molécules de la paroi bactérienne notamment le LPS et peut donc protéger contre l'endotoxémie létale (Bucki et al., 2010). Le LL-37 élimine la pyroptose provoquée par le LPS/ATP chez les macrophages en neutralisant les actions du LPS sur CD14/TLR4 et en empêchant la réponse P2X7 (purinergic récepteur) à l'ATP *in vitro* (Hu et al., 2016).

Le LL-37 présente une activité puissante contre différentes bactéries, y compris *P. aeruginosa*. Il peut inhiber la production de biofilms de la bactérie *P. aeruginosa* en diminuant la fixation des cellules bactériennes (Bucki et al., 2010).

Le LL-37 peut également stimuler la production de chimiokines, en particulier l'IL-8 par les cellules myéloïdes et épithéliales. Il augmente le niveau d'ARNm (acide ribonucléique

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

messenger) de TLR4 et de la protéine TLR4 et induit la libération d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-1b par les mastocytes au niveau de la peau (Bucki et al., 2010).

### **1.4. PCR (Polymérase Chain Réaction)**

#### **1.4.1. Définition**

La technique PCR (Polymérase chain Réaction) a été inventée dans les années 1980 par Kary Mullis, qui a obtenu le prix Nobel en 1994 (Valones et al., 2009). La PCR peut être pratiquée à l'aide d'ADN (acide désoxyribonucléique) source d'une variété de tissus et d'organismes y compris le sang périphérique, la peau, les cheveux, la salive et les microbes (Garibyan & Avashia, 2013). Une méthode excellente permet de détecter les agents pathogènes plus rapidement, surtout ceux difficiles à cultiver (Staněk, 2013).

#### **1.4.2. Composants de la PCR**

La méthode PCR est basée sur :

- L'ADN matrice est la séquence cible à amplifier et sa longueur varie de 100 à 1000 paires de bases ;
- La Taq Polymérase (Taq Pol) est utilisée pour lier les différents nucléotides : dGTP, dATP, dCTP pour la synthèse du brin complémentaire.
- Paires d'amorces comprenant des amorces sens et anti-sens, d'une longueur de 16 à 20 paires de bases (Maheaswari et al., 2016).

#### **1.4.3. Les étapes de la PCR**

La PCR est une technique qui consiste à répéter des cycles de 3 étapes consécutives qui nécessitent des conditions de températures distinctes (Ishmael & Stellato, 2008).

Les thermocycleurs PCR chauffent et rafraîchissent, rapidement, le mélange de réaction, permettant la dénaturation induite (la séparation de l'ADN doubles brins en deux brins). Une réaction typique commence par une dénaturation d'une minute à 94 °C (Lorenz, 2012).

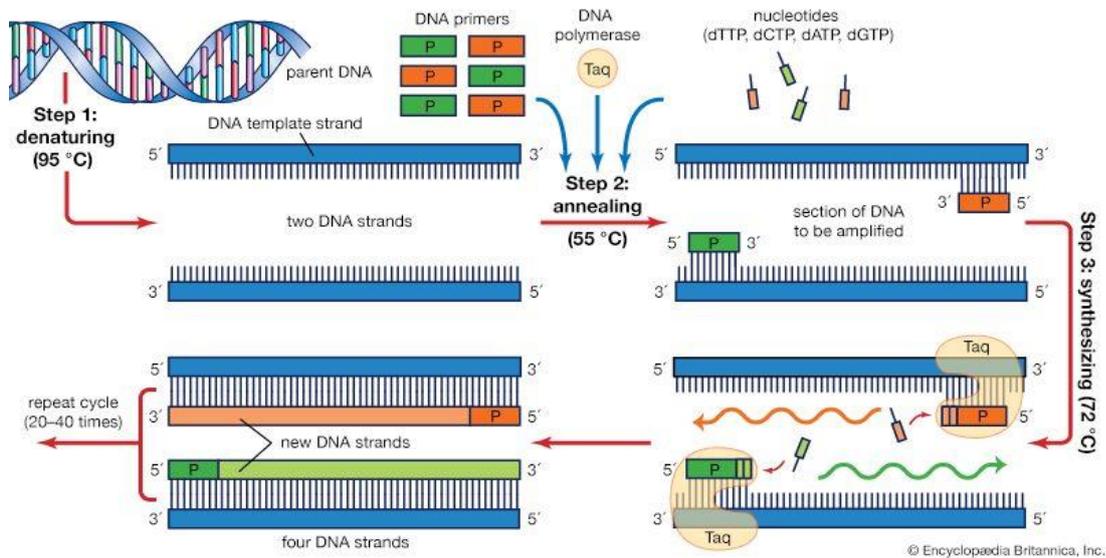
un recuit primaire à une température comprise entre 50 et 58 °C, quand la paire d'amorces est mélangée à l'ADN cible dénaturé, l'amorce directe s'hybride à un site particulier à une extrémité opposée de l'autre brin cible, et l'amorce inverse s'hybride à un site particulier à l'extrémité opposée de l'autre brin cible complémentaire (Valones et al., 2009) .

Prolongation de la séquence d'ADN amorcée : l'enzyme ADN polymérase permet de synthétiser de nouveaux brins complémentaires en prolongeant les amorces jusqu'à 72. La

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Taq Pol est généralement utilisée en raison de sa capacité à fonctionner efficacement à des températures élevées (**Figure 1.9**) (Lorenz, 2012).

En cas d'échec de la PCR, il peut en résulter de nombreux produits d'ADN non spécifiques de taille différente qui apparaissent sous la forme d'une échelle ou d'un étalement de bandes sur les gels d'agarose (Wittmeier & Hummel, 2022).



**Figure 1.9. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)** (Ishmael & Stellato, 2008). Un cycle de PCR se déroule en trois étapes : Dans la première étape, à 95°C, les deux brins d'ADN sont dénaturés et séparés. Dans la deuxième étape à 50° à 60°C, les deux amorces sens et anti sens s'hybrident à leurs séquences d'ADN complémentaires. Dans la troisième étape, à 72°C, la polymérase Taq réalise une réaction de polymérisation afin de générer un nouveau brin complémentaire d'ADN. Ces 3 étapes se répètent 20 à 40 fois afin d'amplifier le gène d'intérêt.

### 1.4.4. Acteurs de la PCR

Chaque test PCR requiert la présence d'ADN matrice, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase. Les nucléotides incluent les quatre bases : adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G) qui se situent dans l'ADN. Ces bases sont les éléments constitutifs de l'ADN. L'ADN polymérase est l'enzyme principale qui relie les nucléotides individuels pour former le produit de la PCR. Les amorces de la réaction spécifient le produit d'ADN exact à amplifier. Les amorces sont de courts fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire à l'ADN cible qui doit être détecté et amplifié. Elles servent de point d'extension à l'ADN polymérase (Garibyan & Avashia, 2013).

