

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

**DÉCOUVERTE DES MOLÉCULES ANTIBACTERIENNES NATURELLES  
OU DE SYNTHÈSE CIBLANT SPÉCIFIQUEMENT *NEISSERIA  
MENINGITIDIS* ET *NEISSERIA GONORRHOEAE***

Par

Marthe Lebughe

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie Appliquée et Biotechnologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Professeur Charles Gauthier  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Professeur Marylise Duperthuy  
Département de microbiologie, infectiologie  
et immunologie  
Faculté de médecine  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Professeur Dr Frédéric Veyrier  
INRS-Institut Armand Frappier

## REMERCIEMENTS

Pour les conseils avisés tout au long de ce parcours, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ma réussite dans le projet et à mon intégration au système éducatif québécois.

Pour leur soutien financier tout au long de ce parcours de maîtrise, je souhaite remercier mon organisme subventionnaire de bourse : le Programme Canadien de Bourses de la Francophonie (PCBF, en sigle).

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon Directeur de recherche, Dr Frédéric Veyrier, pour tout le temps qu'il a consacré à m'apporter avec patience les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche. Ses exigences m'ont grandement stimulé.

L'enseignement de qualité dispensé lors de ma maîtrise à l'INRS-IAF a également su nourrir mes réflexions et a représenté une profonde satisfaction intellectuelle : merci donc aux enseignants-chercheurs.

Je tiens aussi à remercier Dr Annie Castonguay et son équipe du laboratoire de chimie, en particulier Golara Golbaghi et Medhi Haghdoost pour leur franche collaboration et leurs apports en composés chimiques mis à notre disposition.

À tous les membres du laboratoire de l'Université de Kinshasa et de l'Institut National de Recherche en Sciences Biomédicales, en particulier aux professeurs Dr Jean Jacques Muyembe, Dr Dieudonné Mumba, Dr Octavie Lunguya et Dr Steve Ahuka de m'avoir encouragé à parfaire ma formation en Microbiologie (Bactériologie) initialement débutée en République Démocratique du Congo.

À ma famille et mes amis qui ont participé de près ou de loin à ce projet par leur soutien continu et leurs marques d'affection, malgré la distance et les années : un grand merci...

## RÉSUMÉ

*Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont des bactéries responsables, respectivement, de la méningite cérébro-spinale et de la gonorrhée. Ces deux pathogènes ont un taux élevé de mutation et une grande capacité d'adaptation. Alors que peu de cas de résistance aux traitements actuels du méningocoque sont enregistrés, l'émergence de souches de *N. gonorrhoeae* multirésistantes constitue actuellement un grand défi dans la lutte contre la gonorrhée. Ainsi, le but de ce projet était de découvrir de nouveaux composés antibactériens naturels et synthétiques contre *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*.

La première partie de ce projet a consisté à cribler des centaines de souches à la recherche d'une activité bactéricide contre *N. meningitidis*. Deux d'entre elles ont démontré une activité bactéricide contre la bactérie. Plusieurs méthodes de mutagénèse ont été réalisées dans le but d'isoler des clones ayant perdu leur activité. Des essais sont actuellement en cours d'identification.

La seconde partie avait pour objectif de déterminer l'activité bactéricide ou bactériostatique de composés antibactériens de synthèse contre les deux *Neisseria* pathogènes et de vérifier leur spécificité grâce à d'autres souches servant de contrôle. Un premier criblage de plusieurs librairies de molécules (fragments et organométalliques) a été effectué grâce à une souche luminescente de *N. meningitidis*. Par la suite, la concentration minimale inhibitrice de la croissance bactérienne après 16 heures a été recherchée pour certains composés sélectionnés. L'activité bactéricide de ces composés après trois heures de contact a aussi été déterminée à différentes concentrations par le dénombrement des unités formant des colonies. Ce travail a permis d'identifier un minimum de deux composés organométalliques actifs et sélectifs dont B02 et  $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$ . Avec la collaboration des Dr Castonguay et Laplante, des modifications seront apportées à ces composés afin d'améliorer leur activité.

## ABSTRACT

*Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* are respectively responsible for cerebrospinal meningitis and gonorrhea. These two pathogens have a high rate of mutation and a great capacity for adaptation. While very few cases of resistance to current meningococcal treatments are recorded, the emergence of multidrug-resistant *N. gonorrhoeae* strains is currently a major challenge in the fight against gonorrhea. Thus, the goal of this project was to discover new natural and synthetic antibacterial compounds against *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*.

The first part of this project was to screen hundreds of strains against *N. meningitidis*. Two of them demonstrated bactericidal activity against the bacteria. After random mutagenesis, clones that have lost their bactericidal activity are currently being identified.

The second part was to determine the bactericidal or bacteriostatic activity of synthetic antibacterial compounds against both pathogenic *Neisseria* and to verify their specificity through other strains used as a control. A first screening of several libraries of molecules was carried out using a luminescent strain of *N. meningitidis*. Subsequently, the minimum inhibitory concentration of bacterial growth after 16 hours was sought for certain selected compounds. The bactericidal activity of these compounds after three hours of contact was also determined at different concentrations by enumeration of the colony forming units. This work identified a minimum of two active and selective compounds organometallics. With the collaboration of Dr. Castonguay and Laplante, modifications will be made to these compounds to improve their activity.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT .....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET GLOSSAIRE.....	x
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....	1
1.1    PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES .....	1
1.2    ÉCOSYSTÈMES.....	3
1.2.1    Écosystème rhinopharyngé .....	3
1.2.2    Écosystème urogénital .....	4
1.3    LE GENRE NEISSERIA/GÉNÉRALITÉS DES NEISSERIA .....	7
1.3.1 <i>Neisseria</i> pathogènes .....	7
1.3.2    Les autres <i>Neisseria</i> spp. ....	19
1.4    SOUCHES BACTÉRIENNES CONTRÔLE DE L'ÉTUDE.....	22
1.4.1 <i>Kingella oralis</i> .....	22
1.4.2 <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	22
1.4.3 <i>Citrobacter rodentium</i> .....	22
1.4.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	23
1.4.5 <i>Staphylococcus aureus</i> méthicillino-résistant.....	23
1.4.6 <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	23
1.5    INTERACTIONS BACTÉRIENNES .....	24
1.5.1    Les peptides antimicrobiens (PAM).....	24
1.5.2    Les systèmes de sécrétion .....	25
1.5.3    Les antibiotiques.....	27
1.6    ANTIBACTÉRIENS À BASE DE MÉTAL .....	29
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	31
2.1    SOUCHES BACTÉRIENNES ET PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE .....	31

2.1.1	<i>Souches bactériennes</i> .....	31
2.1.2	<i>Préparation des milieux de culture utilisés : GCB, LB, 7H9 et 7H10</i> .....	33
2.2	<b>RECHERCHE DE COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS NATURELS</b> .....	34
2.2.1	<i>Mutations aléatoires</i> .....	34
2.3	<b>RECHERCHE DE COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS SYNTHÉTIQUES</b> .....	37
2.3.1	<i>Composés synthétiques</i> .....	37
2.3.2	<i>Criblage de composés actifs sur N. meningitidis</i> .....	37
2.3.3	<i>Mesure de la concentration minimale inhibitrice</i> .....	38
2.3.4	<i>Mesure de l'effet bactéricide</i> .....	38
2.3.5	<i>Recherche des mutants de N. meningitidis ou N. gonorrhoeae capables de résister à des concentrations plus faibles de composés</i> .....	39
	<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b> .....	41
3.1	<b>APPROCHE NATURELLE : CRIBLAGE DES BACTÉRIES</b> .....	41
3.1.1	<i>Étude antérieure : choix des souches bactériennes bactéricides</i> .....	41
3.1.2	<i>Banque des mutants</i> .....	42
3.2	<b>APPROCHE CHIMIQUE : CRIBLAGE DES MOLÉCULES</b> .....	47
3.2.1	<i>Découverte de nouveaux composés antibactériens</i> .....	47
3.2.2	<i>Détermination du type d'activité et de la spécificité des composés actifs sur d'autres souches</i> .....	49
	<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	58
	<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION</b> .....	62
	<b>CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES</b> .....	64
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	65
	<b>ANNEXE</b> .....	74

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Espèces bactériennes de la flore vaginale.....	5
Tableau 2. Différentes souches bactériennes et milieux de culture utilisés .....	32
Tableau 3. Répertoire des composés ayant une activité similaire au témoin positif (érythromycine) ..	48

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Rhinopharynx de l'homme, habitat principal du méningocoque .....	8
Figure 2. Processus infectieux de <i>N. meningitidis</i> .....	9
Figure 3. Distribution mondiale de différents sérogroupes de méningocoque .....	11
Figure 4. Vue en microscopie électronique de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	11
Figure 5. Vue en coupe du <i>N. meningitidis</i> .....	13
Figure 6. Vue en microscopie électronique à balayage de <i>Neisseria gonorrhoea</i> .....	16
Figure 7. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	28
Figure 8. Recherche de l'activité bactéricide des souches de <i>Neisseria</i> après criblage.....	41
Figure 9. Photographie de la souche de LNP18695 ensemencée sur des géloses GCB (A) et courbe de croissance de LNP16475 (B) après exposition à l'UV à différents temps .....	43
Figure 10. Courbe de survie de <i>Neisseria meningitidis</i> aux différents temps d'exposition à l'EMS.....	44
Figure 11. Pourcentage de survie de la souche LNP 16475 (A) /18695 (B) avant et après exposition à l'EMS et avec et sans acide nalidixique .....	45
Figure 12. Représentation schématique de la mesure de la luminescence.....	46
Figure 13. Activité des composés testés à 100 µM sur la croissance de la souche luminescente de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	47
Figure 14. Pourcentage de survie de <i>Neisseria meningitidis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i> après 3 heures de contact avec le composé MAGA0011 à 50 µM.....	49
Figure 15. Amélioration du composé B02 (MAGA0011) : A) Activité bactéricide de différents dérivés de B02 sur <i>N. meningitidis</i> et B) sur <i>N. gonorrhoeae</i> (après 3 heures à 37 °C à une concentration de 50 µM) .....	51
Figure 16. Pourcentage de survie des souches bactériennes de contrôle à l'exposition du composé B02 et ses dérivés à 50 µM après 3 heures de contact à 37 °C : (A) souche de <i>Moraxella catarrhalis</i> et (B) souche <i>MRSA</i> .....	52

Figure 17. Activité bactéricide de certains composés sur *N. meningitidis* (A) et *N. gonorrhoeae* (B) à 50  $\mu\text{M}$  pendant 3 heures à 37 °C.....53

Figure 18. Activité en fonction de la concentration des sels de  $\text{BPh}_4^-$  et de  $\text{BF}_4^-$  sur la croissance de *N. meningitidis*.....55

Figure 19. Activité de  $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$  sur les souches bactériennes de contrôle.....56

Figure 20. Activité dose dépendante comparative de  $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$  sur la survie de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica* et *N. elongata* .....57

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET GLOSSAIRE

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	Molécule de support des gènes
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique	Molécule utilisant l'information génétique portée par l'ADN pour la synthèse des protéines
<b>Antibiotique bactéricide</b>		Si le rapport CMB/CMI $\leq 2$
<b>Antibiotique bactériostatique</b>		Si le rapport CMB/CMI est compris entre 4 et 16
<b>Barrière hémato-encéphalique</b>		Barrière régulant les échanges de substances présentes dans le sang périphérique avec le liquide interstitiel du système nerveux central
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide	Concentration minimale d'antibiotique laissant un nombre de survivants inférieur ou égal à 0,01 % (diminution de 3 logs) d'un inoculum standardisé à $10^5$ - $10^6$ bactéries/mL
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice	Concentration minimale d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible après 18 à 24 h d'incubation à 35-37 °C
<b>Commensal</b>		Une bactérie est qualifiée de commensale lorsqu'elle ne porte pas préjudice à l'hôte
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase	

<b>DO<sub>600</sub></b>		Densité optique à une longueur d'onde de 600 nm
<b>Écosystème</b>		Ensemble dynamique formé de différentes espèces en interrelations entre elles et leur environnement
<b>Effecteur bactérien</b>		Substance sécrétée par des bactéries capables d'activer ou d'inhiber un effet
<b>Fomites</b>		Vecteurs passifs de transmission d'une maladie
<b>GCB</b>	GonoCocci Agar	Milieu de culture des gonocoques
<b>HSH</b>		Hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes
<b><i>In vitro</i></b>		Qualifie toute mesure ou expérimentation réalisée hors de l'organisme vivant
<b><i>In vivo</i></b>		Qualifie toute mesure ou expérimentation effectuée directement sur l'organisme vivant
<b>Microbiote</b>		Ensemble des microorganismes vivant dans le même écosystème
<b>Microorganisme</b>		Petits êtres vivants
<b>Milieu de culture</b>		Support permettant la croissance de cellules, des

		bactéries, de levures ou moisissures
<b>Milieu LB</b>	Milieu Luria-Bertani	Pour la culture bactérienne
<b>Mutagenèse</b>		Terme regroupant plusieurs techniques visant à introduire volontairement des mutations génétiques chez un organisme vivant
<b><i>Neisseria spp</i></b>		Espèces de <i>Neisseria</i> autres que <i>Neisseria meningitidis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé	
<b>Paires de bases G : C, T : A</b>		Paires de bases Guanine : Cystéine, Thymine : Adénine
<b>PAM</b>	Peptide antimicrobien	
<b><i>Quorum sensing</i></b>		Mécanismes régulateurs de l'expression coordonnée de certains gènes bactériens au sein d'une même population bactérienne
<b>Sérogroupes</b>		Ensemble des caractéristiques antigéniques des microorganismes permettant de différencier les souches d'une même espèce. Synonymes : sérotype ou serovar.
<b>Souche bactérienne</b>		Population d'organismes descendant d'un organisme ou de la culture d'un isolat pur.
<b>Souches sensibles</b>		Souches pour lesquelles la

		probabilité pour le succès thérapeutique est forte dans le cadre d'un traitement par voie systémique
<b>Souches résistantes</b>		Souches pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quelque soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
<b>Souches LNP</b>	Laboratoire des <i>Neisseria</i> – Institut Pasteur à Paris	
<b>Symbiose</b>		Relation entre deux espèces
<b>URL</b>	Unité relative de lumière	Résultat de la réaction de la luciférase, proportionnel à l'expression du gène de la luciférase
<b>Vaccins polysidiques</b>		Vaccin composé de sucres qui ressemblent à la surface de certains types de bactéries

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

*Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*, bactéries à Gram-négatif, sont rencontrées principalement chez l'humain et sont responsables respectivement de la méningite cérébro-spinale et de la gonorrhée (Mellin & Hill, 2010).

*N. meningitidis* est retrouvée majoritairement dans le rhinopharynx. Mais très récemment, il a été identifié que le complexe clonal de la lignée 11 (cc11) de *Neisseria meningitidis* est responsable des épidémies de méningococcie invasive en Allemagne et en France, chez les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes. Cet agent pathogène hypervirulent a été en plus associé aux infections urogénitales (Taha et al., 2016; Tzeng et al., 2017). *N. gonorrhoeae*, quant à elle, entraîne des infections sexuellement transmissibles et sa niche écologique est le tractus urogénital.

Ces deux pathogènes ont un taux élevé de mutations spontanées et, en outre, ils sont dépourvus de certains systèmes de réparation de l'ADN (Black, Fyfe, & Davies, 1998; Campbell & Yasbin, 1984). Ils sont naturellement compétents ce qui leur permet une acquisition plus fréquente des gènes d'autres bactéries. Conséquemment, ceci leur confère une grande capacité d'adaptation incluant l'apparition de gènes de résistance aux antibiotiques. Alors que des cas de résistances aux antibiotiques sont notés pour les méningocoques mais restent encore relativement sous contrôle, des souches de *N. gonorrhoeae* multi-résistantes émergent actuellement (Wi et al., 2017). En effet, *N. gonorrhoeae* pourrait évoluer en « superbactérie », résistante aux traitements actuels utilisés contre la gonorrhée, constituant ainsi un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale (Alirol et al., 2017; Quillin & Seifert, 2018). De façon inquiétante, les options de traitements par antibiotiques semblent maintenant manquer et, dans un proche avenir, la gonorrhée pourrait devenir incurable dans certaines conditions. C'est pourquoi *N. gonorrhoeae* est classée parmi les douze bactéries présentant un risque majeur par l'OMS qui incite les gouvernements à se mobiliser afin de développer la recherche de nouveaux antibiotiques (Alirol et al., 2017). Il est donc urgent de créer de nouveaux pipelines de recherche d'antibiotiques incluant la recherche de nouvelles cibles et de nouvelles structures d'antibiotiques (Unemo & Shafer, 2014). Bien que la recherche de nouveaux agents antimicrobiens à base organique se poursuive, un intérêt croissant est porté aux médicaments à base de métal (Li, Grant Collins, & Richard Keene, 2015). Le développement de ces nouvelles

molécules intégrant le pouvoir thérapeutique constituent de nouvelles armes contre les bactéries multirésistantes et plus précisément contre les bactéries pathogènes. Elles agissent via de nouveaux modes d'action. Les complexes organométalliques possèdent des propriétés physico-chimiques uniques, largement utilisées dans la catalyse homogène pour la synthèse de principaux composés et de candidats-médicaments. Au cours des deux dernières décennies, quelques scientifiques du monde entier ont étendu l'utilisation des caractéristiques spécifiques de ces composés (par exemple, diversité structurelle, possibilité d'échange de ligand, propriétés d'oxydoréduction et de catalyse) à des fins médicales. Les résultats ont été stupéfiants. Quelques composés organométalliques ont déjà fait l'objet d'essais cliniques et il est à prévoir que plusieurs autres suivront au cours des prochaines années (Gasser & Metzler-Nolte, 2012).

Le but de cette étude était de découvrir de nouvelles molécules naturelles ou de synthèse ciblant spécifiquement *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Leur efficacité ne devrait être, par ailleurs, restreinte qu'à ces deux microorganismes d'où leur spectre d'action étroit. En outre, leur toxicité sélective, élevée pour ces deux pathogènes, devrait les inhiber ou les tuer avec un effet néfaste minimal sur l'hôte.

Le premier volet de ce projet consiste en une approche dite naturelle. Cette approche a été basée sur les résultats d'une étude antérieure du laboratoire ayant consisté à effectuer un criblage d'une centaine de bactéries pour isoler celles ayant une activité bactéricide contre *N. meningitidis*. Deux souches ont alors été isolées. Le but de cette partie était donc d'effectuer une mutagenèse aléatoire sur ces deux souches, à l'aide d'agents chimiques, dans le but de rechercher des mutants ayant perdu leur activité bactéricide et d'identifier les gènes mutés pour aider à comprendre la perte de leur activité bactéricide.

Le second volet consiste en une approche dite chimique. Celle-ci a visé à cribler des molécules provenant de deux librairies de chimistes (Dr Laplante et Dr Castonguay) en vue de découvrir un composé actif et sélectif ciblant spécifiquement les deux bactéries, *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Par ce criblage, deux composés ayant une activité bactériostatique ont pu être isolés puis mieux caractérisés en ce qui concerne leur activité et leur sélectivité. En collaboration avec l'équipe de chimistes du Dr. Laplante, des essais ont été réalisés en vue d'augmenter l'activité d'une des molécules, notamment en ajoutant différents groupements chimiques. Compte tenu du caractère confidentiel de l'étude, les noms des molécules utilisées ne seront pas citées dans leur intégralité.