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

### **1.5. Problématique et objectifs**

#### **1.5.1. Problématique**

Les macrophages sont des cellules mononuclées phagocytées et un composant clé du système immunitaire. Ils représentent la première ligne de défense face aux agents pathogènes et sont aussi impliqués dans l'élimination des infections bactériennes. Ces cellules sécrètent plusieurs cytokines impliquées dans l'induction de la réaction inflammatoire et également des substances antimicrobiennes, nommés peptides antimicrobiens qui participent dans l'élimination des pathogènes. Parmi ces peptides, les cathélicidines sont des antibiotiques à large spectre qui permettent de tuer les bactéries et présenter des nouveaux agents thérapeutiques. L'étude de leur expression au niveau des macrophages en cas d'infection par *P. aeruginosa* semblerai être importante.

#### **1.5.2. Objectif**

L'objectif de ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *LL37* exprimé par les macrophages au cours de l'infection.

#### **1.5.3. But**

Le but est d'étudier l'implication du gène *LL37* dans l'immunité anti-infectieuse.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### Chapitre 2. Matériel et méthodes

#### 2.2. Conception des amorces pour le gène *LL37*

##### 2.2.1. Recherche de la séquence du gène *LL37*

La Conception des amorces encadrant le gène *LL37* débute par la recherche de la séquence de référence du gène *LL37*, au sein d'une base de données de génomes. Dans notre travail, on a utilisé la base de données « Ensembl » à partir du site ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (Figure 2.1, 2.2, 2.3, 2.4).

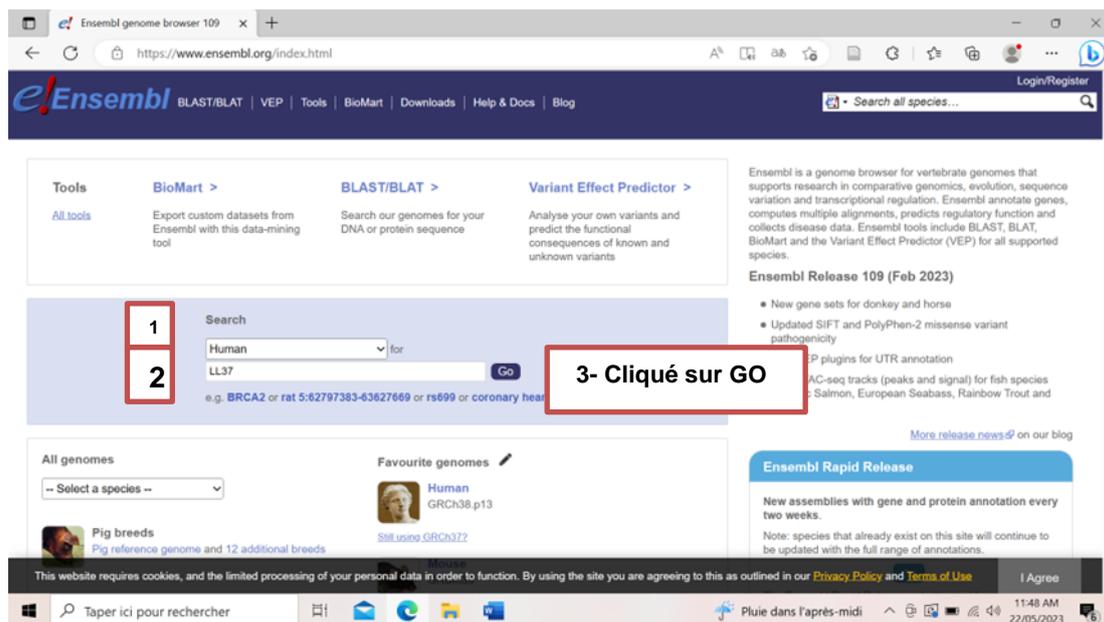


Figure 2.1. La plateforme de base de données Ensembl. (1) Choisir l'espèce humaine et (2) entré le nom du gène *LL37*, puis (3) appuyé sur le bouton GO pour obtenir les réponses.

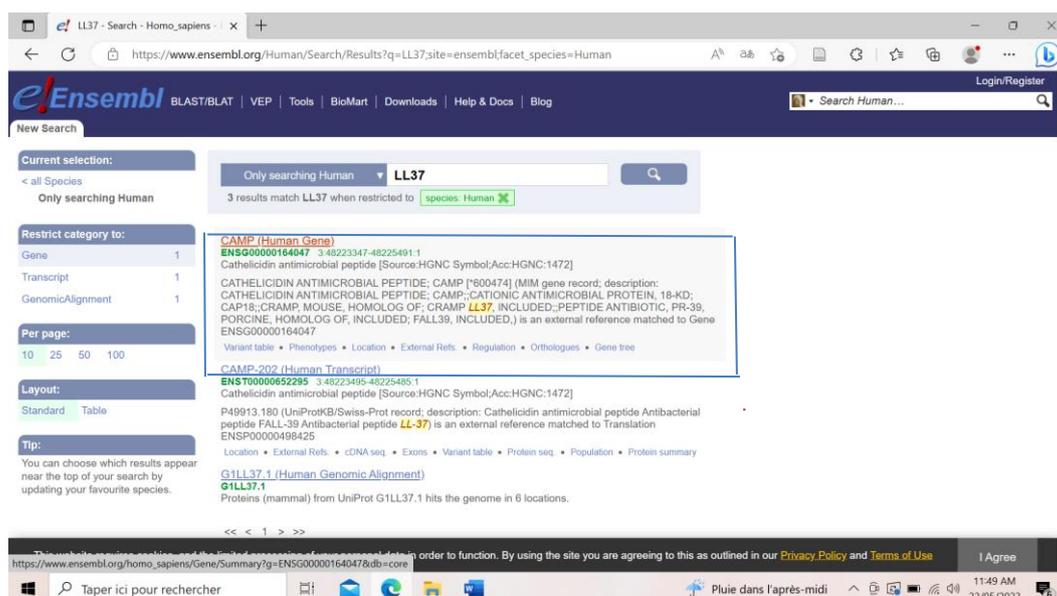


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *LL37*. Cliquez sur le premier résultat de la recherche en vérifiant le gène et qu'il correspond à l'espèce humaine.



## Chapitre 2. Matériel et méthodes

```
TAGGCGTGAGCCACCGTGCCCTGCCTCATTCAATCAATTCTTAATCGATGCCCTACAGGGTGCCAGGCAATGCCTAGAGC  
TGGAGATTTAGCATCCATCATACTGACTCCTGAGGAGTAGAAGGATGTAGAATAGGCACCTGGCTCTCTTCCTCTCT  
GGAGGGATTTAACGCTCTTGAGCACCCCTGGCTATGACAATCTCCGGTCAGGTCTGGGAGGTTGTCAGAGATGAAGAA  
ACCACTTCCTCATCTTGACACAAGGAAGGCTCACTCACTGCCAGCAA GTCTGTGAAGCAATAGCCAGGGGCTAA  
AGCAAACCCAGCCACACCCTGGCAGGCAGCAGGGATGGGTGGATCAGGAAGGCTCCTGGTTGGGCTTTTGCATCA  
GGCTCAGGCTGGGCATAAAGGAGGCTCCTGTGGCTAGAGGGAGGCAGACATGGGACCATGAAGACCCAAAGGGATG  
GCCACTCCCTGGGCGGTGGTCACTGGTGCTCCTGCTGCTGGCCTGGTGATGCTCTGGCCATCATTGCCAGGTCC  
TCAGCTACAAGGAAGCTGTGCTTCGTGCTATAGATGGCATCAACCAGCGTCTCGGATGCTAACCTTACCGCTCC  
TGGACCTGGACCCAGGCCACGATGGTGAGCTTTGGGGGACATTCTGCTCTGCTCTGGCTGGGCTTGGCCACGTGTT  
GTTCTTCTGCTCCTGCTGCACTGCCTGCCAGGAGGGCATCTCCCCCTTTAAATGTGGTC CCGTGTGTTTCCAGGGAAC  
CTTCTAGAGCTCGTGTCTCCTCCAGCTCGAGAGCTTCTGCTTATAATTCCTGCTGTGGCAGAGATACCTCACCC  
CGACCCACGCAGGTTTTGGGACTTCTGCGAGCTCCAGGCACTAGAATGGGGTCAATTGGCTCTGGGCAGTGACCTCT  
CTGCTTTAAGTC
```

Figure 2.5. La séquence de l'exon 1 du gène *LL37*.

### 2.2.2. Outil Primer-Blast

Les étapes de conception des amorces du gène *LL37* à partir de l'outil primer blast sont présentées dans les figures ci-dessous (Figure 2.6, 2.7 et 2.8). Cet outil se trouve dans la base de données (National Center for Biotechnology Information NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

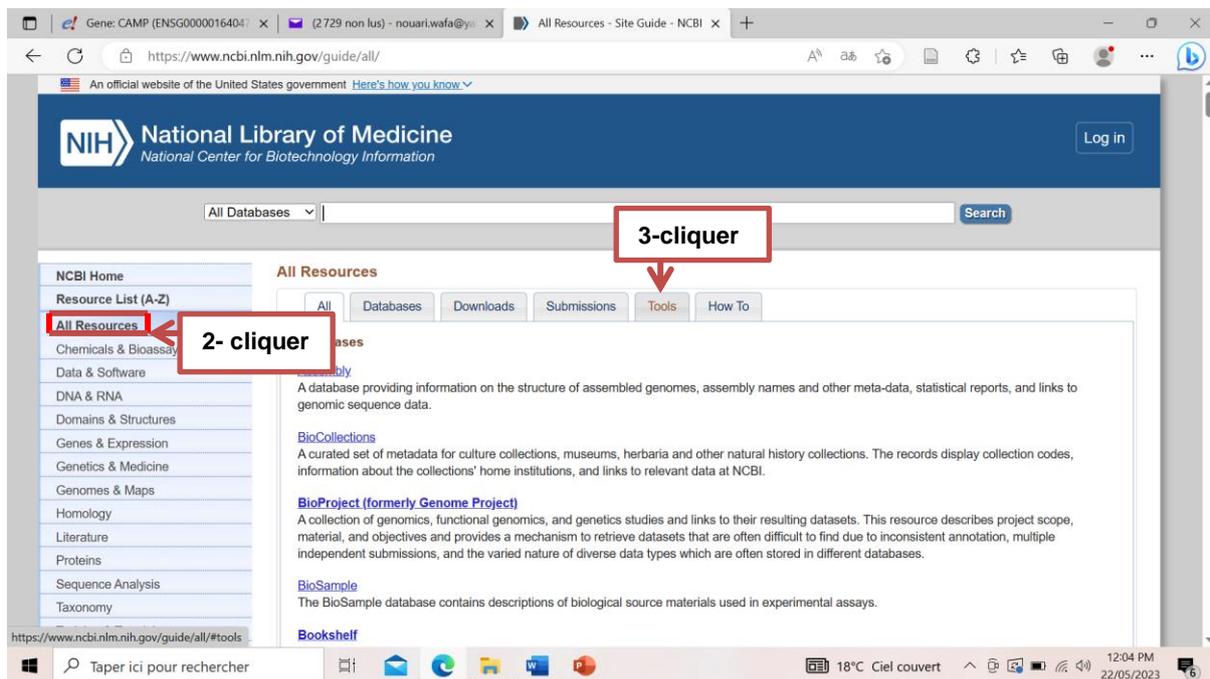
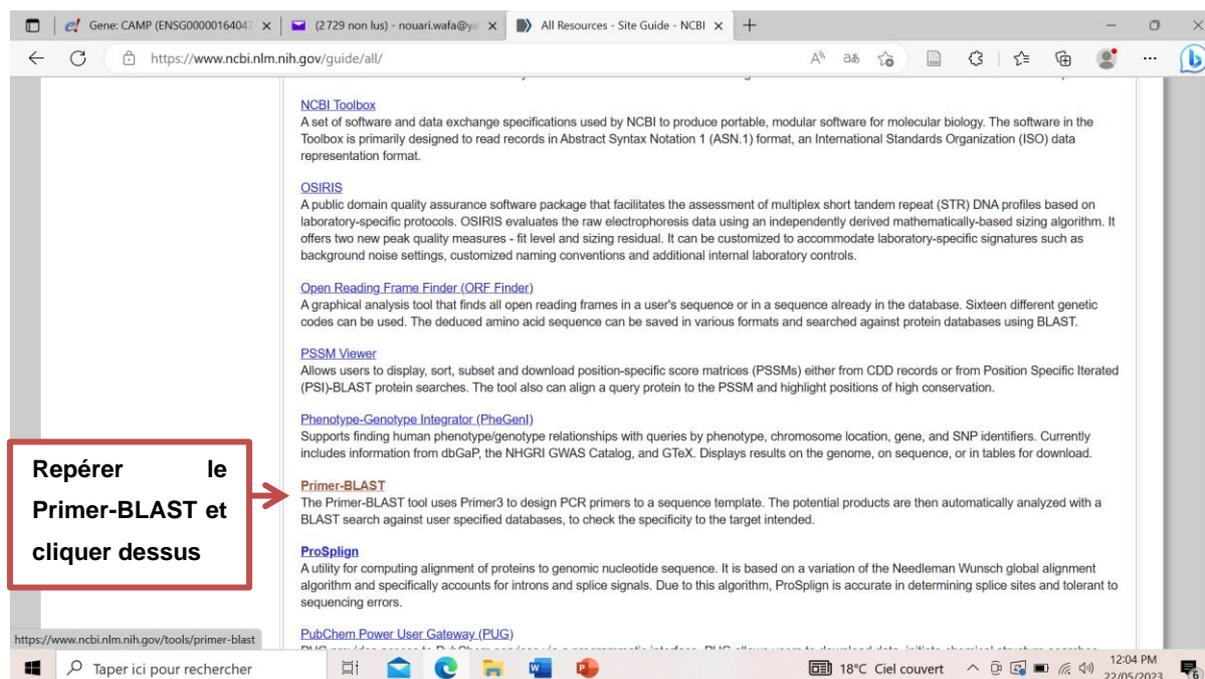
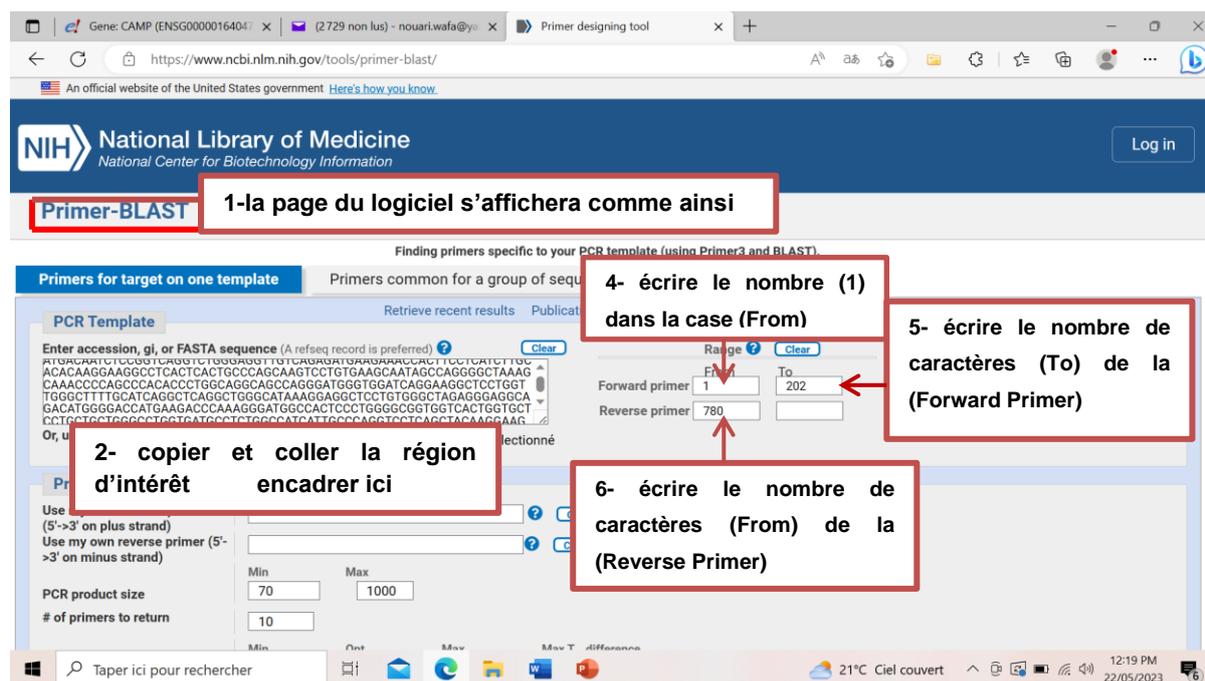


Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes



### 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 séquence), puis (3) supprimer les espaces entre les lignes, ensuite (4, 5, 6,7) on détermine les amorces sens et anti sens (For Ward et Reverse primers).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

Pour optimiser les résultats, quelques paramètres doivent être pris en considération lors de la Conception d'amorces (Figure 1.9).

The figure consists of two screenshots of the NCBI Primer-BLAST web interface, specifically the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section. The interface is in French and includes various settings for primer design.

**1- Sélectionner cette case en choisissant (Genoms for selected organisms)**

**2- vérifier que c'est bien l'espèce voulue.**

**3- cocher ce carré, pour qu'une nouvelle fenêtre s'affichera contenant les résultats**

**4- cliquer sur**

**Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters.** Défiler vers le bas de la page, puis (1) vérifier l'espèce que c'est bien (*Homo sapiens*), ensuite (2) sélectionner la case où c'est écrit (RefSeq mRNA) et choisir (Genomes for selected organisms), puis (3) cocher la case (Show results in a new window) afin que les résultats s'afficheront sur une nouvelle écran et ensuite (4) cliquez sur (Get Primers) pour afficher les résultats.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### 2.2.3. Confirmation des résultats : *in silico* PCR

La validation des résultats est la dernière étape de notre travail. Elle se fait en utilisant le programme *in silico* PCR via le site [http : genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu). Ce programme permet de spécifier la localisation de notre produit spécifique sur le chromosome (Figure 1.10).



**Figure 2.10. Validation des résultats par la plateforme (UCSC génome browser).** (1) aller sur la plateforme (UCSC genome browser), ensuite (2) cliquer sur (Tools), puis sur (in silico PCR).