La première partie de ce mémoire présente une revue de littérature pertinente au sujet de recherche, telles que les souches pathogènes et non pathogènes de *Neisseria*, les alternatives

thérapeutiques face aux résistances actuelles liées aux infections causées par *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Cette section est suivie d'un résumé des techniques utilisées, d'une description des résultats obtenus les plus importants et la dernière partie présente une discussion des résultats obtenus ainsi que des perspectives dans le futur.

## 1.2 ÉCOSYSTÈMES

### 1.2.1 Écosystème rhinopharyngé

Les voies aériennes supérieures comprennent les fosses nasales, le pharynx et le larynx (organe de la phonation). Les fosses nasales contribuent à l'humidification, à la filtration et au réchauffement de l'air. Le pharynx, au carrefour aérodigestif, est constitué de trois segments : le rhinopharynx faisant immédiatement suite aux fosses nasales, l'oropharynx et le laryngopharynx.

Le rhinopharynx constitue la porte d'entrée pour la plupart des infections. Plusieurs espèces de microorganismes commensaux, dont l'identité et la proportion ne sont pas très étudiées, cohabitent dans cet écosystème de façons permanente ou transitoire et forment ensemble le microbiote. Ce microbiote a été caractérisé dans plusieurs études (Brugger et al., 2012; T. Ren et al., 2012). Le microbiote rhinopharyngé forme ainsi une barrière efficace contre les pathogènes voulant s'y loger. Cependant, une légère modification de sa composition, due à une infection (exemple: virus de la grippe) ou à la prise de médicament peut fragiliser la barrière et permettre l'infection de cet écosystème par des pathogènes. Dans certaines circonstances, certaines souches bactériennes peuvent entraîner des infections locales (pharyngite, laryngite, bronchite, sinusite et otite) ou des voies respiratoires inférieures (pneumonie) (García-Rodríguez & Fresnadillo Martínez, 2002). Les infections respiratoires constituent la troisième cause de décès dans le monde. De plus, elles peuvent aussi être la cause d'infections systémiques entraînant des maladies potentiellement mortelles, telles que la méningite ou la septicémie. Plusieurs espèces bactériennes pathogènes colonisent aussi le rhinopharynx telles que : *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* (Allen, Mitterni, Seah, & et al., 2013). De plus, la proximité entre les bactéries favorise leurs interactions. Ceci occasionne dès lors de nombreux phénomènes d'échange de matériel génétique par transformation, transduction ou conjugaison créant ainsi l'apparition de nouveaux phénotypes. Elles usent de plusieurs stratégies, décrites dans les paragraphes suivants, afin de favoriser leur développement au détriment de leurs congénères.

Les bactéries du genre *Neisseria* sont présentes, pour la plupart, dans les voies respiratoires supérieures ou dans la bouche. À moins d'un état d'immunosuppression, elles ne sont pas pathogènes, à l'exception de *N. meningitidis*. C'est uniquement dans cet écosystème que ce microorganisme trouve son environnement le plus favorable et n'est jamais retrouvé à l'extérieur de son hôte (symbiose obligatoire).

### **1.2.2 Écosystème urogénital**

De la même façon que le rhinopharynx, l'appareil génital humain est aussi colonisé par de nombreux microorganismes. Le microbiote génital est différent selon qu'il s'agisse de l'homme ou de la femme. Peu de choses sont connues relativement au microbiote génital de l'homme. Cependant, celui de la femme est bien connu et joue un rôle protecteur essentiel (Lepargneur & Rousseau, 2002; Martel et al., 2015; Pavis, 2002). Certaines espèces bactériennes commensales prédominent telles que les lactobacilles acidophiles et les *Prevotella* (Martel et al., 2015; Rjafallah, Hsini, Ghozlani, Barhmi, & Kharbach, 2007). On y trouve aussi des coques à Gram-positif tels que présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Espèces bactériennes de la flore vaginale

<b>FLORE VAGINALE NORMALE</b>	
GROUPE I	<p>Espèces bactériennes dont le portage est habituel (98-100 %)</p> <p><i>Lactobacillus</i> (Bacille de Doderlein)</p> <p>Corynebactéries</p> <p><i>Streptocoques α-hémolytique</i></p>
GROUPE II	<p>Espèces bactériennes dont le portage est fréquent (2-40 %)</p> <p><i>Streptocoques du groupe B et D</i></p> <p>Entérobactéries (<i>E. coli</i>, <i>Proteus</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>)</p> <p>Anaérobies (<i>Bacteroides</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Eusobacterium</i>)</p> <p><i>Peptostreptococcus</i>, <i>Veillonella</i>, <i>Mobilincus</i></p> <p><i>Gardnerella vaginalis</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> et autres <i>Staphylocoques</i></p> <p><i>Candida</i></p> <p>Mycoplasmes (<i>Ureoplasma urealyticum</i>)</p>
GROUPE III	<p>Espèces bactériennes dont le portage est exceptionnel (0,2-2 %)</p> <p><i>Pneumocoques</i></p> <p><i>Haemophilus influenzae</i> et <i>para influenzae</i></p> <p><i>Streptocoques du groupe A</i></p> <p><i>Neisseria meningitidis</i>, autres <i>Neisseria</i> et <i>Moraxella</i></p>

**Tableau réalisé et modifié à partir de notes de cours sur savoir interpréter un  
prélèvement bactériologique vaginal, 2012**

La production d'acide lactique par ces bactéries permet de maintenir un pH bas, bloquant la croissance des bactéries à potentiel pathogène et, par ailleurs, protège les muqueuses vaginales (Martel et al., 2015; Rjafallah et al., 2007). Toutefois, comme le rhinopharynx, le microbiote peut subir des modifications dues à des nombreux événements entraînant la diminution de la protection et ayant pour résultat un déséquilibre bactérien. Ainsi, ces perturbations peuvent donner lieu à la prédominance des *Fusobacterium acteroides*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*. Ces conditions de déséquilibre rendent certaines femmes susceptibles de présenter des infections sexuellement transmissibles causées par *Chlamydia trachomatis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae* lors de comportements sexuels à risque (Martel et al., 2015; Rjafallah et al., 2007).

## 1.3 LE GENRE NEISSERIA/GÉNÉRALITÉS DES NEISSERIA

Les *Neisseria* forment un genre de bactéries à Gram-négatif appartenant à la famille des *Neisseriaceae*, dans le groupe des *Proteobacteria*. Ces bactéries sont de formes variables liées à leur évolution : certaines sont allongées (*N. elongata* et *N. bacilliformis*) et d'autres sont de forme coccoïde (*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*). Elles sont immobiles, aérobie stricte, chimiohétérotrophes et oxydase positive. Les différentes espèces se différencient par des tests de métabolisation des sucres comme le glucose, le maltose, le lactose et le sucrose.

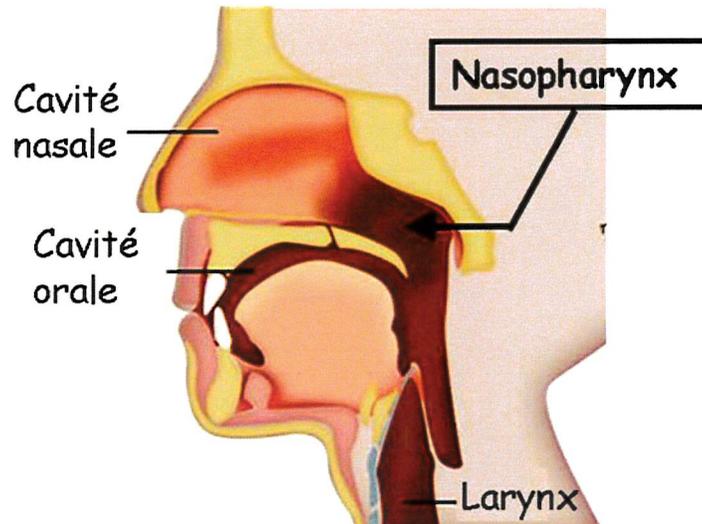
Les *Neisseria* vivent sur la muqueuse des mammifères et la majorité des espèces ne sont pas pathogènes. Le genre comprend cependant deux pathogènes importants dont *Neisseria meningitidis* ou méningocoque, responsable de la rhinopharyngite contagieuse et de la méningite ainsi que *Neisseria gonorrhoeae* ou gonocoque, responsable d'une maladie sexuellement transmissible : la gonorrhée ou blennorragie.

### 1.3.1 *Neisseria* pathogènes

#### 1.3.1.1 *Neisseria meningitidis*

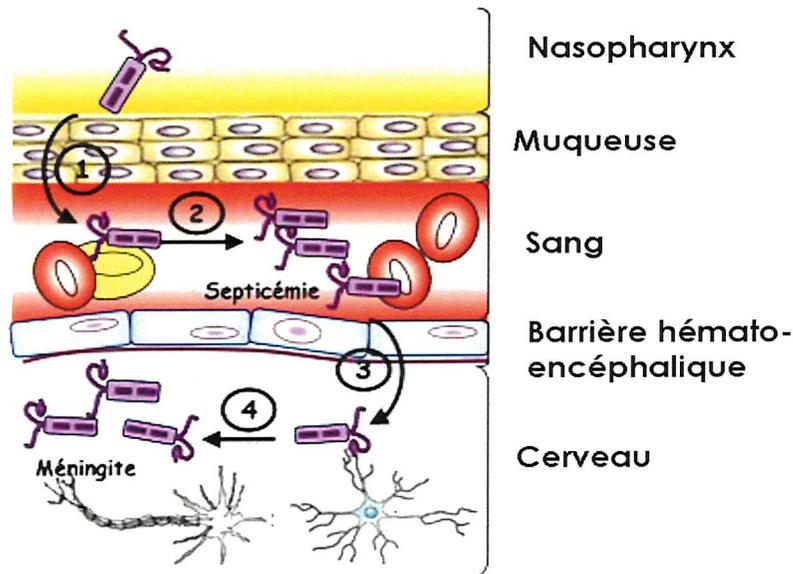
##### 1.3.1.1.1 Habitat

*Neisseria meningitidis*, (méningocoque) est une espèce bactérienne à Gram-négatif, appartenant à la classe des  $\beta$ -protéobactéries. Ce sont des commensaux facultatifs, et leur seul habitat est les humains, sans autre réservoir connu (Figure 1). Les méningocoques colonisent le rhinopharynx de jusqu'à 35 % des individus sains à un moment donné, et la transmission directe de méningocoques de personne à personne se produit par transmission de gouttelettes (Caugant & Maiden, 2009; Caugant, Tzanakaki, & Kriz, 2007).



**Figure 1. Rhinopharynx de l'homme, habitat principal du méningocoque**  
(Lafaye, 2009).

Pour des raisons encore mal comprises, cette bactérie peut parfois traverser la barrière muqueuse et entrer dans la circulation sanguine, entraînant souvent une septicémie potentiellement mortelle (Coureuil et al., 2013). Après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique, les bactéries peuvent se multiplier dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et provoquer une méningite fulminante potentiellement létale (Rosenstein, Perkins, Stephens, Popovic, & Hughes, 2001; Schoen, Kischkies, Elias, & Ampattu, 2014; Stephens, Greenwood, & Brandtzaeg, 2007) (Figure 2). Cependant, le comportement invasif ne fait pas partie du cycle de vie normal du méningocoque car une fois qu'ils sont entrés dans la circulation sanguine ou le système nerveux central, ils ne peuvent pas être facilement transmis à d'autres hôtes.



**Figure 2. Processus infectieux de *N. meningitidis***  
(Lafaye, 2009).

Par ailleurs, au cours d'une épidémie de méningocoque du sérotype C chez les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes, en Allemagne et en France, des études récentes ont montré l'émergence d'un nouveau clone du complexe clonal 11 de *Neisseria meningitidis*, agent hyper virulent responsable de foyers de méningococcie invasive, et de plus en plus associé à des infections urogénitales aux États-Unis (Tzeng et al., 2017). Ces souches se sont bien adaptées et se développent bien en conditions d'anaérobiose. Des cas rapportés d'urétrite méningococcique (O. B. Harrison et al., 2017; Taha et al., 2016) suggèrent que les méningocoques peuvent partager les mécanismes de colonisation urogénitale avec les gonocoques.

#### 1.3.1.1.2 Épidémiologie

La méningite à méningocoque est une forme d'infection bactérienne grave associée à un fort taux de létalité (jusqu'à 50 % lorsqu'elle n'est pas traitée) et à une fréquence élevée (supérieure à 10 %) de séquelles sévères. Elle est observée dans diverses situations, allant de cas sporadiques à des épidémies massives d'ampleur planétaire avec des variations saisonnières partout dans le monde. Mais c'est dans la ceinture de la méningite allant en Afrique Subsaharienne du Sénégal à l'Ouest jusqu'à l'Éthiopie à l'est (26 pays) que le fardeau de la maladie est le plus lourd (environ 30 000 cas signalés chaque année). Des treize sérogroupes recensés de *N. meningitidis*, six sont connus pour provoquer des épidémies (A, B, C, W135, X

et Y). La répartition géographique et le potentiel épidémique varient d'un séro groupe à l'autre (Figure 3).

Le séro groupe A cause des épidémies à large échelle dans les pays en voie de développement mais reste rare en Europe et en Amérique du Nord. Il est responsable de la majorité des méningites épidémiques et endémiques dans l'Afrique subsaharienne.

Le séro groupe B est le principal agent infectieux responsable des méningites endémiques dans les pays industrialisés : 30 à 40 % des cas en Amérique du Nord et 30 à 80 % des cas en Europe. Les autres cas de méningite sont causés par le séro groupe C en Europe et par les sérogroupe C et Y en Amérique du Nord. Les sérogroupe C et B causent la majorité des cas des maladies endémiques au Canada. Et les sérogroupe B, C et Y sont retrouvés aux États-Unis et provoquent la maladie chez les enfants et les jeunes adultes.

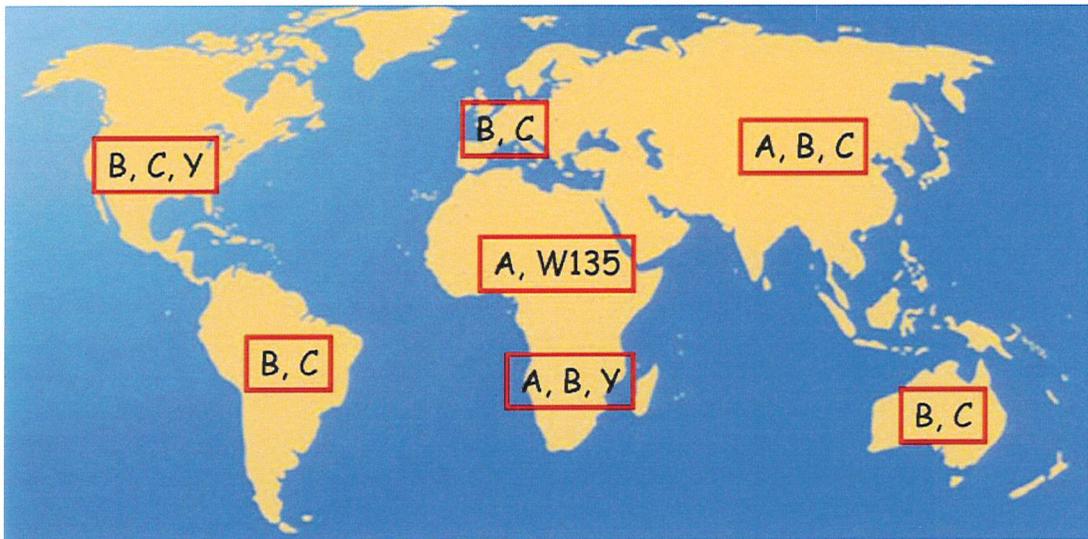


Figure 3. Distribution mondiale de différents sérogroupes de méningocoque (Lafaye, 2009).

#### 1.3.1.1.3 Caractères cultureux

C'est une bactérie à Gram-négatif, sous forme de grains de café associés en diplocoque à face aplatie (Figure 4), capsulée, immobile et aérobic stricte. Elle est très fragile à l'environnement et très sensible aux variations de température. Ses caractères biochimiques sont les suivants : catalase, oxydase, glucose, maltose, YGT et DNase positifs, croissant à 37 °C en présence de CO<sub>2</sub>.

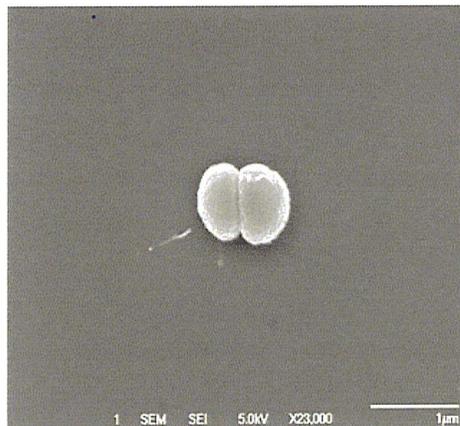


Figure 4. Vue en microscopie électronique de *Neisseria meningitidis* (Veyrier, non publié).

#### **1.3.1.1.4 Virulence, pathogénicité et toxicité : complications de l'infection à *Neisseria meningitidis***

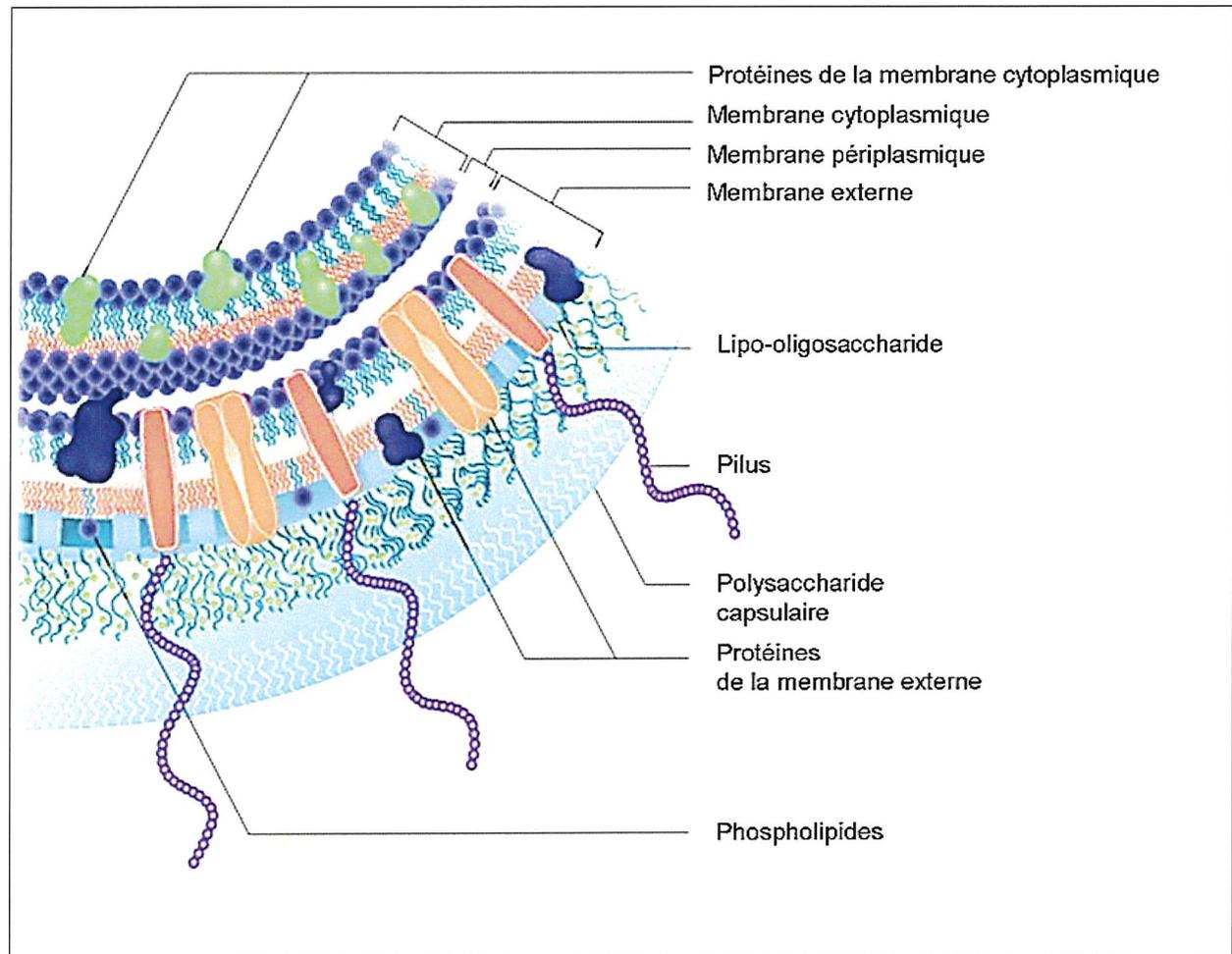
##### ❖ Facteurs de virulence

La virulence de *N. meningitidis* est directement liée à la fois à l'expression de sa capsule, aux structures de surface et aux génotypes sous-jacents.

La structure typique de ce groupe de bactéries est faite d'une couche de peptidoglycane localisée entre les membranes cytoplasmiques interne et externe. La membrane externe contient des lipo-oligosaccharides (LOS) constitués d'un lipide A et d'un corps oligosaccharidique ne possédant pas l'antigène polysaccharidique O retrouvé chez la plupart des bactéries à Gram-négatif (Lafaye, 2009). La bactérie est entourée d'une capsule polysaccharidique, facteur majeur de virulence (Schoen et al., 2014). Cette capsule protège la bactérie de la dessiccation et de l'action phagocytaire et bactéricide des facteurs du complément sérique. En outre, *N. meningitidis* a également développé au cours de son évolution la capacité de changer de type de capsule, par transformation et échange horizontal d'ADN. Ceci lui permet donc de se protéger vis-à-vis de l'immunité induite par un vaccin ou acquise naturellement. Sur la base de différences antigéniques portant sur les polysaccharides capsulaires et leurs protéines de la membrane externe, les méningocoques sont classés en sérogroupes, sérotypes et séro sous-types. Ainsi, les souches de *N. meningitidis* sont divisées en 13 sérogroupes (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y et Z). Les souches pathogènes sont encapsulées et les sérogroupes A, B, C, W135 et Y causent plus de 90 % des infections invasives dans le monde entier (Bogaert et al., 2011; O. B. Harrison et al., 2013). Près de la moitié des souches isolées des porteurs sains n'ont pas de capsules et ne peuvent être classées en sérogroupes. Certains méningocoques dépourvus de capsules ont tout de même les gènes associés à l'expression de la capsule et peuvent ou non la synthétiser à une fréquence élevée. D'autres n'ont pas d'opérons capsulaires et donc pas de capsule. De plus, des recombinaisons génétiques entre les méningocoques sont à l'origine de l'émergence de nouvelles souches (Lafaye, 2009; Stephens et al., 2007; Taha et al., 2016).

Les protéines de la membrane externe contribuent aussi à la virulence de *N. meningitidis* : les pilis facilitent l'adhésion aux épithéliums et la motilité tandis que les porines de la membrane externe sont impliquées dans les interactions avec les cellules hôtes et sont des cibles pour les anticorps bactéricides (Figure 5). En outre, *N. meningitidis* exprime des protéines variables Opa et Opc, importantes dans l'adhésion. Les endotoxines comme les LOS, sont des composés majoritaires de la membrane externe et sont essentielles dans la voie de signalisation

inflammatoire, l'adhésion, la colonisation et dans la méningococcémie septique. De nombreux gènes de virulence méningococciques sont également trouvés dans des espèces de *Neisseria* purement commensales (Marri et al., 2010; Snyder & Saunders, 2006)



**Figure 5. Vue en coupe du *N. meningitidis***  
(Stephens et al., 2007).

#### ❖ Pathogénicité et complications

Quoique généralement asymptomatique, la bactérie peut entraîner des manifestations cliniques diverses, parfois mortelles, et pouvant se présenter comme suit :

- Méningococcémie transitoire : présence des symptômes grippaux tels que la fièvre, des douleurs articulaires et parfois des éruptions cutanées (Stephens et al., 2007) ;
- Méningite : hormis les symptômes ci-haut mentionnés, s'ajoutent des signes d'irritation méningée (raideur de la nuque, diminution de la conscience, irritabilité,...) (Ryan & Ray, 2004) ;

- Méningocémie/Méningococcémie : le tableau clinique est fait de forte fièvre, vomissements, photophobie, convulsions, choc septique pouvant entraîner une insuffisance respiratoire, rénale ou un coma et parfois la mort. Il est possible de noter une éruption méningococcique due à une coagulation intravasculaire disséminée (Brigham & Sandora, 2009; Ryan & Ray, 2004; Stephens et al., 2007) ;
- Méningite à méningocoque chronique : il y a présence de fortes fièvres chroniques, de douleurs articulaires et de céphalées avec ou sans lésions cutanées (Brigham & Sandora, 2009);
- Urétrite méningococcique (infections urogénitales affectant le plus souvent les homosexuels masculins) : souvent les signes sont mal connus, néanmoins il est noté que les sécrétions purulentes urétrales apparaissent une semaine après rapport sexuel non protégé oral et anal (Taha et al., 2016; Tzeng et al., 2017).

#### **1.3.1.1.5 Traitement**

##### ❖ Sensibilité aux médicaments/Résistance

La bactérie est sensible à la rifampicine, à la pénicilline G, aux sulfonamides et aux céphalosporines à large spectre comme la ceftriaxone et le cefotaxime. En cas d'épidémie, l'antibiotique de choix est la ceftriaxone (L. H. Harrison, 2010). Des souches résistantes à la pénicilline, aux sulfonamides, à la rifampicine, aux tétracyclines et aux céphalosporines ont été isolées. De plus, des souches résistantes au chloramphénicol ont aussi été signalées au Vietnam et en France (Janda & Gaydos, 2007).

##### ❖ Prévention

###### ➤ Vaccination

Il existe trois types de vaccins disponibles :

- Vaccins polysidiques utilisés en riposte aux flambées épidémiques principalement en Afrique : soit sous forme bivalente (sérogroupes A et C), trivalente (sérogroupes A, C et W) ou tétravalente (sérogroupes A, C, Y et W), avec une protection de trois ans sans induire une immunité collective. Ces vaccins sont actuellement fabriqués à partir du polyside capsulaire et sont dirigés contre les souches des sérogroupes A, C, Y et W135. Leur immunogénicité et efficacité ont été améliorées dans les vaccins conjugués. Par contre, il n'existe pas de vaccin polysaccharidique capsulaire contre le méningocoque du séro groupe B (séro groupe peu immunogène), vu qu'il est similaire à un antigène de soi présent sur les cellules neuronales.

Ainsi, il a été développé des vaccins à base des antigènes sous-capsulaires (Taha & Deghmane, 2010) ;

- Vaccins conjugués quadrivalents (Men-C-ACWY) utilisés en prévention dans le cadre des calendriers de vaccination systématique et des campagnes de prévention et pour la riposte aux flambées épidémiques. Ils confèrent une immunité plus longue, empêche le portage et induisent une immunité collective ;

- Vaccin protéique contre *N. meningitidis* du groupe B : a été introduit dans le calendrier de vaccination systématique dans un pays (Angleterre d'après les données de 2017) et sert à la riposte aux flambées épidémiques dans les autres pays.

➤ Chimio prophylaxie

Une prophylaxie antibiotique des contacts proches, administrée rapidement, réduit le risque de transmission. La ciprofloxacine est l'antibiotique de choix, et la ceftriaxone peut aussi être utilisée.

### 1.3.1.2 *Neisseria gonorrhoeae*

#### 1.3.1.2.1 Habitat

*Neisseria gonorrhoeae* (gonocoque) est un agent pathogène strict de l'homme appartenant au genre *Neisseria*, de la famille des *Neisseriaceae*. Cette bactérie vit dans les muqueuses des voies génitales de l'homme et de la femme. Elle se transmet par voie sexuelle, infectant le tractus urogénital et occasionnellement peut coloniser la muqueuse rectale et pharyngée. Il existe la conjonctivite gonococcique du nouveau-né découlant de la contamination de l'œil lors de l'accouchement par voie génitale. La transmission peut se faire également par des fomites, dans des cas de vulvo-vaginites chez les jeunes filles prépubères.

#### 1.3.1.2.2 Épidémiologie

Plus de 62 millions de cas de gonococcies sont enregistrés selon l'OMS chaque année à travers le monde. La majorité des cas surviennent dans les pays en développement. Les infections gonococciques sont au deuxième rang parmi les maladies bactériennes à déclaration obligatoire aux États-Unis, le taux le plus élevé est observé chez les Afro-Américains et dans les régions rurales du Sud-Est des États-Unis. L'incidence de ces infections est la plus élevée chez les jeunes, 40 % chez les jeunes filles de 15 à 19 ans (World Health, 2012).

### 1.3.1.2.3 Caractères cultureux

C'est une bactérie à Gram-négatif sous forme d'un haricot en microscopie (Figure 6), non sporulée, non mobile, encapsulée et non acido-résistante. Elle croît sur milieux enrichis de substances organiques (sang, sérum, ascite) sur lesquels elle forme en 18 à 24 heures des colonies grisâtres à bords réguliers. Une atmosphère aérobie stricte et enrichie de 8 à 10 % de CO<sub>2</sub> est nécessaire. Son pH optimal est de 7,5 et sa température optimale de croissance est de 35-36 °C. Elle est oxydase positive et produit des β-lactamases. En outre, cette bactérie est très fragile face à la dessiccation, l'oxydation et les rayons lumineux expliquant ainsi sa transmission sexuelle exclusive par contact direct au niveau des muqueuses.

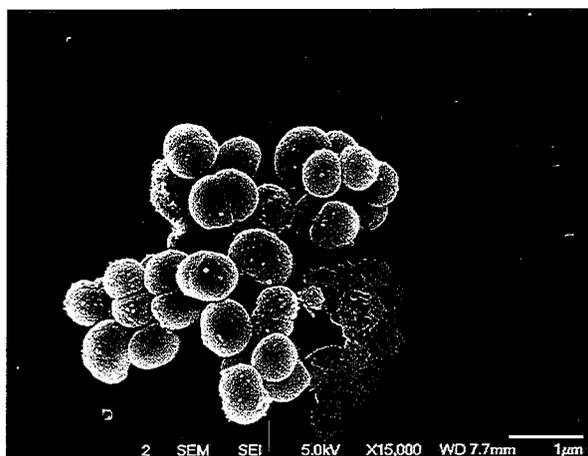


Figure 6. Vue en microscopie électronique à balayage de *Neisseria gonorrhoea* (Veyrier, non publiés)

### 1.3.1.2.4 Virulence, pathogénicité et toxicité : complications de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae*

#### ❖ Facteurs de virulence

La bactérie possède dans sa paroi des lipopolysaccharides antigéniques et toxiques (endotoxine). Ces lipopolysaccharides produisent des effets toxiques sur les cellules de la muqueuse. Les protéines de la membrane externe (PI, PII et PIII) sont antigéniques. La protéine PI permet de distinguer de nombreux sérovars. En outre, la bactérie ne possède pas d'exotoxine mais excrète, par ailleurs, une protéase dégradant les immunoglobulines A (IgA). Les formes virulentes possèdent des pilis d'adhésion qui, avec la protéine PII, assurent la fixation des bactéries sur la muqueuse urogénitale. La présence de ces pilis augmente la résistance des bactéries à la phagocytose.

#### ❖ Pathogénicité et complications

Les infections causées par *N. gonorrhoeae* sont des maladies bactériennes sexuellement transmissibles courantes. Elles sont associées à un large éventail de manifestations cliniques.

Chez l'homme, le risque de contamination est de 35 % en moyenne avec une partenaire infectée lors des rapports sexuels. Les hommes éprouvent généralement des symptômes du tractus urinaire inférieur attribués à l'urétrite, à l'épididymite, à la proctite ou à la prostatite, avec un écoulement purulent urétral. Des bactériémies peuvent se produire et entraîner la dissémination du gonocoque dans l'organisme et être responsable des lésions cutanées, d'arthrites, etc.

Chez les femmes, le risque de contamination avec un partenaire infecté est de 75 à 90 %. L'infection se présente sous forme de cervicite (écoulement vaginal accru), de dysurie, des douleurs abdominales et d'anomalies menstruelles. Néanmoins, il peut y avoir absence de signes ou symptômes. Il n'est pas rare que les complications locales soient les premières manifestations de l'infection gonococcique. Les localisations extragénitales (pharyngées, anales et oculaires), les bactériémies et les localisations à distance sont similaires à celles observées chez l'homme.

Chez le nouveau-né, l'ophtalmie purulente est acquise au moment de la traversée de la filière génitale quand une mère est infectée et non traitée. Elle conduit à la cécité, l'abcès du cuir chevelu, l'arthrite septique et la méningite.

#### **1.3.1.2.5 Sensibilité et résistance aux antibiotiques**

##### ❖ Prévention

Outre la prophylaxie locale efficace, des mesures d'hygiène et éducatives ainsi que le traitement du partenaire sexuel régulier ou occasionnel sont préconisés. Il n'existe pas encore à ce jour de vaccin efficace.

##### ❖ Chimiothérapie

Hormis la résistance connue aux antibiotiques (pénicilline, tétracycline, quinolones), jusqu'en 2016, toutes les souches étaient sensibles aux céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone). Et à cette même période, une souche non sensible à la céfixime (CMI de 0,5 mg/L) avait été identifiée (World Health, 2012). Deux principaux clones gonococciques résistants à la céfixime, MLST ST7363 et ST1901 (NG-MAST ST1407 les plus fréquents au niveau international) avaient également montré leur capacité à développer une résistance

élevée à la ceftriaxone (superbugs H041 et F89). Ils auraient probablement émergé, évolué et commencé à diffuser dans la zone métropolitaine, y compris Kanagawa, au Japon, suivi par leur transmission mondiale. En outre, depuis lors, il a aussi été fait état de souches résistantes à l'azithromycine et à l'érythromycine aux États-Unis et au Canada.

En 2017, une souche non sensible à la céfixime (2 mg/L) et à la ceftriaxone (1 mg/L) a été retrouvée au Québec (Lefebvre et al., 2018). Cet isolat découvert au Canada portait l'allèle *penA* et serait provenu de l'Asie. Au total, pour la même année, il a été signalé 5 isolats résistants à la ceftriaxone dans le monde entier (CMI comprise entre 0,5-2 mg/L) (Cámara et al., 2012; Unemo et al., 2012). La CMI de ceftriaxone la plus élevée déclarée au Canada était de 0,25 mg/L, ce qui représente seulement 0,45 % de tous les isolats de *N. gonorrhoeae* testés en 2010-2016 (Les Maladies, 2015).

Depuis l'introduction des antimicrobiens dans le traitement de la gonorrhée, *N. gonorrhoeae* a développé une résistance à tous les antimicrobiens de première intention utilisés dans le traitement empirique. Dans de nombreux pays, les céphalosporines à spectre élargi demeurent encore les seules options restantes dans la monothérapie (Ohnishi et al., 2011; Tapsall, Ndowa, Lewis, & Unemo, 2009). De manière inquiétante, des échecs thérapeutiques avec la céfixime (CFM) avaient été rapportés dans plusieurs pays (Allen et al., 2013; Lewis et al., 2013; Unemo & Nicholas, 2012), et de rares cas d'échecs thérapeutiques avec la ceftriaxone avaient été vérifiés dans quelques pays (Golparian et al., 2014; Margos et al., 2017; Read, Limnios, McNulty, Whiley, & Lahra, 2013).

La plupart de ces échecs de traitement aux céphalosporines avaient été causés par des souches de *N. gonorrhoeae* multirésistantes appartenant aux types de séquences STT (ST) ST7363 et ST1901 (Ohnishi et al., 2010; Unemo & Shafer, 2014). Ces types de souches, dénommées "superbactéries", avaient été isolées au Japon ("H041"), en France ("F89") et en Espagne ("F89") de 2009 à 2011 (Cámara et al., 2012), ce qui pourrait représenter la phase initiale de dissémination des souches gonococciques avec une résistance élevée à la ceftriaxone. Le principal mécanisme de résistance aux céphalosporines dans ces isolats gonococciques résistants à la ceftriaxone serait lié à une nouvelle mosaïque d'allèles *penA*, codant la protéine 2 de liaison à la pénicilline.

Au cours des deux dernières décennies, il a donc été soupçonné que des souches gonococciques présentant une sensibilité réduite et une résistance aux céphalosporines avaient émergé du Japon et se seraient ensuite répandues à l'échelle internationale (Tapsall et al., 2009).

L'émergence et la propagation de *N. gonorrhoeae* avec résistance aux antibiotiques ont rendu ainsi difficile le traitement de la gonorrhée, ce qui compromet la gestion et le contrôle des infections.

### **1.3.2 Les autres *Neisseria* spp.**

#### *1.3.2.1 Habitat et épidémiologie*

La plupart de ces espèces sont considérées comme commensales des muqueuses des voies respiratoires supérieures de l'homme et de certains animaux. Certaines d'entre elles causent occasionnellement des maladies chez des sujets immunodéprimés ou présentant une infection systémique résultant de la piqûre d'animaux chez les personnes sensibles.

#### *1.3.2.2 Caractères cultureux*

Ce sont des organismes à Gram-négatif, non mobiles et non sporulés appartenant à la famille de *Neisseriaceae* et comprenant d'autres genres d'intérêt médical comme *Kingella* et *Eikenella*. Il existe deux morphologies, certaines se présentent sous forme de bactéries diplococques avec leurs côtés adjacents aplatis, ressemblant à un rein ou un grain de café (comme *N. meningitidis*) d'autres ont la forme de bâtonnets moyens ou longs par paires ou en chaînes courtes (comme *N. elongata*). Il a récemment été montré que la forme coque est le résultat d'une évolution par perte de gènes chez un ancêtre bacille commun à tous les coques (Veyrier et al., 2015).

Du point de vue des caractères biochimiques, toutes les espèces sont oxydase et catalase positives exceptées les sous espèces de *Neisseria elongata* : *N. elongata* subsp. *nitroreducens* et *Neisseria elongata* subsp. *elongata* qui sont catalase négative. La plupart de ces espèces croissent entre 35 et 37 °C en présence du CO<sub>2</sub> ou de l'humidité. Les espèces sont généralement aérobies mais certaines ont démontré une croissance en conditions anaérobiques.