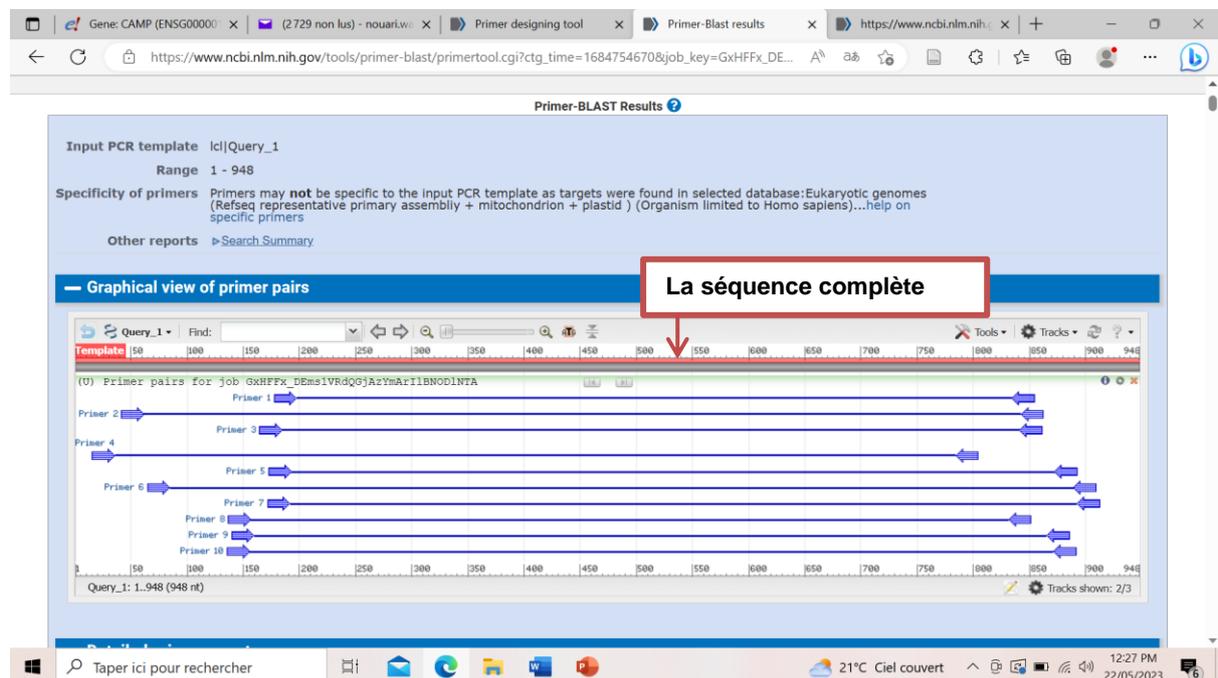
## Chapitre 3. Résultats

### Chapitre 3. Résultats

#### 3.1. Résultats de la conception des amorces

##### 3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

Pour la conception de notre amorce spécifique du gène *LL37*, nous avons d'abord consulté le site Ensembl afin d'obtenir l'intégrité du gène *LL37*. Dans cette étude, notre choix s'est porté sur l'exon 1. Nous avons ensuite utilisé le logiciel Primer-BLAST sur la base de données NCBI. Cela nous a permis d'obtenir 10 paires d'amorces spécifiques du gène *LL37* dans l'exon 1. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.



**Figure 3.1. Les paires d'amorces.** La page des résultats est affichée comme en haut, en rouge c'est la séquence complète et les flèches en bleu représentent les différentes amorces.

Parmi les 10 paires d'amorces, on a choisi la paire d'amorces (1) car elle répond aux critères de bonnes amorces :

- La température de fusion : directe 60.11°C, inverse 59.89°C.
- Longueur : directe 20 nucléotides, inverse 20 nucléotides.
- Teneur en GC : directe 55, inverse 60.
- Amorces spécifiques : moins de 1000 paires de base (677).
- Produit aspécifique : tous plus de 1000 paires de base.