#### *1.3.2.3 Virulence, pathogénicité et complications de l'infection aux autres *Neisseria**

Les espèces du genre *Neisseria* sont occasionnellement responsables des maladies chez des personnes souffrant des troubles médicaux sous-jacents ou de suppression ou déficience immunitaire.

#### 1.3.2.4 Descriptif des autres *Neisseria*

##### 1.3.2.4.1 *Neisseria lactamica*

Il est facilement confondu avec *N. meningitidis*, car il est morphologiquement similaire (Veyrier et al., 2015) et peut se développer sur des milieux sélectifs. *N. lactamica* est une commensale des voies respiratoires supérieures des nourrissons et des enfants. Contrairement à *N. meningitidis*, la colonisation de l'oropharynx par *N. lactamica* débute dès deux semaines après la naissance (Bennett et al., 2005). Il est rarement pathogène, bien que des cas exceptionnels de méningite, pneumonie et de septicémie aient été décrits. *N. lactamica* présente habituellement une sensibilité réduite à la pénicilline.

##### 1.3.2.4.2 *Neisseria sicca*

Les colonies formées par *N. sicca* sont grandes ( $\leq 3$  mm), sèches, ridées et blanc grisâtre, bien que certaines souches puissent produire un pigment jaunâtre. Cette bactérie est un commensal oropharyngien commun chez les humains. Néanmoins, il peut apparaître comme un agent pathogène opportuniste. *N. sicca* a été récemment impliqué, par exemple, en tant qu'agent causal de l'endocardite (Bennett et al., 2005; Jeurissen, Stroy, Wielenga, & Andriessse, 2006).

##### 1.3.2.4.3 *Neisseria elongata*

*N. elongata* forme des colonies semi-opaques, blanc grisâtre, et le diamètre peut atteindre 3 mm après 48 heures d'incubation. Les cellules allongées de *N. elongata* sont des bâtonnets courts d'environ 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'espèce comprend les trois sous-espèces : *Neisseria elongata* subsp. *elongata*, *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* et *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*. A titre d'exception au sein du genre *Neisseria*, *N. elongata* subsp. *elongata* est catalase négative et ne produit pas d'acide à partir du glucose ou d'autres hydrates de carbone. En revanche, *N. elongata* subsp. *glycolytica* est catalase positive et acidifie faiblement les milieux glucose. Enfin, *N. elongata* subsp. *nitroreducens* est catalase négative et réduit le nitrate. Comme les autres espèces de *Neisseria*, *Neisseria elongata* apparaît principalement comme un colonisateur de l'oropharynx humain. Néanmoins, plusieurs cas d'endocardite à *N. elongata* ont été publiés (Hsiao et al., 2008).

##### 1.3.2.4.4 *Neisseria cinerea*

*Neisseria cinerea* (autrefois appelé *Micrococcus cinerea*), première bactérie commensale découverte en 1906 par Von Lingelsheim, a été communément isolée des voies respiratoires supérieures et dans d'autres sites tels que le col utérin, le rectum, les conjonctives, le sang et le

liquide céphalo-rachidien. Elle a été également associée à des rares cas de péritonite, d'amygdalite, de lymphadénite, de proctite et de cavitation pulmonaire.

#### **1.3.2.4.5 *Neisseria flavescens* et *Neisseria polysaccharea***

*Neisseria flavescens* et *Neisseria polysaccharea* ont été retrouvées dans les voies respiratoires supérieures et l'oropharynx respectivement de l'homme et sont rarement associées aux processus infectieux.

#### **1.3.2.4.6 *Autres espèces***

*Neisseria subflava*, *N. flava*, *N. perflava* et *N. mucosa* sont retrouvées dans les voies respiratoires supérieures de l'homme et sont des isolats occasionnels provenant de processus infectieux, y compris l'endocardite, la bactériémie, la méningite, la pneumonie, la péricardite, la péritonite, l'arthrite septique et les abcès hépatiques.

*Neisseria weaveri* fait partie de la flore buccale normale canine et a été isolée à partir d'un cas d'infection des voies respiratoires inférieures.

#### **1.3.2.5 *Sensibilité aux antibiotiques pour les autres Neisseria***

Les espèces du genre *Neisseria spp.* sont sensibles aux céphalosporines de 2ème et 3ème génération et à l'amoxicilline. Selon les souches, certaines ont démontré une sensibilité intermédiaire à élevée aux pénicilline et amoxicilline. *N. polysaccharea* est résistant à la vancomycine.

## 1.4 SOUCHES BACTÉRIENNES CONTRÔLE DE L'ÉTUDE

Dans cette étude, nous avons eu recours, pour évaluer l'activité des composés chimiques, à l'utilisation de certaines souches bactériennes qui nous ont servi de contrôle. Il s'agit de :

### 1.4.1 *Kingella oralis*

C'est une bactérie retrouvée dans la plaque dentaire humaine, mais on peut aussi la trouver en plus petites quantités dans les sites salivaires et muqueux. Elle est souvent associée à la parodontite (Chen, 1996). Les espèces de *Kingella* sont connues pour échanger des plasmides de résistance aux antibiotiques avec d'autres bactéries, ce qui donne une possibilité de *Kingella oralis* comme réservoir de résistances (Roberts, Wagenvoort, van Klingeren, & Knapp, 1988).

### 1.4.2 *Moraxella catarrhalis*

Elle a la même forme et la même niche écologique que les *Neisseria*. Elle était classée antérieurement comme *Micrococcus* puis *Neisseria* ou *Branhamella*. Cependant, elle est génétiquement très différente des *Neisseria*, elle appartient au  $\gamma$ -protéobactéries et elle est maintenant appelée *Moraxella catarrhalis*. Cette bactérie vit dans le rhinopharynx (70 % des individus) et est une cause fréquente d'otite moyenne chez l'enfant, de sinusites aiguës et chroniques à tout âge et d'infections de l'appareil respiratoire chez l'adulte atteint d'une pneumopathie chronique. Elle diffuse par contiguïté à partir du site de colonisation dans l'appareil respiratoire jusqu'au site d'infection.

### 1.4.3 *Citrobacter rodentium*

C'est une entérobactérie pathogène de la muqueuse de la souris partageant plusieurs mécanismes pathogènes avec *E. coli* entéropathogène (EPEC) et *E. coli* entérohémorragique (EHEC). Cette bactérie a été longtemps utilisée comme modèle pour comprendre la base moléculaire de l'infection EPEC et EHEC *in vivo* et aussi étudier l'immunologie des muqueuses y compris la dérégulation des réponses inflammatoires intestinales pendant la colite induite par des bactéries et le rôle du microbiote intestinal dans la virulence des pathogènes entériques (Collins et al., 2014).

#### **1.4.4 *Yersinia enterocolitica***

C'est une bactérie à Gram-négatif pathogène chez l'homme et l'animal dont la transmission est alimentaire (restauration collective, crudité, ...).

#### **1.4.5 *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie du genre : coques, Gram positifs, retrouvée majoritairement à la partie antérieure des fosses nasales et sur la peau des personnes saines sans causer d'infections. Elle est associée aux infections de la peau et des tissus mous ; en outre, elle est résistante actuellement à quasiment tous les antibiotiques.

#### **1.4.6 *Mycobacterium smegmatis***

Bactérie considérée comme non pathogène (utilisée pour sa croissance rapide), c'est un modèle simple pour les espèces mycobactériennes, (homologie avec *Mycobacterium tuberculosis* où sont observés plus de 2000 gènes homologues). Elle est facile à travailler avec un temps de doublement rapide et qui ne nécessite qu'un laboratoire de biosécurité de niveau 2.

## 1.5 INTERACTIONS BACTÉRIENNES

En plus des nombreuses interactions avec l'hôte, la colonisation des niches écologiques implique que les bactéries doivent user de diverses stratégies permettant leur propre développement au détriment de leurs congénères. Ces interactions peuvent être de trois natures : les interactions neutres n'ayant aucun effet sur les espèces environnantes, les interactions synergiques favorisant le métabolisme de la population environnante tels que le « *quorum sensing* » et le système de désintoxication des antibiotiques et les interactions antagonistes où la présence d'une espèce a un effet néfaste sur au moins une espèce voisine tel que le système de sécrétion bactérien (Dandekar & Eisenreich, 2015).

### 1.5.1 Les peptides antimicrobiens (PAM)

Les peptides antimicrobiens, par leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires et anticancéreuses (Lai & Gallo, 2009; Powers & Hancock, 2003; Zasloff, 2002) sont des molécules clés du système immunitaire inné pour les organismes qui les possèdent (Diamond, Beckloff, Weinberg, & Kisich, 2009). Leurs modes d'action peuvent être résumés en deux groupes : le mécanisme de déstabilisation membranaire (conformation, charge et polarité membranaire) (Andrès & Dimarcq, 2007; Hancock, 2000) et les mécanismes intracellulaires.

Les PAM sont classés selon leur charge globale, peptides cationiques ou anioniques, et leur structure secondaire (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006). Et les bactériocines, peptides antimicrobiens produits par les bactéries (Gram positifs et Gram négatifs) (Cotter, Hill, & Ross, 2005) représentent une large classe ; elles sont synthétisées par la voie ribosomique. Elles possèdent des propriétés antibiotiques et de ce fait, elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Mais elles diffèrent des antibiotiques par leur synthèse ribosomale, leur activité à des concentrations bien plus faibles et à leur spectre d'activité généralement restreint (Nes, 2011). La découverte révolutionnaire des peptides antimicrobiens a longtemps fait croire que ces molécules pouvaient être des candidats idéals pour de nouvelles thérapies contre les bactéries résistantes voire multirésistantes (Campos et al., 2004; Fedders, Podschun, & Leippe, 2010). Ils pourraient constituer dans un avenir proche une solution novatrice en matière anti-infectieux. Et la résistance des microorganismes envers ces peptides est peu probable du fait qu'ils font partie de l'immunité innée de l'organisme (Braff et al., 2005). Cependant, une revue

datant de 2003 rédigée par Yeaman et ses collaborateurs (Yeaman & Yount, 2003) a cité l'existence d'une résistance bactérienne aux peptides antimicrobiens. Comme dans le cas des antibiotiques classiques, une résistance de type constitutive (passive) et une autre de type inductive (adaptative) ont été caractérisées.

Ces faits expliquent l'intérêt de développer de nouveaux agents ayant de nouveaux mécanismes d'action et qui engendraient un minimum ou pas de résistance.

### **1.5.2 Les systèmes de sécrétion**

Chez les bactéries, la sécrétion des protéines à travers les membranes est un processus actif réalisé par des machineries moléculaires appelées systèmes de sécrétion. Jusqu'à présent, neuf types de systèmes de sécrétion ont été mis en évidence différant autant par leur architecture que par leur mécanisme de fonctionnement (Leone et al., 2018). Tous n'engendrent pas un effet bactéricide. Huit systèmes de sécrétions (hormis le type VII) ont été recensés chez les bactéries à Gram-négatif, bien que pour certains peu de données les concernant n'a été décrit. Et le système de sécrétion de type VII a été noté chez les bactéries à Gram-positif.

Les types I sont responsables de la sécrétion d'enzymes extracellulaires par les bactéries à Gram-négatif, comme la sécrétion d'hémolysine  $\alpha$  chez *Escherichia coli*, de l'adénylate cyclase chez *Bordetella pertussis*, de protéases chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wandersman, 1996). La sécrétion par des systèmes de type II met en jeu un système particulier, dit système Sec, comprenant différentes protéines, dont une ATPase, une protéine chaperon et une peptidase. Les protéines exportées par ces systèmes possèdent une séquence d'acides aminés hydrophobes, dite « séquence signal », qui est nécessaire à leur exportation mais sera éliminée par la peptidase dans l'espace périplasmique. Ces systèmes sont responsables de la sécrétion d'enzymes pectiques et de cellulases par *Erwinia*, d'élastase, de phospholipase C et d'exotoxine A par *Pseudomonas aeruginosa*, de pullanase par *Klebsiella oxytoca* (Hobbs & Mattick, 1993). Ces deux types (type I et II) sont utilisés lors de la sécrétion de protéines au cours d'un contact avec les cellules.

Le type III met en jeu une vingtaine de protéines, dont beaucoup sont des homologues des composants de la biosynthèse des flagelles. Ce système permet la sécrétion de protéines responsables de l'adhérence de la bactérie à la surface cellulaire (*E. coli* entéro-pathogènes), de l'entrée de la bactérie dans des cellules non phagocytaires (*Salmonella typhimurium*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*) ou au contraire de la résistance à la phagocytose par les macrophages (*P.*

*aeruginosa*, *Yersinia spp.*), d'induction de l'apoptose des macrophages (Anderson & Schneewind, 1999).

Le système de sécrétion de type IV (SST4) est impliqué dans la sécrétion de divers complexes protéiques à travers la membrane des bactéries à Gram-négatif. Ce système a comme fonction le transfert de matériel génétique au cours de la conjugaison et celui de protéines pures. Il a récemment été démontré, chez *Xanthomonas*, que le SST4 peut sécréter des toxines tuant d'autres cellules bactériennes. Ce système joue ainsi un rôle important dans la virulence de certaines bactéries (Souza et al., 2015).

Ce système de sécrétion est composé d'un ensemble de 12 protéines formant un complexe multiprotéique. Trois groupes fonctionnels de protéines sont identifiés : les ATPases sur la membrane interne, les protéines formant le canal transmembranaire et celles constituant le pilus de la surface bactérienne (Ferrandez, 2008).

Le système de sécrétion de type V englobe les protéines auto-transporteuses (observées chez *Neisseria gonorrhoeae* et *Helicobacter pylori*), le système de sécrétion a deux composantes et la famille de protéines de type Vc ou AT-2. Depuis sa découverte à la fin des années 1980, la description de cette famille de protéines sécrétées s'est développée continuellement, en grande partie à cause de l'avènement de l'ère génomique, pour devenir le plus grand groupe de protéines sécrétées dans les bactéries à Gram négatives. Plusieurs de ces protéines jouent un rôle essentiel dans la pathogenèse des infections bactériennes.

Le système de sécrétion de type VI a été décrit à la fois chez des bactéries pathogènes (*Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa*) (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006) et non pathogènes. Il est composé de 12 à 13 protéines. Il aurait un rôle non seulement dans la pathogenèse d'organismes supérieurs (Bingle, Bailey, & Pallen, 2008; Cascales, 2008) mais aussi dans la défense contre les prédateurs eucaryotes simples et dans les interactions entre les bactéries (Coulthurst, 2013; Schwarz, Hood, & Mougous, 2010).

Le système de sécrétion de type VII (composé de 12 à 25 protéines) a été caractérisé pour la première fois chez *M. tuberculosis* (Houben, Korotkov, & Bitter, 2014). La sécrétion de type VII est une voie de sécrétion non-canonique pour les protéines de la famille des mycobactéries.

La voie de nucléation-précipitation extracellulaire (ENP) ou le système de sécrétion de type VIII (T8SS) chez les bactéries Gram négatives (diderm) est responsable de la sécrétion et de l'assemblage des prépilines pour la biogenèse des fimbriae, le curli prototypique (Green et al., 2016; Henderson, Navarro-Garcia, Desvaux, Fernandez, & Ala'Aldeen, 2004).

Le système de sécrétion de type IX (T9SS) est présent exclusivement chez les *Bacterioides*. Les fonctions remplies par le T9SS sont différentes selon le type de bactérie : chez *Flavobacterium johnsoniae*, le T9SS est impliqué dans la motilité bactérienne par glissement en sécrétant la protéine d'adhésion Spr nécessaire au déplacement sur des surfaces solides. Chez *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie non motile et pathogène pour l'homme, le T9SS sert à sécréter des protéases, les gingipaines, qui participent à la virulence en dégradant les tissus des gencives, conduisant à des maladies parodontales (Leone et al., 2018).

### **Systèmes de sécrétion bactériens bactéricides**

Certaines espèces bactériennes possèdent un mécanisme qui permet la sécrétion d'une substance capable de tuer d'autres espèces. Selon la nature du système, l'effecteur bactérien peut être soit directement relâché ou excrété dans l'environnement ou au contraire, être injecté directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Il peut être bactériolytique ou bactériostatique en inhibant seulement la prolifération. Il existe diverses catégories de produits bactéricides décrits plus bas.

## **1.5.3 Les antibiotiques**

### **1.5.3.1 Généralités**

Les antibiotiques sont des molécules capables de tuer les bactéries sensibles ou d'inhiber leur croissance. Leur action étant spécifique et dirigée contre les bactéries, ils ne sont généralement pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Leur action peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de « bactériostatiques » alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits « bactéricides » (JF Perrin, 2009). Si, autrefois, les antibiotiques étaient issus de champignons et de bactéries, ils peuvent aujourd'hui être fabriqués par synthèse ou par ingénierie génétique.

Depuis la découverte de la pénicilline, le premier antibiotique, un nombre de composés ont été développés par la suite, et cliniquement utilisés pour le traitement des infections bactériennes. Cependant, peu de temps après le début de l' « ère antibiotique », un autre défi grave a surgi : l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le pipeline de nouveaux antimicrobiens est maintenant un défi particulier, et il y a donc un besoin urgent dans le développement de cibles, en particulier celles avec de nouvelles structures (Li et al., 2015). L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a publié récemment une liste « d'agents pathogènes

prioritaires» résistants aux antibiotiques, énumérant les 12 familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. Pour les raisons citées plus haut, *N. gonorrhoeae* y est listée.

### 1.5.3.2 Mécanismes d'action

Les cibles des antibiotiques sont impliquées tant dans les fonctions physiologiques que métaboliques de la bactérie (JF Perrin, 2009) (Figure 7). Les antibiotiques mettent en jeu des mécanismes d'une grande diversité en relation avec la variété de leurs structures chimiques et la pluralité des germes contre lesquels ils peuvent être appliqués.

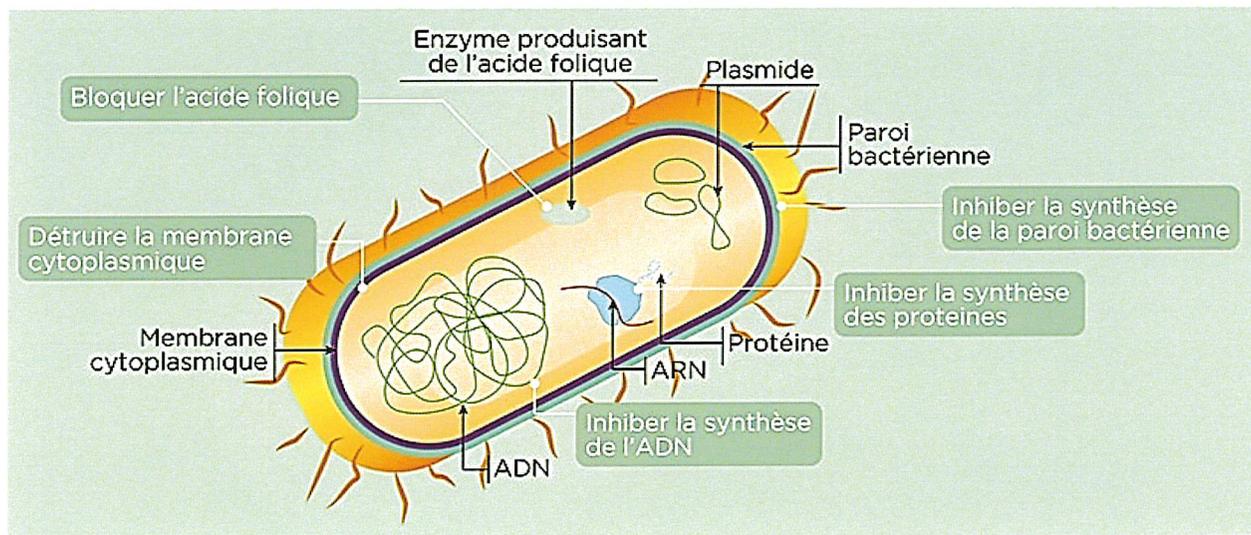


Figure 7. Mécanisme d'action des antibiotiques  
(Li et al., 2015).