## Chapitre 3. Résultats

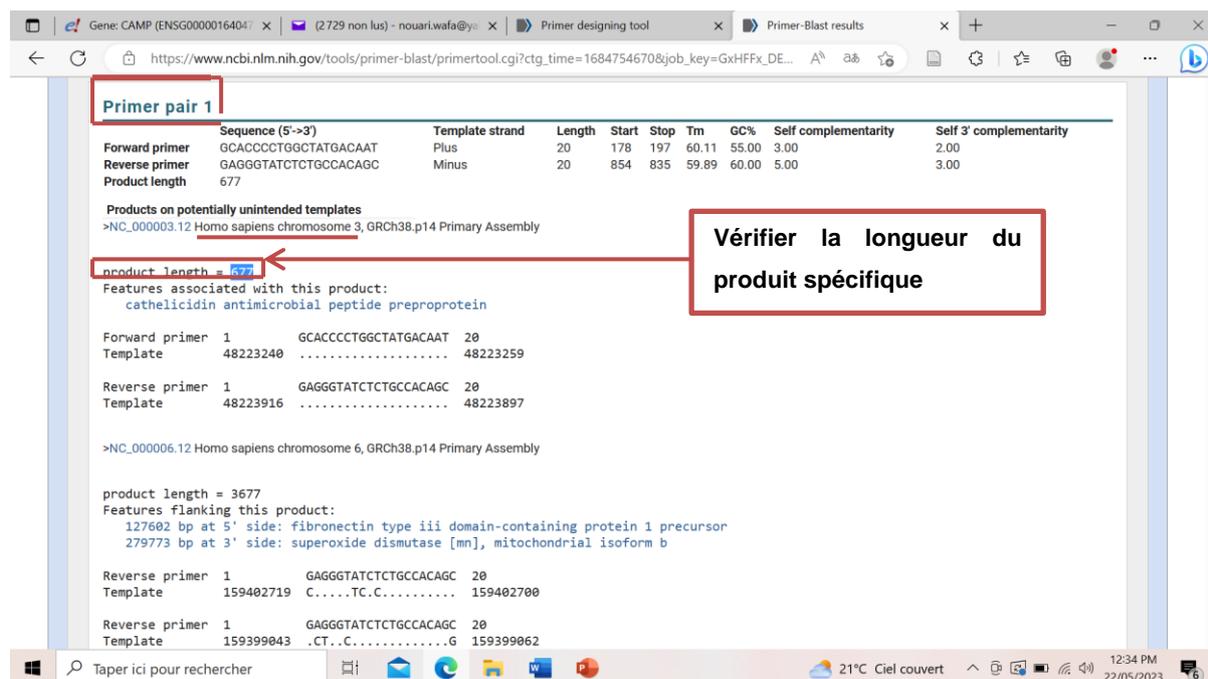


Figure 3.2. Primer pair 1

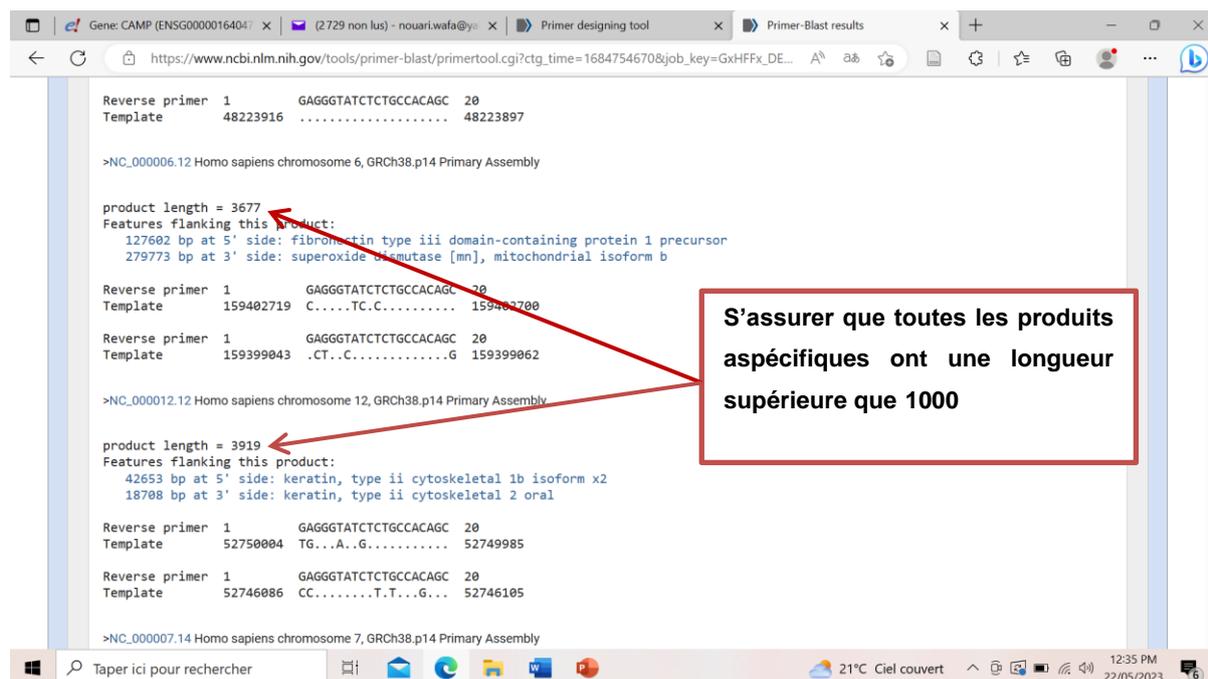


Figure 3.3. Résultats du Primer-BLAST. (1) le contrôle de la longueur des amorces, de leurs températures d'hybridation et du rapport GC, puis (2) la confirmation que c'est bien l'espèce et le chromosome du gène voulu, ensuite (3) la confirmation de la longueur du produit spécifique inférieur à 1000pb et (4) le contrôle que tous les produits aspécifiques ont une longueur supérieure à 1000pb.

### 3.1.3. Résultats de la confirmation par *in-silico* PCR

Les résultats obtenus nous ont confirmé la taille du produit spécifique obtenu 604pb de même que la spécificité des amorces conçues. Les informations obtenues confirment aussi le

## Chapitre 3. Résultats

chromosome 3 porteur du gène *LL37*. Ce résultat nous confirme donc la fiabilité des amorces que nous avons choisies (Figure 3.4).

UCSC In-Silico PCR

>chr3:48223240+48223916 677bp GCACCCCTGGCTATGACAAT GAGGGTATCTCTGCCACAGC  
GCACCCCTGGCTATGACAATctccggctcaggtctgggagttgtcagaga  
tgaagaaccactctctcatcttgacacagaaggaagcctcactcactgc  
ccagcaagctctgtgaagcaatgccagggtctaaagcaaccacagccc  
acacctggcaggcagccagggtgggtggatcaggaagctctgggtg  
ggctttgcatcaggctcaggctggcctaaagggctcctctgggctc  
gaggagggcagacatgggacatgaagaccctaaagggatggcactccc  
ggggcgggtgactggctctctgctgggctgggtgctgctctg  
gcatcattggccaggtctcagctacaaggaagctgtgctgtgctat  
agatggcatcaaccagcgtctcggatgtaacctctacgcctctgg  
acctgacccagggccagatggtagcttggggacattctgctctg  
cttggctggcctggccagctgtgttctctgctctgctgctgcactgc  
ctcagaggagcctctccccttaaatggctccgtgtttccaggg  
aaccttctagagctctgctctcccagctcagagctctctgctctat  
aattctcctgctgagcagataccctc

Vérifier que c'est le chromosome du gène voulu

**Primer Melting Temperatures**

Forward: 62.2 C gcacccctggctatgacaat  
Reverse: 59.8 C gagggtatctctgccacagc  
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

**Help**

[What is chr\\_alt & chr\\_fix?](#)  
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

**Figure 3.4. Résultats de la confirmation.** Un seul résultat est affiché comme en haut, vérifier si la taille et le chromosome sont les mêmes que ceux de notre gène.

## Chapitre 4. Conclusions et perspectives

### Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui agissent comme une des premières lignes de défense contre les infections par la production de plusieurs cytokines qui favorise l'inflammation, la phagocytose et aussi la productions des agents antimicrobiens et des enzymes destructives.

Le LL-37 est un agent antimicrobien puissant contre les infections bactériennes et peut également avoir un potentiel clinique significatif pour traiter les biofilms de *P. aeruginosa*. L'étude de son expression par le macrophage au cours des infections par *P. aeruginosa* peut offrir de nouveaux moyens de lutte contre les maladies infectieuses. Cette étude demande la réalisation d'une PCR pour amplifier le gène *LL37*.

Nous avons conçu des amorces, à partir d'outils bio-informatiques, afin de pouvoir ensuite réaliser une PCR et amplifier le gène *LL37*. Cette étape est importante dans la connaissance du devenir des maladies anti-infectieuses. La paire d'amorces choisie répond à tous les critères de choix de bonnes amorces. Ce résultat a été confirmé par une PCR virtuelle.

La réalisation de ce mémoire de fin d'étude m'a permis d'initier à utiliser avec plusieurs outils comme la recherche des séquences d'ordre génomique de comprendre les propriétés essentielles du bon choix d'amorces pour une PCR réussie.

## Chapitre 5. Bibliographie

### Chapitre 5. Bibliographie

#### A

- Ahmed, A., Siman-Tov, G., Keck, F., Kortchak, S., Bakovic, A., Risner, K., Lu, T. K., Bhalla, N., de la Fuente-Nunez, C., & Narayanan, A. (2019). Human cathelicidin peptide LL-37 as a therapeutic antiviral targeting Venezuelan equine encephalitis virus infections. *Antiviral Research*, 164, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.002>.
- Angeletti, S., Cella, E., Prosperi, M., Spoto, S., Fogolari, M., De Florio, L., Antonelli, F., Dedej, E., De Flora, C., Ferraro, E., Incalzi, R. A., Coppola, R., Dicuonzo, G., Francescato, F., Pascarella, S., & Ciccozzi, M. (2018). Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains : Molecular epidemiology and evolution. *Microbial Pathogenesis*, 123, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.020>.
- Atri, C., Guerfali, F., & Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

#### B

- Bals, R., & Wilson, J. M. (2003). Cathelicidins—A family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(4), 711-720. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2186-9>.
- Barker, A. P., Vasil, A. I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P. J., & Vasil, M. L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis: Phospholipases C and chemotaxis. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1089-1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04189.x>.
- Bialvaei, A. Z., & Samadi Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*, 31(4), 707-721. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>.
- Bosca, L., Zeini, M., Traves, P., & Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells : A role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208(2), 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.035>.
- Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., & Sokołowski, W. (2010). Cathelicidin LL-37 Multitask Antimicrobial Peptide. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 58(1), 15-25. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0057-2>.

#### C

- Chuong Nguyen, M. V., Lardy, B., Paclet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., & Morel, F. (2015). Les NADPH oxydases, Nox : Une nouvelle famille

## Chapitre 5. Bibliographie

d'isoenzymes. *médecine/sciences*, 31(1), 43-52.  
<https://doi.org/10.1051/medsci/20153101012>.

Conibear, T. C. R., Willcox, M. D. P., Flanagan, J. L., & Zhu, H. (2012). Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 180-190. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034561-0>.

Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>.

### D

Deng, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Li, M., Li, D., Huang, X., Wu, Y., Pu, J., & Wu, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* Triggers Macrophage Autophagy To Escape Intracellular Killing by Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Infection and Immunity*, 84(1), 56-66. <https://doi.org/10.1128/IAI.00945-15>.

Didelot, X., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W., & Wilson, D. J. (2016). Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 14(3), 150-162. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.13>.

Diskin, C., & Pålsson-McDermott, E. M. (2018). Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Frontiers in Immunology*, 9, 270. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00270>.

Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: *Drugs*, 67(3), 351-368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>.

Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1408-1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030>.

### E

El Kary, N., El Rassy, E., Azar, N., & Choucair, J. (2016). Ciprofloxacin and imipenem resistance and cross-resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A single institution experience. *American Journal of Infection Control*, 44(12), 1736-1737. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.04.246>.

Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.

### F

## Chapitre 5. Bibliographie

Farhana, A., & Khan, Y. S. (2023). Biochemistry, Lipopolysaccharide. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/>.

Feito, M. J., Diez-Orejas, R., Cicuéndez, M., Casarrubios, L., Rojo, J. M., & Portolés, M. T. (2019). Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.063>.

### G

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*, 262(1), 36-55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>.

### H

Hakala, J. K., Oksjoki, R., Laine, P., Du, H., Grabowski, G. A., Kovanen, P. T., & Pentikäinen, M. O. (2003). Lysosomal Enzymes Are Released From Cultured Human Macrophages, Hydrolyze LDL In Vitro, and Are Present Extracellularly in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), 1430-1436. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000077207.49221.06>.

Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8), 821-830. <https://doi.org/10.1038/ni.2638>.

Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>.

Hu, Z., Murakami, T., Suzuki, K., Tamura, H., Reich, J., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., & Nagaoka, I. (2016). Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *International Immunology*, 28(5), 245-253. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv113>.

Huber, P., Bouillot, S., Elsen, S., & Attrée, I. (2014). Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(10), 1927-1941. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1451-9>.

Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>.

## Chapitre 5. Bibliographie

### I

Ishmael, F. T., & Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101(4), 437-443. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7).

### J

Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (1995). Nitric Oxide: A Neural Messenger. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1), 417-440. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002221>.

Jäger, A. V., Arias, P., Tribulatti, M. V., Brocco, M. A., Pepe, M. V., & Kierbel, A. (2021). The inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages enhances apoptotic cell removal. *Scientific Reports*, 11(1), 2393. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81557-1>.

### K

King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261-312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>.

Kintz, E., & Goldberg, J. B. (2008). Regulation of lipopolysaccharide O antigen expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 3(2), 191-203. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.2.191>.

Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 621-641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>.

Kusaka, S., Nishida, A., Takahashi, K., Bamba, S., Yasui, H., Kawahara, M., Inatomi, O., Sugimoto, M., & Andoh, A. (2017). Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 191(1), 96-106. <https://doi.org/10.1111/cei.13047>.

### L

Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, 188(1), 386-393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>.

Lackman, R. L., Jamieson, A. M., Griffith, J. M., Geuze, H., & Cresswell, P. (2007). Innate Immune Recognition Triggers Secretion of Lysosomal Enzymes by Macrophages. *Traffic*, 8(9), 1179-1189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00600.x>.

## Chapitre 5. Bibliographie

- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J., & Mavrodi, D. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infection and Immunity*, 72(7), 4275-4278. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004>.
- Lee, Y.-J., Liu, H.-Y., Lin, Y.-C., Sun, K.-L., Chun, C.-L., & Hsueh, P.-R. (2010). Fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing nosocomial infection is correlated with levofloxacin but not ciprofloxacin use. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 261-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.007>.
- Leighton, T. L., Buensuceso, R. N. C., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function: *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4148-4163. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12849>.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

## M

- Maheaswari, R., Kshirsagar, J., & Lavanya, N. (2016). Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.176391>.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., Timmermans, J.-P., Herman, A. G., & De Meyer, G. R. Y. (2009). Phagocytosis of bacteria is enhanced in macrophages undergoing nutrient deprivation. *FEBS Journal*, 276(8), 2227-2240. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06951.x>.
- Maxfield, F. R., Barbosa-Lorenzi, V. C., & Singh, R. K. (2020). Digestive exophagy: Phagocyte digestion of objects too large for phagocytosis. *Traffic*, 21(1), 6-12. <https://doi.org/10.1111/tra.12712>.
- Michalska, M., & Wolf, P. (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.
- Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>.

## Chapitre 5. Bibliographie

Moreno-Angarita, A., Aragón, C. C., & Tobón, G. J. (2020). Cathelicidin LL-37: A new important molecule in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Journal of Translational Autoimmunity*, 3, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100029>.

Moretti, J., & Blander, J. M. (2014). Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Current Opinion in Immunology*, 26, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.11.003>.

Morrow, K. A., Ochoa, C. D., Balczon, R., Zhou, C., Cauthen, L., Alexeyev, M., Schmalzer, K. M., Frank, D. W., & Stevens, T. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes U and Y induce a transmissible endothelial proteinopathy. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(4), L337-L353. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00103.2015>.

### N

Nagaoka, I., Tamura, H., & Hirata, M. (2006). An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *The Journal of Immunology*, 176(5), 3044-3052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3044>.

Nelson, B. N., Hawkins, A. N., & Wozniak, K. L. (2020). Pulmonary Macrophage and Dendritic Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 37. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00037>.

### O

Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21-22, 41-59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10, 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.

Ortiz-Castro, R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a Virulence Factor Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Alters Root Development Through Reactive Oxygen Species and Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(4), 364-378. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0219-R>.

### P

## Chapitre 5. Bibliographie

- Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., & Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases : Killers or Builders? *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-25. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>.
- Peek, M. E., Bhatnagar, A., McCarty, N. A., & Zughaier, S. M. (2012). Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa* , Evades NGAL Recognition. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/843509>.
- Pérez, S., & Rius-Pérez, S. (2022). Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation : A Redox Perspective. *Antioxidants*, 11(7), 1394. <https://doi.org/10.3390/antiox11071394>.
- Prolo, C., Álvarez, M. N., & Radi, R. (2014). Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens : Peroxynitrite in Pathogen Invasion. *BioFactors*, 40(2), 215-225. <https://doi.org/10.1002/biof.1150>.

### R

- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>.
- Reig, S., Le Gouellec, A., & Bleves, S. (2022). What Is New in the Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 909731. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.909731>.
- Ridyard, K. E., & Overhage, J. (2021). The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent. *Antibiotics*, 10(6), 650. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060650>.
- Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J., & Struyf, S. (2018). Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Frontiers in Immunology*, 9, 1930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01930>.

### S

- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen-Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209-1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>.