Ainsi, en fonction de leur mécanisme d'action et leur cible intracellulaire, les antibiotiques peuvent agir soit par : (1) inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne ; (2) rupture de la membrane cellulaire ; (3) inhibition de la synthèse d'acide nucléique ; (4) action de façon indirecte sur une ou des voies métaboliques et (5) inhibition de la synthèse des protéines.

### 1.5.3.3 Mécanismes de résistance

La prévalence des infections bactériennes résistantes aux médicaments fait qu'il est crucial de comprendre les mécanismes de résistance aux médicaments développés par les microorganismes. La résistance antibactérienne se manifeste par une variété des processus biochimiques contrôlés génétiquement (résistance naturelle), développés soit par mutation des

gènes cellulaires intrinsèques, soit par l'acquisition de gènes de résistances des autres bactéries (résistance acquise). Les mécanismes biochimiques de résistance reposent sur la modification ou la surproduction de l'enzyme cible, la dégradation et/ou la modification chimique de l'antibiotique, la modification de la perméabilité membranaire et l'activation de pompes à efflux (Li et al., 2015).

## 1.6 ANTIBACTÉRIENS À BASE DE MÉTAL

Les médicaments à base de métaux et de métalloïdes jouent un rôle important dans l'histoire de la chimie médicinale. Le Salvarsan, un composé organoarsénique pour le traitement de la syphilis développé par Paul Ehrlich et ses collègues dans les années 1900, a été la première application réussie de complexes métalloïdes en chimiothérapie. Après un demi-siècle, une autre percée dans la découverte des propriétés antitumorales du cis-diamminedichloridoplatinum (II) (cisplatine) et de ses dérivés a ouvert la voie au développement ultérieur d'agents chimiothérapeutiques à base de métaux (Wong & Giandomenico, 1999). Une variété de complexes métalliques avec différents centres métalliques (principalement des éléments de métaux de transition) et des ligands de diverses structures a été synthétisée et étudiée pour leur activité biologique. En raison de leur gamme de géométries de coordination, les complexes métalliques fournissent une plus grande variabilité stéréochimique que ce qui s'observe avec les molécules organiques. À cet effet, ils introduisent souvent de nouveaux éléments de chiralité qui peuvent être importants pour la reconnaissance et l'interaction des molécules biologiques. Il a aussi été rapporté qu'une gamme de complexes de métaux de transition (y compris Ag, Au, Cu, Fe, Ir, Pt, Rh, Ru, Ti, etc.) lient l'ADN et l'ARN avec une affinité relativement élevée et beaucoup d'entre eux ont montré leur activité anticancéreuse (Garbutcheon-Singh et al., 2011; Haghdoost, Golbaghi, Létourneau, Patten, & Castonguay, 2017). En outre, un certain nombre de complexes de métaux de transition présentent une activité antimicrobienne telle que le nitrate d'argent et l'argent (I) sulfazine sont utilisés cliniquement pour le traitement de l'ophtalmie néonatale et des brûlures sévères, respectivement (Rafique, Idrees, Nasim, Akbar, & Athar, 2010). Les complexes d'argent avec les ligands donneurs d'oxygène présentent une activité antimicrobienne à large spectre (Bobbarala, 2012). Les complexes à base de ruthénium ont aussi été étudiés. Certains avaient montré une activité biologique significative. Outre leur action sur les cellules cancéreuses (Castonguay, Golbaghi, & Haghdoost; Haghdoost et al., 2017), ces complexes ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* et

*Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant) et des bactéries à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Mais leur activité antimicrobienne serait fonction de leur lipophilie et de la charge. Une série de médicaments anti-arthritiques à base d'or (I) a montré une inhibition contre *Pseudomonas putida*. Richards *et al.* ont trouvé qu'un complexe de fer-triple hélicase se liant à l'ADN chromosomique bactérien est bactéricide contre *E. coli* et *Bacillus subtilis* avec une CMI modérée (Richards, Rodger, Hannon, & Bolhuis, 2009). Ng *et al.* ont démontré que certains complexes de métallointercalceurs à base de cuivre (II) et de platine (II) pouvaient présenter une bonne activité antimicrobienne contre *S. aureus* (Ng *et al.*, 2013). De manière intéressante, certains des complexes de cuivre perméabiliseraient sensiblement la membrane bactérienne tandis que d'autres avaient peu d'effet (Ng *et al.*, 2013). En outre, une gamme de complexes métalliques (Mn, Fe, Co, Ni, Cu et Zn) contenant des ligands de base de Schiff ont montré une activité antimicrobienne modeste contre les bactéries et les champignons (Neelakantan, Esakkiammal, Mariappan, Dharmaraja, & Jeyakumar, 2010). Il existe également un groupe de complexes métalliques contenant des antibactériens existants comme ligands, appelés métallo-antibactériens qui présentent une activité antimicrobienne accrue, en particulier contre les souches bactériennes résistantes aux médicaments (Jaouen & Metzler-Nolte, 2010; Sekhon, 2010).

Il est donc clair que de nouveaux agents antimicrobiens sont nécessaires. Mais bien que la recherche se poursuive, on s'intéresse de plus en plus aux médicaments à base de métal (Bertrand, Doulain, Goze, & Bodio, 2016).

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

#### 2.1.1 Souches bactériennes

Dans ce projet, les souches utilisées proviennent de la collection du laboratoire de F. Veyrier et ont été stockées à -80 °C dans du milieu GCB ou LB avec du glycérol à 15 %. La conservation dans ces conditions permet de maintenir viables ces bactéries, à l'identique tout au long des expérimentations.

Dans la première partie du projet et qui concerne le volet naturel, des souches issues de la collection de l'Institut Pasteur à Paris et de la famille des *Neisseriaceae* (LNP 16475 et LNP 18695) reconnues comme ayant une activité bactéricide sur *N. meningitidis* ont été employées et la souche LNP 22785 n'ayant aucune activité bactéricide connue a servi de contrôle négatif. Ces souches de *Neisseria* sont connus pour être sensibles à l'érythromycine et à l'acide nalidixique (antibiotiques qui ont été utilisés dans l'étude comme témoin positif).

La souche de *N. meningitidis* utilisée tout au long de cette étude est une souche possédant un système de biomarqueur bioluminescent. En effet, le gène *luxABCDE* a été intégré à la souche sauvage, sous le contrôle du promoteur du gène *pilE*. Ainsi, la souche émet naturellement des photons qui sont mesurés par un luminomètre (modèle de PerkinElmer Wallac 1420 Victor<sup>3</sup>). Cet appareil permet de mesurer en coup par seconde (CPS) la lumière émise par la bactérie dans les puits. Conséquemment, le nombre de photons émis est proportionnel à la quantité de bactéries vivantes qui croissent (Guiddir, Deghmane, Giorgini, & Taha, 2014).

Dans la seconde partie relative au volet chimique, les souches utilisées sont les suivantes : *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. elongata*, *N. sicca*, *N. lactamica*, *Kingella oralis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant, *Citrobacter rodentium*, *Yersinia enterocolitica* et *Mycobacterium smegmatis*. (Tableau 2)

**Tableau 2. Différentes souches bactériennes et milieux de culture utilisés**

Espèces bactériennes	Référence de la collection	Provenance	Milieu de culture et T° d'incubation
<i>Neisseria meningitidis</i>	LNP24198	CNRM, Institut Pasteur, Paris	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria cinerea</i>	LNP18695	CNRM, Institut Pasteur, Paris	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria perflava</i>	LNP16475	CNRM, Institut Pasteur, Paris	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	LNP16626	CNRM, Institut Pasteur, Paris	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23970	American Type Culture Collection	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria elongata subsp glycolytica</i>	ATCC 29315	American Type Culture Collection	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Neisseria sicca</i>	ATCC 29256	American Type Culture Collection	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Kingella oralis</i>	ATCC 51147	American Type Culture Collection	Gélose GCB avec supplément de Kellogg, 37 °C
<i>Moraxella catarrhalis</i>	LNP 18103	CNRM, Institut Pasteur, Paris (M.K. Taha)	Milieu Luria-Bertani, 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> méthicillino-résistant	ATCC 33592	American Type Culture Collection	Milieu Luria-Bertani, 37 °C
<i>Citrobacter rodentium</i>	DBS100	Université McGill (Hervé le Moual)	Milieu Luria-Bertani, 37 °C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM-23249	Collection Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Milieu Luria-Bertani, 37 °C
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MC2 155		Milieu 7H9, 7H10 ou milieu Luria-Bertani, 30 °C

Nonobstant les deux volets, la mesure de la densité optique s'est faite à 600 nm ( $DO_{600}$ ) et a été mesurée grâce au spectromètre « Biochrom Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer » de la marque Biochrom avec des cuvettes de capacité 10 x 4 x 45 mm.

### **2.1.2 Préparation des milieux de culture utilisés : GCB, LB, 7H9 et 7H10**

Tous les milieux sous forme de poudre hygroscopique ont été préparés au laboratoire suivant les instructions du fabricant (Oxoid), qu'il s'agisse de la base des géloses GCB, LB, 7H9 ou 7H10.

#### **2.1.2.1 GCB (*Gonococci agar*)**

Le milieu couramment utilisé pour cultiver les bactéries des genres *Neisseria* et *Moraxella* est le milieu GCB. Il s'agit d'une préparation de 1 L, pour milieu solide, et qui contient 5.0 g de chlorure de sodium, 15.0 g de protéose peptone, 4.0 g de dipotassium phosphate, 1.0 g de phosphate de potassium, 1.0 g d'amidon de maïs et 10.0 g d'agar. La poudre est dissoute dans une quantité d'eau (selon la quantité de milieu à préparer) distillée puis autoclavée. Avant son utilisation, des suppléments sont ajoutés : 1 % de supplément 1 (contenant pour une quantité de 520 mL, 208 g de glucose, 5.2 g de L-glutamine et 10.4 g de pyrophosphate chloride) et 0,1 % de supplément 2 (contenant pour une préparation de 60 mL, 300 mg de nitrate ferrique nonahydraté). Ces suppléments servent à enrichir le milieu et, de ce fait, permettent la croissance des bactéries. Ensuite, le mélange est réparti dans des boîtes de Pétri stériles puis conservées à 4 °C. Une foisensemencées, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C, avec 5 % de  $CO_2$ , pendant 24-48 heures en fonction de la souche mise en culture. Sans agar, cette préparation dans les mêmes conditions a permis d'obtenir le milieu GCB liquide.

#### **2.1.2.2 LB (*Luria-Bertani*)**

Le milieu LB a été utilisé pour la croissance des *MRSA*, *Citrobacter*, *Yersinia enterocolitica* et parfois de *Mycobacterium smegmatis* (à défaut d'utiliser les milieux plus appropriés 7H9 ou 7H10). Ce milieu solide est préparé pour une quantité de 1 L et contient 10.0 g de tryptone, 5.0 g d'extrait de levure, 10.0 g de chlorure de sodium et 15.0 g d'agar. Sans ce dernier, la préparation aboutit à un milieu LB liquide. Ce milieu ne nécessite aucun ajout de suppléments.

#### **2.1.2.3 Milieux 7H9 ou 7H10**

Ces milieux ont été utilisés pour la culture de *Mycobacterium smegmatis*. Pour une quantité de préparation de 1 L, ce milieu liquide contient 1 g de phosphate de mono potassium, 2.5 g de

phosphate di sodique, 500 mg d'acide L-Glutamique, 100 mg de citrate de sodium, 40 mg de citrate ferrique d'ammonium, 50 mg de sulfate de magnésium, 1 mg de sulfate de zinc, 1 mg de sulfate de cuivre, 0.5 mg de chlorure de calcium, 0.5 mg de vitamine B6 et 500 mg de di-ammonium phosphate. Ce milieu requiert, pour le même volume, l'ajout de 2.5 mL de glycérol 80 % et de 0.5 mL de Tween 80. Après stérilisation à l'autoclave, un supplément d'OADC (50 mL) est ajouté de manière stérile pour enrichir le milieu. Par contre la préparation du milieu solide 7H10 requiert l'ajout, de 6.25 mL de glycérol 80 % et de 50 mL du supplément OADC, avant de couler le milieu dans des boîtes de Pétri stériles.

## **2.2 RECHERCHE DE COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS NATURELS**

Les souches de la famille des *Neisseriaceae* issues de la collection de l'Institut Pasteur (dont LNP 16475 et LNP 18695) initialement mutées par UV/composé mutagène ont été mises en contact avec la souche luminescente de *N. meningitidis* en vue de rechercher des mutants ayant perdu leur activité. La détection de la lumière suggérait qu'étant donné que *N. meningitidis* était capable de croître qu'il pourrait s'agir probablement d'un clone dont il serait nécessaire de comprendre le mécanisme moléculaire lié à la perte du pouvoir bactéricide.

### **2.2.1 Mutations aléatoires**

#### *2.2.1.1 Mutagenèse aléatoire à l'aide des ultra-violets (UV)*

##### **2.2.1.1.1 Principe**

En particulier, du point de vue sécuritaire, les UV sont préférables. Cependant, le spectre des mutations obtenues avec les UV ne permet pas toujours d'obtenir des résultats escomptés. De même, certains organismes sont très résistants aux traitements avec des UV ou alors sont déficitaires du système de réparation de type SOS (Black et al., 1998; Campbell & Yasbin, 1984). C'est à ce moment que les mutagènes chimiques sont utilisés, nécessitant des conditions draconiennes de leur utilisation dans des pièces sécurisées. Pour que ce traitement au mutagène soit efficace, il faudrait que de nombreuses mutations soient produites. Les mutations apparaissant de façon aléatoire dans le génome, beaucoup d'entre elles vont toucher des gènes essentiels et donc après le traitement le taux de survie diminuerait fortement.

Les mutations obtenues avec ce type de traitement sont le plus souvent ponctuelles. Elles peuvent inactiver le gène, modifier son fonctionnement en augmentant son expression. Ce type de mutagenèse permet donc d'obtenir des mutations qui ont un large éventail d'effets.

#### **2.2.1.1.2 Protocole**

Initialement, l'étude a été faite sur l'effet des rayonnements UV sur la population de ces deux souches bactériennes (LNP 16475 et LNP 18695) : 100 µL d'inoculum (à DO600 = 0,05) des souches d'intérêts ont été étalés sur le milieu gélosé GCB puis exposés aux UV à différents temps (du temps 0 au temps 25 minutes). En fonction des temps d'exposition, des dilutions ont été effectuées en triplicata afin de permettre le dénombrement des bactéries. Par la suite, les boîtes ont été incubées à 37 °C, avec une atmosphère enrichie à 5 % en CO<sub>2</sub>. Après une nuit d'incubation, les colonies ont été dénombrées.

#### *2.2.1.2 Mutagenèse classique avec un agent chimique mutagène*

##### **2.2.1.2.1 Principe**

Le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) est un composé organique mutagène, tératogénique et présumé cancérigène, de formule CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>. Il produit des mutations génétiques aléatoires par substitutions de nucléotides. Il s'agit généralement de mutations ponctuelles qui apparaissent à une fréquence de l'ordre de 5×10<sup>-4</sup> à 5×10<sup>-2</sup> par gène. Le groupement éthyle de l'EMS réagit avec la guanine de l'ADN, formant une base anormale, l'O-6-éthylguanine. Durant la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase apparie fréquemment une thymine à la place d'une cytosine en complément de la O-6-éthylguanine. À la suite d'une série de réplifications de l'ADN, la paire de bases originale G:C peut devenir A:T.

##### **2.2.1.2.2 Protocole de mutation avec l'EMS**

Pour de meilleurs rendements, le protocole ci-dessous a été modifié à partir du « Basic protocol 6 chemical mutagenesis » (Black et al., 1998).

Les souches de *Neisseria* sp. LNP 18695 et 16475 ont été décongelées et mises en culture sur le milieu GCB agar puis incubées à 37 °C, avec 5 % CO<sub>2</sub>, pendant 24 heures. Puis, à l'aide d'un écouvillon stérile ou un manche de Koch, un inoculum est réalisé avec le GCB liquide supplémenté à DO<sub>600</sub> = 0,2 pour un volume de 10 mL de chaque souche. Une quantité de 1 mL est répartie dans 10 tubes et dans chaque tube, 30 µL du composé mutagène sont ajoutés. L'exposition au composé est réalisée pendant 40 minutes (ce temps a été déterminé après avoir observé la remontée dans la croissance bactérienne suite à l'exposition au composé). À

l'issue de cette exposition/contact, le tube est centrifugé pendant 2 minutes à 9 000 tours, le surnageant enlevé et le culot re-suspendu dans 1 mL de GCB liquide supplémenté avec 15 % de glycérol a été congelé à - 80 °C.

### 2.2.1.2.3 Test de survie en présence d'EMS

#### ❖ Méthode de dénombrement des colonies

Un des 10 tubes de cette suspension bactérienne exposée au composé mutagène a servi pour les manipulations du jour et les autres étaient conservés à -80 °C. Pour le tube du travail, des dilutions en série ont été réalisées et un volume de 50 µL était ensemencé sur des boîtes de GCB avec et sans acide nalidixique. L'expérience est réalisée en triplicata pour la reproductibilité des résultats. L'acide nalidixique dans ce cas nous a servi de milieu de contrôle de mutation.

Les différentes boîtes étaient par la suite mises à incuber, à 37 °C, avec une atmosphère enrichie de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le dénombrement des colonies était effectué dans les 18-24 heures afin de déterminer le taux de survie/mutations des bactéries.

#### ❖ Mesure de la luminescence

À chaque manipulation, un tube contenant la souche d'intérêt mutée, la souche luminescente de *N. meningitidis*, les souches sauvages LNP 18695 ou 16745 (témoins positifs) ainsi que la souche servant de témoin négatif 22785 étaient décongelés et mises en culture la veille sur des boîtes gélosées de GCB puis ensuite incubées à 37 °C pendant une nuit sous 5 % de CO<sub>2</sub>.

Le test pour la recherche de la luminescence était effectué dans une plaque de 96 puits contenant 180 µL du milieu gélosé GCB. Et chaque puit avait servi de support à une co-culture différente où étaient mis en contact la souche luminescente de *N. meningitidis* et les colonies potentiellement mutantes et les témoins. À l'aide d'un embout de pipette stérile, une colonie mutante était récupérée et re-suspendue dans 100 µL de l'inoculum de *N. meningitidis*. Après mélange de ces deux bactéries, 20 µL étaient ensuite transférés sur des plaques 96 puits blanches contenant du milieu gélosé de GCB. Ces plaques étaient incubées à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> et la mesure par luminométrie était réalisée à différents temps de croissance (temps T= 0 heure, 4 heures, 16 heures et 24 heures). Le luminomètre utilisé était le modèle de PerkinElmer Wallac 1420 Victor<sup>3</sup>.