## Chapitre 5. Bibliographie

- Schertzer, J. W., Brown, S. A., & Whiteley, M. (2010). Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH: O<sub>2</sub> controls *P. aeruginosa* quorum sensing via PqsH. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1527-1538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07303.x>.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Papadopoulos, I., Gatter, K. C., Harris, A. L., & Koukourakis, M. I. (2002). Thymidine phosphorylase expression in normal, hyperplastic and neoplastic prostates: Correlation with tumour associated macrophages, infiltrating lymphocytes, and angiogenesis. *British Journal of Cancer*, 86(9), 1465-1471. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600281>.
- Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., & Touil-Boukoffa, C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 7(3), 353. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i3.353>.
- Sreejit, G., Fleetwood, A. J., Murphy, A. J., & Nagareddy, P. R. (2020). Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clinical & Translational Immunology*, 9(12). <https://doi.org/10.1002/cti2.1222>.
- Staněk, L. (2013). [Polymerase chain reaction : Basic principles and applications in molecular pathology]. *Ceskoslovenska Patologie*, 49(3), 119-121.
- Szulc-Kielbik, I., Kielbik, M., Przygodzka, P., Brzostek, A., Dziadek, J., & Klink, M. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* Requires Cholesterol Oxidase to Disrupt TLR2 Signalling in Human Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2019/2373791>.

### T

- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.

### V

- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., Souza, P. R. E. de, Carvalho, A. de A. T., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1-11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>.
- Vance, R. E., Rietsch, A., & Mekalanos, J. J. (2005). Role of the Type III Secreted Exoenzymes S, T, and Y in Systemic Spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 In Vivo. *Infection and Immunity*, 73(3), 1706-1713. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1706-1713.2005>.

## Chapitre 5. Bibliographie

Verschoor, C. P., Puchta, A., & Bowdish, D. M. E. (2012). The Macrophage. In R. B. Ashman (Éd.), *Leucocytes* (Vol. 844, p. 139-156). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5_10).

### W

Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J., & McKay, D. B. (2001). Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity 1 Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 314(4), 823-837. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5195>.

Wilson, M. G., & Pandey, S. (2023). *Pseudomonas Aeruginosa*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>.

Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: Comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155-158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>.

Wood, S., Goldufsky, J., & Shafikhani, S. H. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004934. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004934>.

Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445-455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.

### Y

Yao, Y., Xu, X.-H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 10, 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>.

## Résumé

**Introduction :** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif, pathogène, responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimés. Le macrophage est cellule de la première ligne de défense de l'immunité innée qui permet d'éliminer *P. aeruginosa* par plusieurs mécanismes. Il peut produire les peptides anti-microbiens, possédant une action bactéricide, comme les cathélicidines codées par le gène *LL-37*.

**Objectif :** Conception d'amorces du gène *LL-37* 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 du gène *LL-37*, on a utilisé plusieurs outils : la base de données « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) », pour trouver des séquences spécifiques du gène *LL-37* et un outil de primer-blast fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par *in silico* PCR.

**Résultats :** L'utilisation de l'outil Primer-BLAST du site « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) », a permis d'obtenir une amorce spécifique pour le gène *LL-37* à savoir : Forward primer GCACCCCTGGCTATGACAAT, Reverse primer GAGGGTATCTCTGCCACAGC, avec un produit spécifique de 677 Pb, une température de fusion : directe 60.11°C, inverse 59.89°C, une teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens. La longueur pour les deux amorces est de 20 nucléotides.

**Conclusion :** le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier le gène *LL-37* par PCR (Polymérase Chain Réaction) constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ce gène dans l'immunité anti infectieuse.

**Mots clés :** *P. aeruginosa*, macrophage, *LL-37*, amorces

## ABSTRACT

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative bacterium, pathogenic, responsible for serious infections in immunocompromised people. The macrophage is a cell of the first line defense innate immunity who eliminate *P. aeruginosa* by several mechanisms. It can produce anti-microbial peptides, having a bactericidal action, like cathelicidins encoded by the gene *LL-37*.

**Objective:** Design primers of the *LL-37* gene expressed by the macrophage in order to study his role during *P. aeruginosa* infections.

**Material and methods:** In order to design specific primers for the gene *LL-37*, we used several tools: the database « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) », to find specific sequences of the gene *LL-37* and the Primer-blast tool provided by the NCBI to design primers. The results are confirmed by *in silico* PCR.

**Results:** The use of the Primer-BLAST tool of the site « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) », allowed to obtain a specific primer for the gene *LL-37*, namely: Forward primer GCACCCCTGGCTATGACAAT, Reverse primer GAGGGTATCTCTGCCACAGC, with a specific product of 677 Pb, a melting temperature: direct 60.11°C, reverse 59.89°C, a GC content is 55% for forward primer and 60% for reverse primer. The length for both primers is 20 nucleotides.

**Conclusion:** the choice of a good pair of primers to amplify the *LL-37* gene by PCR (Polymérase Chain Réaction) is an essential step in the success of this technique and in the study of the role of this gene in anti-infective immunity.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, macrophage, *LL-37*, primers.

## ملخص

**مقدمة:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا ممرضة سلبية الجرام مسؤولة عن العدوى الخطيرة في الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة. البلاعم هي خلية خط الدفاع الأول للمناعة الفطرية التي تقضي على *P. aeruginosa* بعدة آليات.

يمكن أن تنتج الببتيدات المضادة للميكروبات مع عمل مبيد للجراثيم، مثل Cathelicidine المشفرة بواسطة الجين *LL-37*.

**الهدف:** تصميم بادئات الجين *LL-37* المعبر عنها بواسطة البلاعم لدراسة دورها خلال عدوى *P. aeruginosa*.

**المواد والطرق:** من أجل تصميم بادئات محددة للجين *LL-37*، تم استخدام العديد من الأدوات: قاعدة البيانات "www.ensembl.org"، للعثور على تسلسلات محددة للجين *LL-37* وأداة أولية NCBI لتصميم البرايمر. تم تأكيد النتائج في *in silico* PCR.

**النتائج:** أتاح استخدام أداة Primer-BLAST من موقع "www.ncbi.nih.gov" الحصول على أساس محدد للجين *LL-37*، وهو: التمهيدي الأمامي GCACCCCTGGCTATGACAAT، التمهيدي العكسي GAGGGTATCTCTGCCACAGC، مع منتج معين من 677 Pb، درجة حرارة انصهار: مباشرة 60.11 درجة مئوية، عكس 59.89 درجة مئوية، محتوى GC هو 55% لبادئ الحاسة و 60% للبرايم المضاد. الطول لكلا البادئين هو 20 نيوكليوتيد.

**الخلاصة:** إن اختيار زوج جيد من البادئات لتضخيم الجين *LL-37* بواسطة PCR (Polymérase Chain Réaction) هو خطوة أساسية في نجاح هذه التقنية وفي دراسة دور هذا الجين في المناعة المضادة للعدوى.

**الكلمات المفتاحية:** *P. aeruginosa*، macrophage، *LL-37*، primers.