Les clones ayant potentiellement perdu leur pouvoir bactéricide (puits avec lumière) étaient testés de nouveau : ils étaient mis en culture sur milieu gélosé de GCB contenant l'érythromycine à

une concentration de 3 µg/ml (antibiotique qui à cette concentration tue *Neisseria meningitidis* mais pas les autres *Neisseria*) et incubés à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Ils étaient ensuite re-testés. La persistance du phénotype confirmait qu'il s'agissait d'un clone intéressant pour lequel l'étape suivante aurait consisté à réaliser dessus des analyses moléculaires comme le séquençage de son génome.

## 2.3 RECHERCHE DE COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS SYNTHÉTIQUES

### 2.3.1 Composés synthétiques

Cette étude a été faite en collaboration avec le laboratoire de chimie de l'INRS-Institut Armand Frappier, qui nous a fourni deux types de bibliothèques : la première bibliothèque provenant du laboratoire du Dr Laplante était constituée de 2 000 molécules qui sont de types « fragments » et la seconde bibliothèque provenant du Dr Castonguay était constituée d'une trentaine de molécules dites organométalliques.

Ces composés testés sur nos différentes souches bactériennes pouvaient avoir soit une activité bactéricide ou une activité bactériostatique permettant ainsi de déterminer respectivement leur CMI et leur CMB.

Les composés de type fragments, en solution, étaient disponibles prêts à l'emploi dans du DMSO (100X). Par contre, les molécules de type organométalliques en poudre, étaient solubilisées dans du DMSO, avant les manipulations subséquentes afin de garantir leur stabilité.

Le projet visait donc à rechercher un composé bactéricide actif capable de tuer 99,9 %, de manière spécifique et sélective, les deux souches pathogènes de *Neisseria*.

### 2.3.2 Criblage de composés actifs sur *N. meningitidis*

La souche luminescente de *N. meningitidis* a été mise en contact, dans une plaque de 96 puits blanche à fonds plats, avec les différentes bibliothèques de composés (fragments et organométalliques) à 100 µM. Un volume de 1.8 µL de composés (100X) ainsi que les contrôles ont été déposés dans chacun des puits de la plaque de 96 puits et un inoculum de 180 µL à DO<sub>600</sub> de 0,01 de *N. meningitidis* a été rajouté. Après une incubation de 16 heures à 37 °C, la croissance était mesurée avec le luminomètre (PerkinElmer Wallac 1420 Victor<sup>3</sup>). La plaque

était visualisée en fonction des unités relatives de lumière (URL) via une échelle artificielle colorée logarithmique. Des contrôles positif (érythromycine à 3 µg/mL) et négatif (DMSO) ont été aussi inclus. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

### **2.3.3 Mesure de la concentration minimale inhibitrice**

De la même façon que précédemment, la veille de la manipulation, la souche luminescente de *N. meningitidis* était mise en culture sur milieu gélosé GCB à 37 °C, avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, selon une échelle décroissante de concentrations des composés (allant de la plus forte à la plus petite), un volume de 1,8 µL de composés (100X) ainsi les contrôles ont été déposés dans la plaque 96 puits. Un inoculum de 180 µL de DO<sub>600</sub> de 0,01 de *N. meningitidis* a été rajouté dans chacun des puits. Après une incubation de 16 heures à 37 °C, la croissance a été mesurée avec le luminomètre (PerkinElmer Wallac 1420 Victor<sup>3</sup>). Des contrôles positif (avec l'érythromycine à 3 µg/mL) et négatif (DMSO) ont été aussi inclus. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Une courbe de croissance a été générée et la concentration minimale inhibitrice (la plus petite concentration suffisante pour inhiber la croissance, c'est-à-dire la valeur équivalente au bruit de fond obtenu avec l'érythromycine) a été détectée.

### **2.3.4 Mesure de l'effet bactéricide**

Le principe consistait à mettre en contact dans une plaque stérile de 96 puits, les inocula des souches bactériennes avec les composés pendant trois heures à 37 °C et de procéder par la suite à des dilutions en série et ensemencements sur milieu gélosé GCB.

Ainsi, les souches de la famille des *Neisseriaceae* ainsi que les souches bactériennes servant de contrôle étaient mises en culture et incubées la veille sur milieu gélosé GCB ou LB/7H9 selon les souches correspondantes. Le lendemain, des inocula réalisés à une OD<sub>600</sub> de 0,05 pour les souches à croissance rapide et 0,1 pour la souche de *M. smegmatis* (croissance lente) étaient mis en contact avec les composés à 50 µM suivant la CMI de la souche de référence (souche luminescente de *N. meningitidis*) dans une plaque stérile de 96 puits. Hormis les composés à tester, les deux dernières colonnes de la plaque étaient occupées par les contrôles positifs (érythromycine à 3 µg/mL ou kanamycine à 25 µg/mL pour *M. smegmatis*) et le contrôle négatif (DMSO). Après un temps de contact de trois heures et une incubation à 37 °C ou 30 °C, des dilutions en série (10<sup>0</sup> à 10<sup>-8</sup>) étaient réalisées et une quantité de 50 µL était ensemencée sur les milieux gélosés appropriés. Les boîtes étaient ensuite laissées sécher puis mises dans

l'incubateur pour le dénombrement au bout de 48 heures ou 1 semaine (*M. smegmatis*) suivant les souches bactériennes. Toutes ces expériences ont été réalisées en triplicata.

Les UFC (unité formant des colonies) ont été comptées. La quantité de bactéries (UFC/ml) a été calculée suivant le nombre des colonies ayant poussé sur le milieu divisé par le volume de solution ensemencé et multiplié par facteur de dilution. Le pourcentage de survie représentait, quant à lui, la quantité de bactéries (UFC/ml) divisée par la valeur du DMSO.

### **2.3.5 Recherche des mutants de *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae* capables de résister à des concentrations plus faibles de composés**

La recherche de mutants a consisté à isoler une colonie bactérienne ayant échappé à l'action du composé bactéricide actif trouvé. Cependant, bien que l'obtention de la mutation (mutation spontanée) soit longue, plusieurs tentatives ont été effectuées en agissant sur les concentrations des composés. Ainsi, cette recherche avait eu lieu dans deux types de milieux : milieu solide gélosé et milieu liquide dans une plaque 96 puits blanche.

#### **2.3.5.1 Recherche en milieu gélosé**

À partir du composé bactéricide actif trouvé, une gamme de milieu gélosé contenant différentes concentrations du composé allant de 300  $\mu\text{M}$  à 18,75  $\mu\text{M}$  a été préparée.

Avec la culture bactérienne de *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae* réalisée la veille, et mise en incubation à 37 °C sous 5 % de  $\text{CO}_2$ , une solution bactérienne à  $\text{DO}_{600}$  égale à 1 était réalisée. Par la suite, une série de dilution (pure,  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ) a été réalisée sur des boîtes de gélose GCB contenant différentes concentrations du composé en étalant 100  $\mu\text{L}$  de la suspension. Ces boîtes étaient ensuite incubées à 37 °C sous 5 % de  $\text{CO}_2$  pour être lues après 18-36 heures selon la croissance et la visibilité des colonies.

Une ou plusieurs colonies isolées étaient repiquées sur milieu gélosé de GCB à la même concentration du composé ayant généré ces isolats et sur un milieu gélosé de GCB sans composé. Ceci était réalisé pour confirmer la survie et la viabilité de la souche bactérienne à cette concentration. Une colonie dont l'apparition persistait à cette concentration était soumise à des concentrations plus élevées que sa concentration initiale.

#### **2.3.5.2 Recherche sur milieu liquide**

Les clones potentiels conservés dans du glycérol à -80 °C étaient remis en culture sur milieu GCB gélosé. Puis les colonies isolées de cette culture de la veille étaient mises en contact dans

une plaque stérile de 96 puits de PCR à des différentes concentrations du composé allant de la CMI à la plus forte concentration. Ainsi une quantité de 100  $\mu\text{L}$  d'inocula de ces colonies à  $\text{DO}_{600}$  de 0,05 et de la souche sauvage luminescente de *N. meningitidis* était mis dans chaque puits dans lequel était rajouté 1  $\mu\text{L}$  du composé actif en respectant les concentrations telles qu'indiquées ci-haut. Toutes ces manipulations étaient réalisées en triplicata et le niveau de luminescence était déterminé à l'aide du luminomètre de Wallac dans les 8 heures suivant l'incubation à 37 °C sous 5 % de  $\text{CO}_2$  pour évaluer la survie des mutants face à des concentrations croissantes du composé.

# CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

## 3.1 APPROCHE NATURELLE : CRIBLAGE DES BACTÉRIES

### 3.1.1 Étude antérieure : choix des souches bactériennes bactéricides

Pour générer des souches bactériennes mutées ayant perdu leur pouvoir bactéricide, nous étions partis des résultats d'une étude antérieure basée sur le criblage d'une centaine de bactéries provenant de la famille des *Neisseriaceae*.

Différentes souches bactériennes de la famille des *Neisseriaceae* avaient été mises en co-culture pendant 18-24 heures à 37 °C, avec la souche de *Neisseria meningitidis* ayant un gène de résistance à la kanamycine. Le lendemain, il a été réalisé une subculture sur un milieu gélosé incorporé de kanamycine. Le test avait consisté à récupérer les colonies ayant résisté à l'action de la kanamycine. Et de cette étude, deux souches ayant une activité bactéricide sur la souche de *N. meningitidis* ont été mises en évidence: il s'agit des souches LNP 16475 et LNP 18695 (Figure 8).

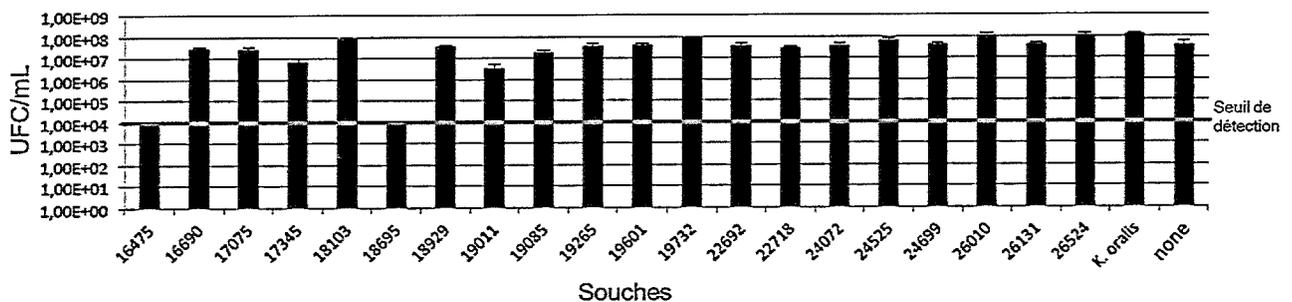


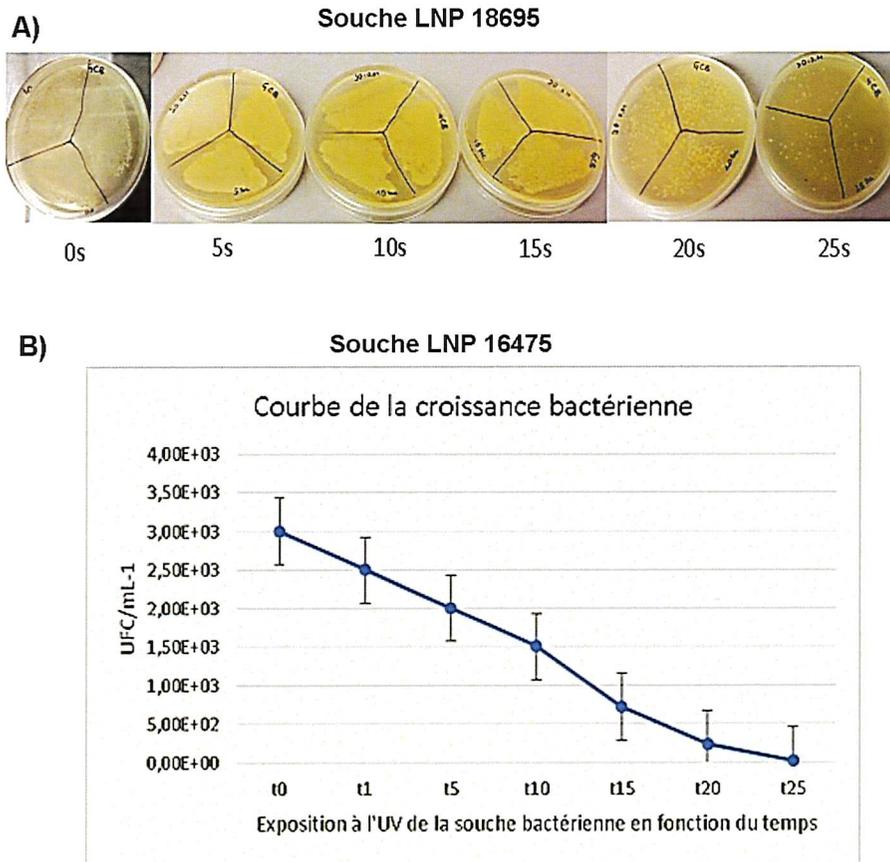
Figure 8. Recherche de l'activité bactéricide des souches de *Neisseria* après criblage

Cette figure représente la mesure de la survie de *Neisseria meningitidis* (par comptage d'UFC) en fonction des souches mises en co-culture. Deux souches (16475 et 18695), en effet, ont montré une activité bactéricide reproductible et robuste contrairement aux autres souches. La ligne rouge correspond à la limite de détection.

### **3.1.2 Banque des mutants**

#### **3.1.2.1 Mutagénèse physique par UV**

Nous avons tout d'abord essayé de générer une banque de mutants aléatoires grâce à l'induction d'erreur lors de la réparation de l'ADN après un stress aux UV. Dans un premier temps, nous avons mesuré la survie des deux souches après une exposition aux UV (Figure 9). Ensuite, nous avons utilisé les clones obtenus avec le temps d'exposition  $t$  correspondant à environ 20 % de survie. Ces clones ont été mis en co-culture avec *N. meningitidis* à la recherche de mutants ayant perdu leur activité bactéricide. Malgré plusieurs tentatives (environ 2000 clones testés), les résultats n'ont pas été concluants. Le nombre de colonies visualisées après exposition (Figure A et B), pour les deux souches, diminuaient au fur et à mesure que la durée d'exposition aux UV augmentait. Nous avons donc conclu que, comme la majorité des *Neisseria*, ces souches étaient aussi dépourvues de système de réparation SOS de l'ADN et qu'il ne serait donc pas possible d'obtenir de mutants par cette méthode comme c'est le cas pour *N. gonorrhoeae* (Black et al., 1998; Campbell & Yasbin, 1984). C'est la raison pour laquelle la mutagenèse par agent chimique mutagène a été proposée et adoptée dans ce premier volet.



**Figure 9. Photographie de la souche de LNP18695 ensemencée sur des géloses GCB (A) et courbe de croissance de LNP16475 (B) après exposition à l'UV à différents temps**

### 3.1.2.2 Mutagenèse chimique (composé mutagène)

Nous avons préalablement effectué le dénombrement des colonies ayant survécu à l'incubation avec de l'EMS 1 % en fonction du temps d'exposition des souches d'intérêt au composé mutagène. Nous avons ensuite déterminé le temps d'exposition « t » correspondant à environ 20 % de survie. La figure 10 présente la courbe de survie en fonction du temps d'exposition. Nous avons donc déterminé que la durée d'exposition optimum était de 10 minutes.

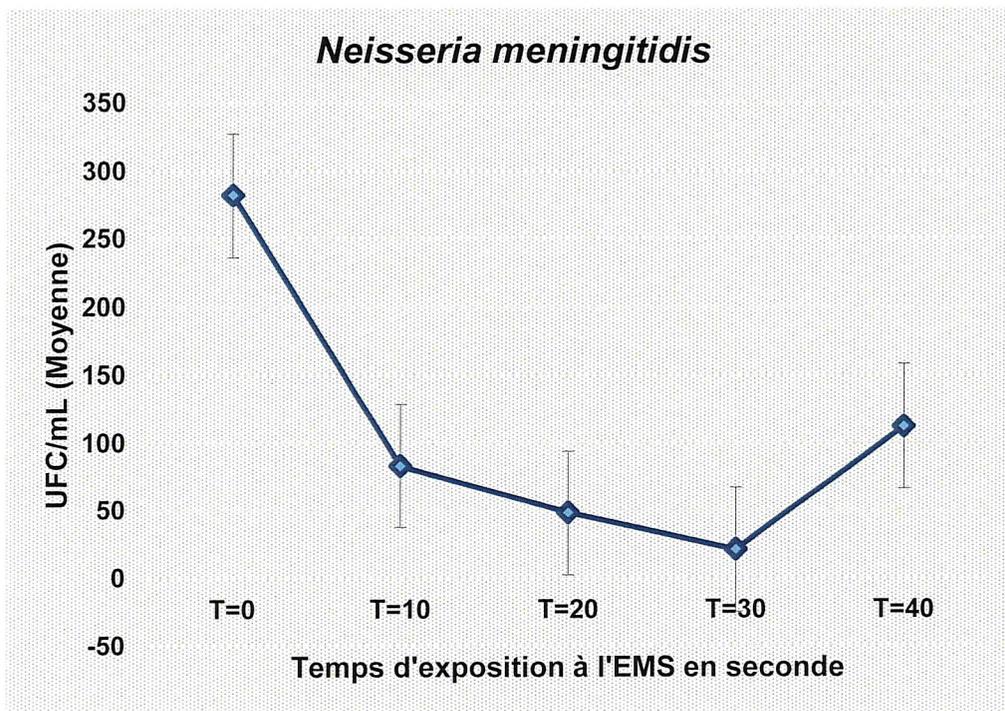


Figure 10. Courbe de survie de *Neisseria meningitidis* aux différents temps d'exposition à l'EMS

Nous avons ensuite déterminé le taux de survie/mutation sur milieux gélosés GCB avec et sans acide nalidixique (milieu de contrôle de la mutation). En effet, la résistance à l'acide nalidixique peut être facilement acquise grâce à des mutations ponctuelles dans GyrB. Si le composé mutagène fonctionnait, nous nous attendions donc à un plus grand taux de survie après exposition à l'EMS. La figure 11 présente le taux de survie en présence d'acide nalidixique pour les cultures ayant ou non subi une mutagenèse à l'EMS. Nous voyons ici que ce taux est bien plus important lorsque les bactéries ont été en contact avec l'EMS.

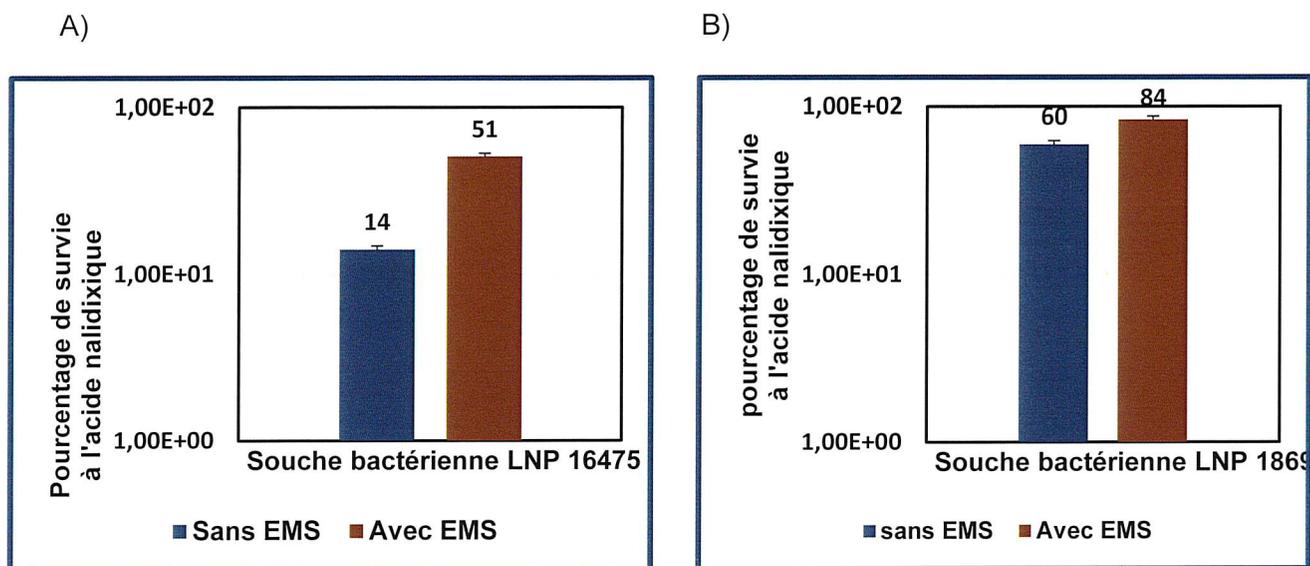
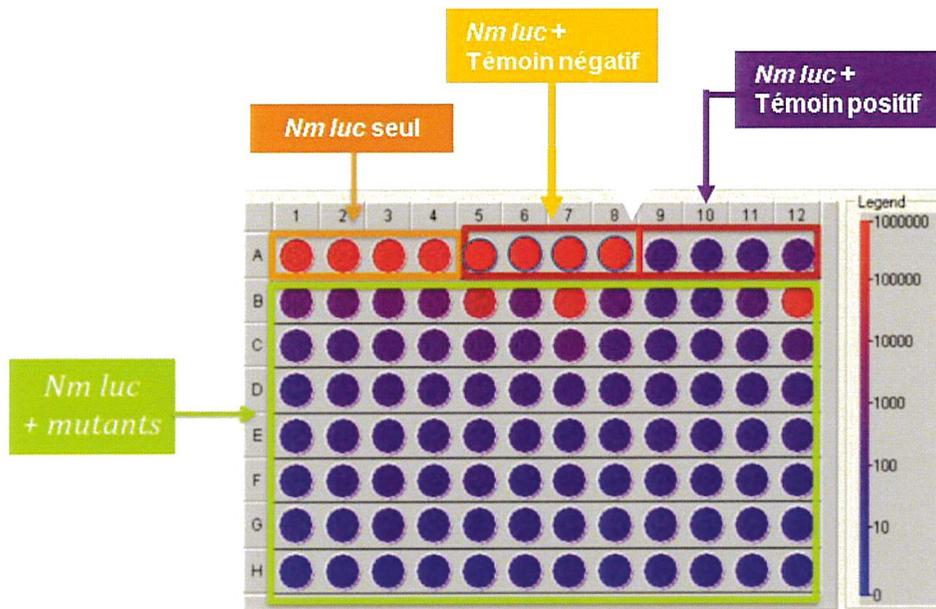


Figure 11. Pourcentage de survie de la souche LNP 16475 (A) /18695 (B) avant et après exposition à l'EMS et avec et sans acide nalidixique

Ainsi, la figure représente le ratio de survie des souche LNP 16475 (A) et LNP 18695 (B) en présence et en absence du composé mutagène. Sachant qu'en temps normal, en présence de l'acide nalidixique, le développement des colonies est moindre, nous avons observé qu'en présence de l'EMS, le ratio de survie a été respectivement de 51 % et 84 % pour les souches LNP 16475 et LNP 18695. Ces valeurs ont permis de constater que la stratégie de mutation a fonctionné ; les deux souches ont été effectivement mutées.

#### ❖ Mesure de la luminescence

La mutagenèse chimique des deux souches (LNP 16475 et LNP 18695) avait permis de générer des banques de clones mutés qui par la suite avaient été mises en co-culture avec une souche luminescente de *Neisseria meningitidis*. Après 16 heures de contact, avec le luminomètre PerkinElmer Wallac 1420 Victor<sup>3</sup>, la recherche de la luminescence était effectuée (voir Figure 12).



**Figure 12. Représentation schématique de la mesure de la luminescence**

Tel qu'ainsi représenté schématiquement sur cette plaque 96 puits blanche, dans certains puits, une luminescence a été observée. Et la présence de cette luminescence nous laisserait croire que la souche mutée avait perdu sa capacité à tuer la souche de *Neisseria meningitidis*. Plusieurs essais avaient été réalisés (environ 2000 clones), mais aucun n'a permis encore d'isoler des clones ayant perdu totalement leur activité bactéricide. Ceci nous a amené à penser que soit la méthodologie utilisée n'était pas bonne, soit les voies de synthèses de l'agent bactéricide étaient essentielles à la croissance et donc non-mutables. Toutefois, les recherches sont encore en cours.

## 3.2 APPROCHE CHIMIQUE : CRIBLAGE DES MOLÉCULES

### 3.2.1 Découverte de nouveaux composés antibactériens

Comme décrit dans la partie « Matériel et méthodes », deux bibliothèques de composés provenant de différentes sources (Dr Laplante et Dr Castonguay) ont été testées à la recherche de leur activité sur la croissance de la souche luminescente de *Neisseria meningitidis* à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et pendant 16 heures de temps de contact. L'indicateur de croissance (mesure de la luminescence) était mesuré dans une plaque 96 puits blanche et en utilisant le luminomètre de Wallac.

De cette façon, les résultats obtenus avaient montré que certains composés testés à 100  $\mu\text{M}$ , après 16 heures de contact, se sont avérés actifs sur la croissance de *Neisseria meningitidis* tel que vu dans l'encadré vert de la figure 13. Leur activité était semblable à celle observée pour le contrôle positif l'érythromycine.

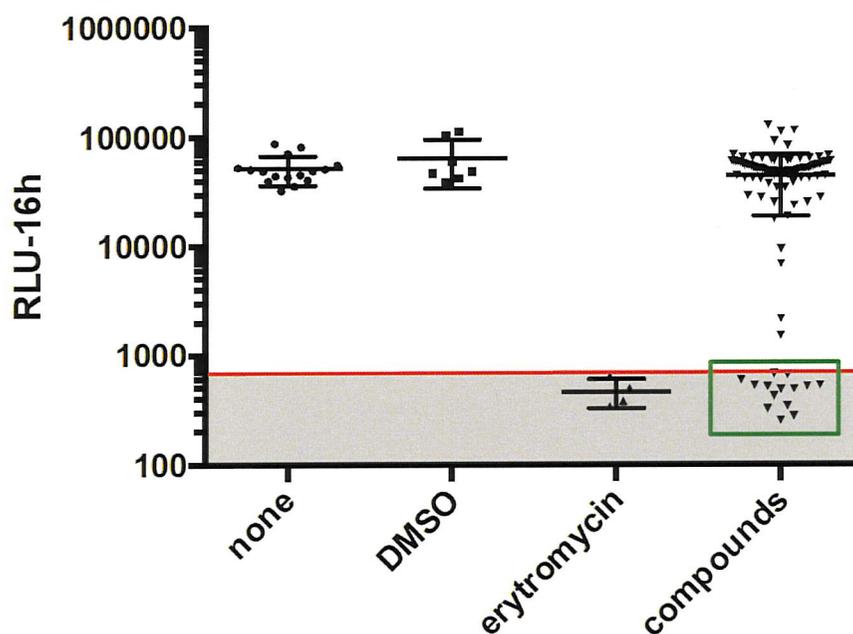


Figure 13. Activité des composés testés à 100  $\mu\text{M}$  sur la croissance de la souche luminescente de *Neisseria meningitidis*

La figure illustre les composés actifs sur la souche luminescente de *N. meningitidis* lorsque testés à 100  $\mu$ M et dont l'activité est semblable à celle de l'érythromycine (contrôle positif).

Nous avons ainsi répertorié dans le tableau 2, les divers composés actifs. Cependant, ce test ne permet nullement de faire une différence entre ceux ayant une activité bactéricide ou une activité bactériostatique seulement. Ainsi d'autres tests ont été réalisés. La nature de ces composés, pour raison de confidentialité, ne peut être divulguée (demande de brevet provisoire : 62/730,062).

**Tableau 3. Répertoire des composés ayant une activité similaire au témoin positif (érythromycine)**

<b>Composés</b>	<b>URL (+/- écart type)</b>
DMSO	65618 (+/- 5347)
Erythromycine (4 $\mu$ M)	503 (+/-107)
B02	212 (+/- 14)
AnI-3	275 (+/-29)
AnII-3	524 (+/- 13)
AnII-4	515 (+/- 69)
AnII-6	479 (+/- 59)
AnII-10	528 (+/- 42)
AnII-12	253 (+/- 64)
AnII-13	341 (+/- 92)
AnII-14	418 (+/- 202)
AnII-16	586 (+/- 203)
AnII-18	658 (+/- 45)
AnII-20	484 (+/-27)
AnII-21	319 (+/- 19)
AnII-22	512 (+/- 162)

### 3.2.2 Détermination du type d'activité et de la spécificité des composés actifs sur d'autres souches

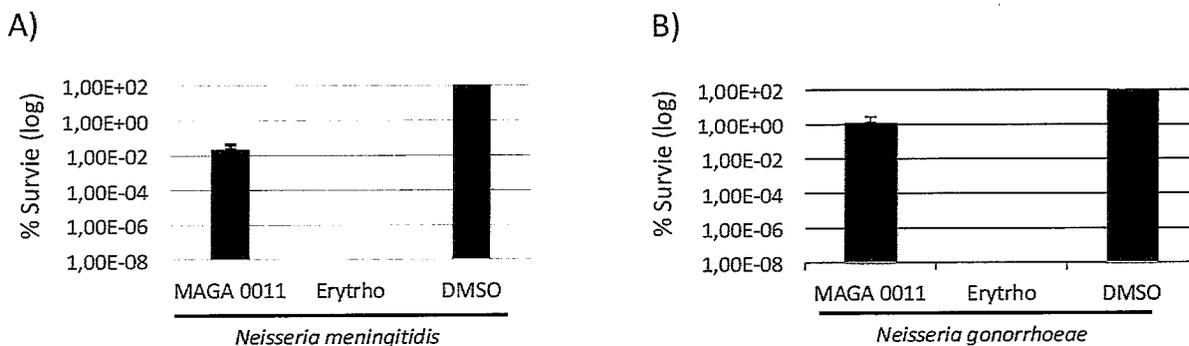
#### 3.2.2.1 Librairie des fragments de molécules

##### 3.2.2.1.1 Composé B02 (aussi appelé MAGA 0011)

###### ❖ Activité sur *Neisseria meningitidis*

En vue d'obtenir un composé qui soit non seulement sélectif mais aussi spécifique aux deux souches pathogènes de *Neisseria*, nous avons testé l'activité bactéricide ou bactériostatique par dénombrement des colonies (UFC). Les composés ont été mis en contact avec les inocula des souches bactériennes pendant 3 heures sur plaque stérile de PCR de 96 puits. Et après cette période d'incubation et dilution, un ensemencement était réalisé sur boîtes de gélose GCB par la suite incubées à 37 °C pendant 18-24 heures selon la croissance de la souche mise en culture.

Testée à 50 µM sur la souche luminescente de *Neisseria meningitidis*, une activité du composé importante a été observée. En présence du composé, le taux de survie a été estimé à 0,01 % tel qu'observé sur la figure 14 (A). L'activité est donc bactéricide.



**Figure 14. Pourcentage de survie de *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* après 3 heures de contact avec le composé MAGA0011 à 50 µM**

Cette figure représente le pourcentage de survie de la souche de *N. meningitidis* A) et *N. gonorrhoeae* B) au composé B02 (MAGA0011) par rapport au DMSO : le taux de survie était respectivement de l'ordre de 0,01 % et 1 %.

###### ❖ Activité sur *Neisseria gonorrhoeae*

Hormis la souche de *N. meningitidis*, l'activité du composé B02 a été aussi testée sur la souche de *Neisseria gonorrhoeae*. Ainsi, après 3 heures de contact à 37 °C et une concentration de 50 µM, le taux de survie de la bactérie observé sur la figure 14 (B) a été de 1 %. Ainsi, encore sur

cette souche, l'activité du composé a été aussi bactéricide. Malgré tout, *N. gonorrhoeae* semble être moins sensible que *N. meningitidis*.

Au vu des résultats du composé B02 sur les souches pathogènes de *Neisseria*, et pour optimiser l'activité du composé, l'équipe de chimistes a ainsi modifié sa structure et a généré des composés similaires dont l'activité a été aussi testée sur ces bactéries.

#### **3.2.2.1.2 Molécules modifiées à partir du composé B02**

##### ❖ Activité sur la souche luminescente de *Neisseria meningitidis*

Divers composés issus du précurseur B02 (MAGA 0011) ont été testés à 50  $\mu$ M, après un temps de contact de 3 heures et à 37 °C sur *Neisseria meningitidis*. Les résultats sont présentés sur la figure 15 (A). Un des composés qui semblait sortir du lot, avait une meilleure activité que le précurseur : il s'agit du composé MAGA 0019 dont le taux de survie de *Neisseria meningitidis* en contact avec ce composé a été de 0,0001 % soit 100 fois plus supérieur à celui obtenu avec le B02 (MAGA 0011).

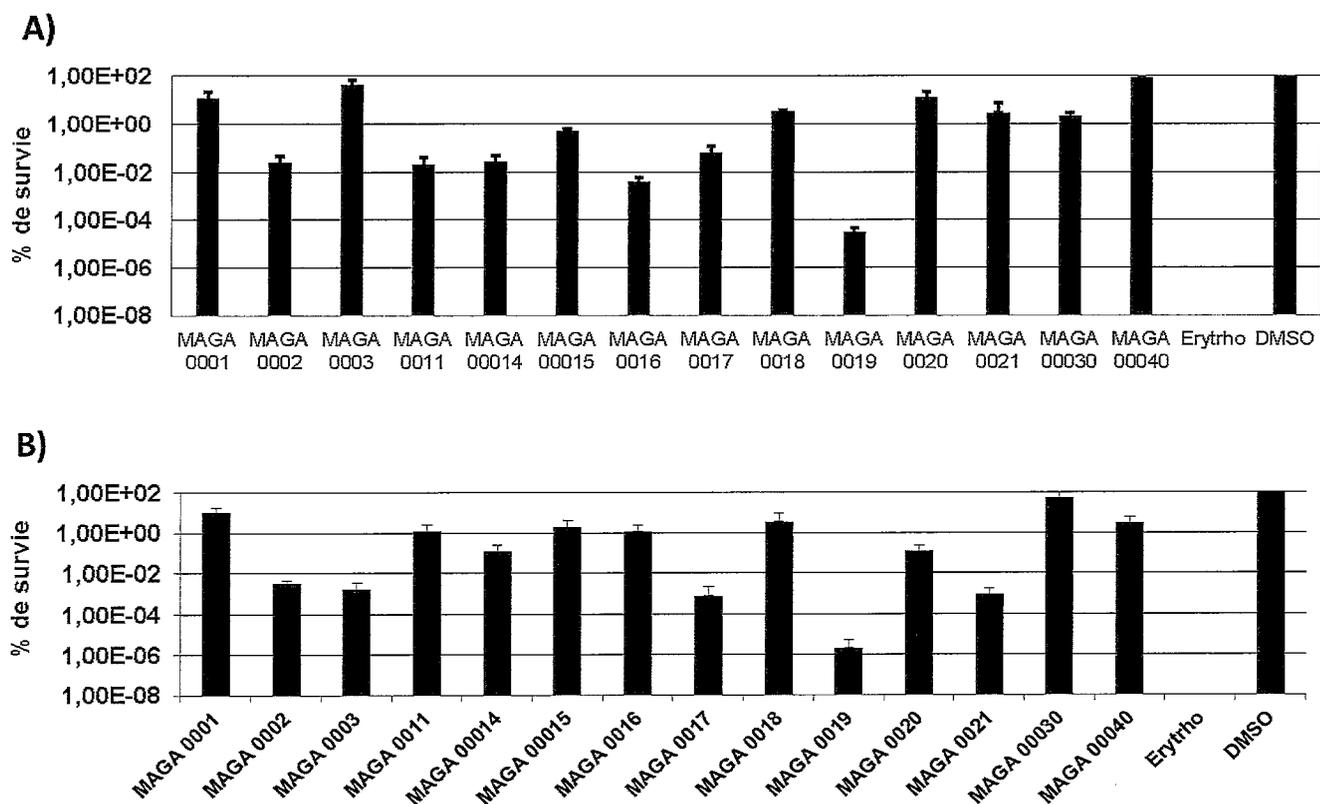


Figure 15. Amélioration du composé B02 (MAGA0011) : A) Activité bactéricide de différents dérivés de B02 sur *N. meningitidis* et B) sur *N. gonorrhoeae* (après 3 heures à 37 °C à une concentration de 50 µM)

La figure représente le taux de survie de *N. meningitidis* A) et *N. gonorrhoeae* B) avec les différents composés dérivés de B02 : avec le composé MAGA 0019, le taux est passé de 0,01 à 0,0001 % soit 100 fois plus que le composé B02 pour *N. meningitidis* et de 1 % à 1. 10<sup>-6</sup> % soit 100 000 fois plus.

❖ Activité sur la souche de *Neisseria gonorrhoeae*

De même, les composés ci-dessus ont également été testés à 50 µM sur *Neisseria gonorrhoeae*. Et après un temps de contact de 3 heures à 37 °C, le composé MAGA 0019 avait montré une activité supérieure à celle du précurseur : le taux de survie a été de 0,00001 % soit 100 000 fois supérieur au taux observé avec le B02 (Figure 15 B).

Ainsi, au vu des résultats sur les deux pathogènes, il a été conclu que l'activité de B02 (MAGA0011) avait été nettement améliorée avec son dérivé MAGA 0019.

- ❖ Activité sur les souches bactériennes de contrôle : *Moraxella catarrhalis* et la souche de *Staphylocoque aureus* méthicillino-résistante

En vue de comparer l'activité ciblant les deux pathogènes à d'autres souches bactériennes, les composés B02 et dérivés ont été testés initialement sur deux souches bactériennes servant de contrôle. Il s'agit de *Moraxella catarrhalis* et de la souche de *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistante, à 50 µM, après un temps de contact de 3 heures et à 37 °C. Ainsi, les résultats obtenus n'ont montré que très peu d'activité de ces divers composés sur ces deux bactéries (Figures 16 A et B) ce qui démontre une certaine spécificité. Par la suite, l'activité sera élargie à d'autres souches bactériennes.

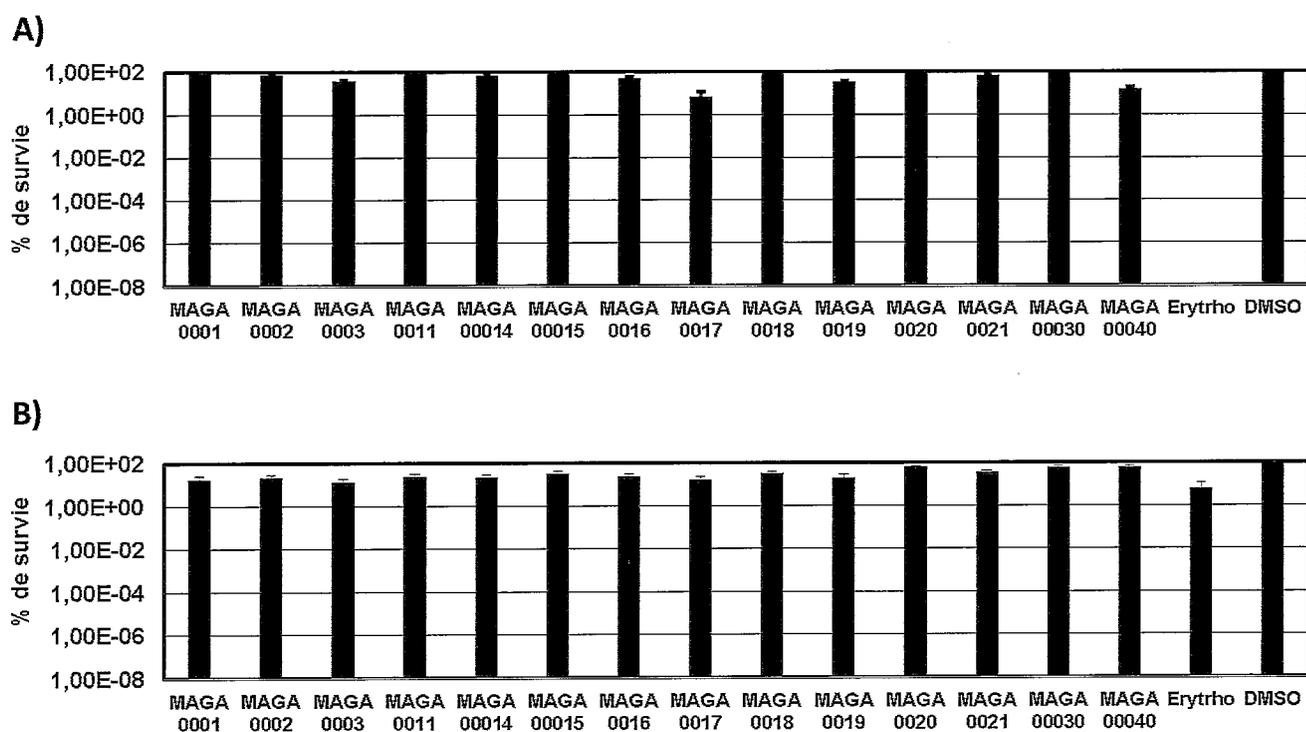


Figure 16. Pourcentage de survie des souches bactériennes de contrôle à l'exposition du composé B02 et ses dérivés à 50 µM après 3 heures de contact à 37 °C : (A) souche de *Moraxella catarrhalis* et (B) souche *MRSA*

### 3.2.2.2 Librairie des composés organométalliques

#### 3.2.2.2.1 Répertoire des composés organométalliques ayant une activité

Certains composés organométalliques actifs, répertoriés dans le Tableau 3, ont été testés afin de mesurer leur activité bactéricide. Parmi eux, il y avait des composés organométalliques avec leurs contrôles, des organométalliques neutres, le Na<sup>+</sup>BPh<sub>4</sub><sup>-</sup> qui est le sel de BPh<sub>4</sub><sup>-</sup> ayant permis

de synthétiser ces composés organométalliques. Les contrôles différaient avec des composés organométalliques purs du fait que bien que le cœur de la molécule était identique, le groupement prosthétique était différent. Les composés contrôles avaient le groupement  $\text{BF}_4^-$  au lieu de  $\text{BPh}_4^-$ .

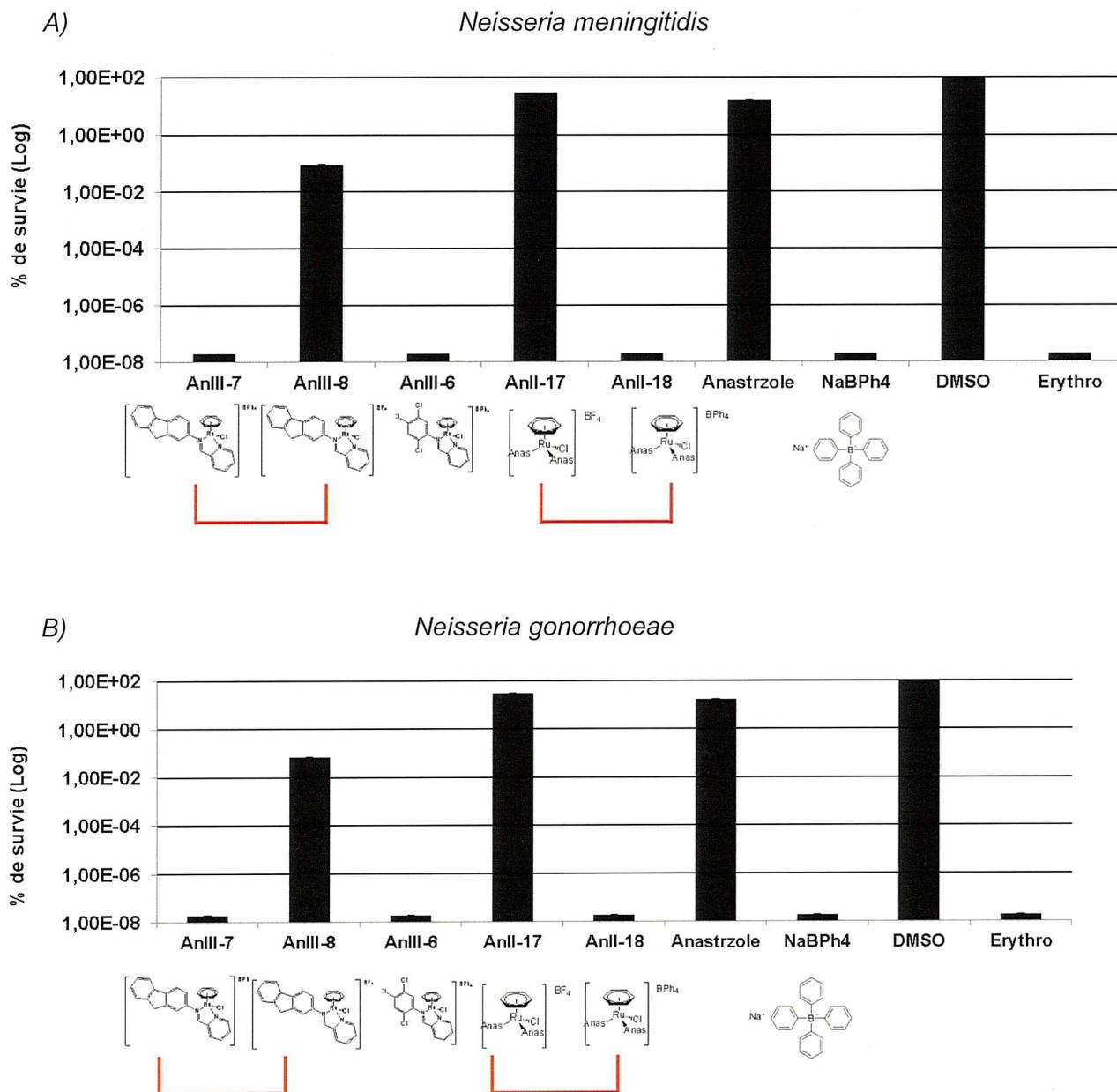


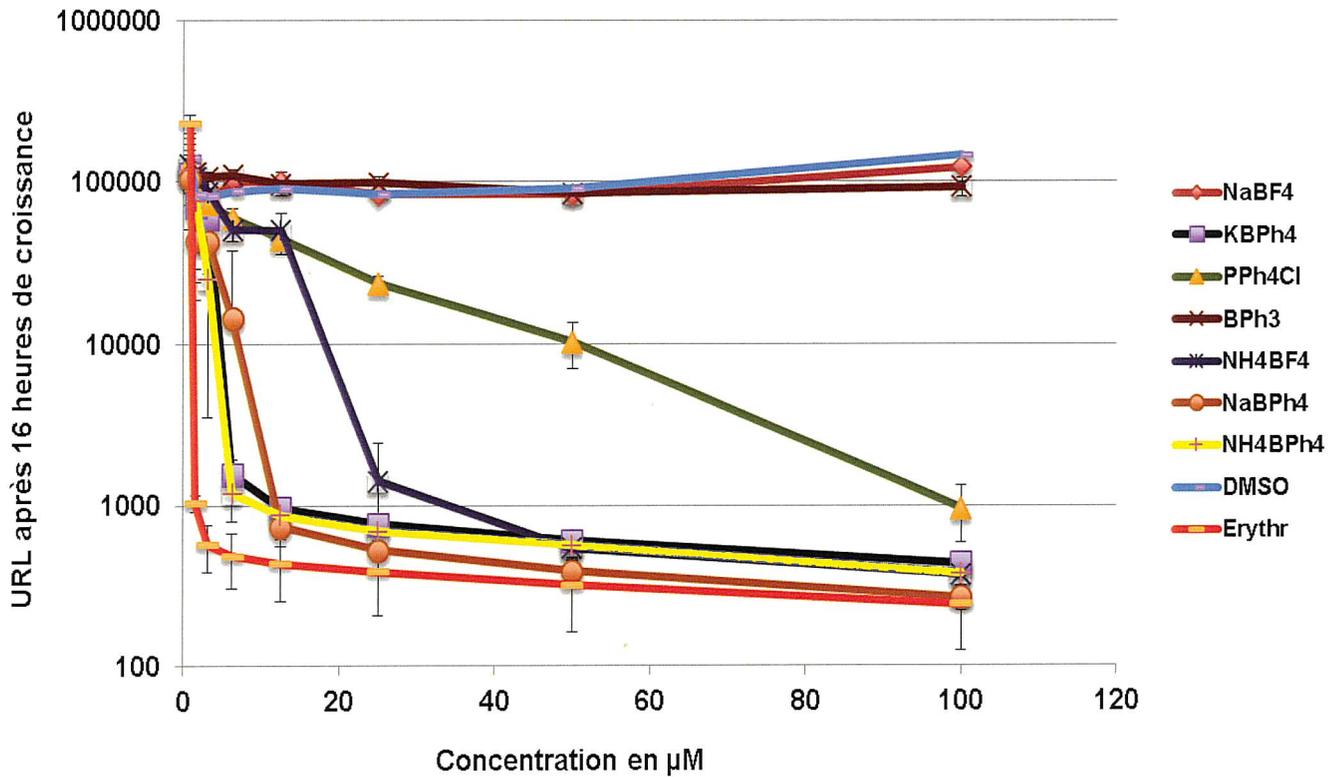
Figure 17. Activité bactéricide de certains composés sur *N. meningitidis* (A) et *N. gonorrhoeae* (B) à 50  $\mu\text{M}$  pendant 3 heures à 37 °C

Les composés (dont la structure chimique se trouve en annexe) ont été testés à 50  $\mu\text{M}$  après 3 heures de contact avec la souche à 37 °C et nous avons effectué le dénombrement des colonies (UFC). À ces composés, s'ajoutaient l'érythromycine et le DMSO.

Sur ces deux figures précédentes, comparés au contrôle positif (érythromycine) et négatif (le DMSO), nous avons constaté que seuls les composés organométalliques qui ont en commun un groupement prosthétique  $\text{BPh}_4^-$ , avaient une activité et étaient toxiques sur les deux souches pathogènes contrairement à ceux portant le groupement prosthétique  $\text{BF}_4^-$ . En testant le sel de  $\text{BPh}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$ , il a pu être observé que l'activité provenait en fait du groupement  $\text{BPh}_4^-$ . Ceci est vrai pour *N. meningitidis* (Figure 17A) et *N. gonorrhoeae* (Figure 17B).

#### **3.2.2.2 Activité de $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$ et d'autres sels de $\text{BPh}_4^-$ sur la survie de *Neisseria meningitidis***

Le groupement  $\text{BPh}_4^-$  a été défini comme étant toxique pour les deux *Neisseria* pathogènes. Nous avons donc voulu tester ensuite si tous les sels de  $\text{BPh}_4^-$ , avaient la même activité. Nous avons donc mesuré l'activité de plusieurs sels :  $\text{Na}^+\text{BPh}_4^-$  et  $\text{Na}^+\text{BF}_4^-$ ,  $\text{BPh}_3$ ,  $\text{K}^+\text{BPh}_4^-$ ,  $\text{NH}_4^+\text{BPh}_4^+$  et  $\text{NH}_4^+\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PPh}_4^+\text{Cl}^-$  sur la croissance de la souche luminescente de *Neisseria meningitidis* (Figure 18). Ainsi, après 16 heures de temps de croissance, seuls les sels de  $\text{BPh}_4^-$  avaient une activité sur la souche contrairement aux sels de  $\text{BF}_4^-$  testés.



Différentes CMI :  $Na^+BPh_4^- \approx 20 \mu M$  ;  $Na^+BF_4^- > 200 \mu M$  ;  $BPh_3 > 200 \mu M$  ;  $K^+BPh_4^- \approx 23 \mu M$  ;  $NH_4^+BF_4^- > 200 \mu M$  ;  
 $NH_4^+BPh_4^- \approx 10 \mu M$  ;

Figure 18. Activité en fonction de la concentration des sels de  $BPh_4^-$  et de  $BF_4^-$  sur la croissance de *N. meningitidis*.

La figure montre l'activité des sels de  $BPh_4^-$  sur la survie de *Neisseria meningitidis*: à de très faibles concentrations du composé, il a été observé une inhibition de la croissance de la souche de *N. meningitidis*. Mais par contre, aucune activité n'a été observée pour les sels de  $BF_4^-$ . La ligne rouge représente les valeurs de bruit de fond (URL en présence de 3 µM d'érythromycine).

### 3.2.2.2.3 Activité bactéricide de $Na^+BPh_4^-$ sur plusieurs espèces bactériennes

Après avoir vérifié que  $BPh_4^-$  était bien le groupement ayant l'activité bactéricide sur *N. meningitidis*, nous avons voulu vérifier si  $BPh_4^-$  était bactéricide sur plusieurs autres espèces de bactéries. Comme décrit dans la partie Matériel et méthodes, nous avons testé à 50 µM ce composé sur les souches bactériennes contrôle avec un temps de contact de 3 heures à 37 °C et le dénombrement des bactéries survivantes a été effectué par méthode de dilution en série. Les souches ont été sélectionnées en fonction de leur proximité phylogénique (*N. lactamica*, *N. sicca*), ou de leur divergence mais toujours dans la famille des *Neisseriaceae* (*N. elongata*,

*Kingella oralis*). Et les bactéries plus éloignées mais à Gram-négatif (*Moraxella catarrhalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter rodentium*), voire les bactéries Gram-Positif (*Staphylococcus aureus*) ou *Mycobacterium smegmatis* avaient aussi fait partie de l'étude. De façon intéressante, le  $Na^+BPh_4^-$  n'a montré aucune activité comparable à celle observée sur les deux souches pathogènes de *Neisseria*. (Figure 19). Il est intéressant de noter que *M. catarrhalis*, qui partage le même écosystème que *Neisseria meningitidis* (le rhinopharynx) semble être un petit peu sensible à la présence de sel de  $BPh_4^-$ .

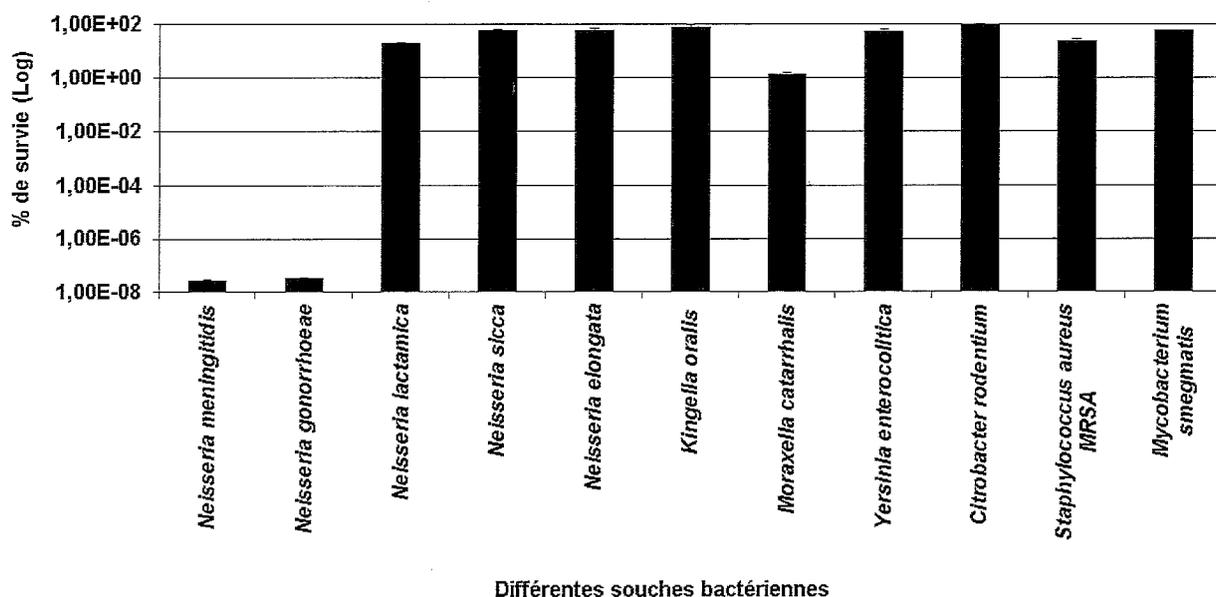


Figure 19. Activité de  $Na^+BPh_4^-$  sur les souches bactériennes de contrôle

#### 3.2.2.2.4 Activité bactéricide dose dépendante du composé actif $Na^+BPh_4^-$ sur *Neisseria meningitidis* et *Neisseria lactamica*

Étant donné l'activité bactéricide sélective et spécifique du sel  $Na^+BPh_4^-$  sur les deux souches pathogènes de *Neisseria*, des tests ont été réalisés pour déterminer l'activité bactéricide dose dépendante comparative du  $Na^+BPh_4^-$  sur *Neisseria lactamica* et *Neisseria elongata*. Bien que les trois premières bactéries soient génétiquement très proches, il a été observé qu'en deçà de 15  $\mu M$  de concentration du composé, aucune colonie de *N. gonorrhoeae* ne survivait alors que pour *N. meningitidis* il fallait des concentrations supérieures ou égales à 15  $\mu M$  pour observer aucune survie. Par ailleurs, il a fallu des doses plus importantes que 200  $\mu M$  pour visualiser 0,01% des survivants de la souche de *N. lactamica* alors que la souche de *N. elongata* persistait à ces doses (Figure 20).

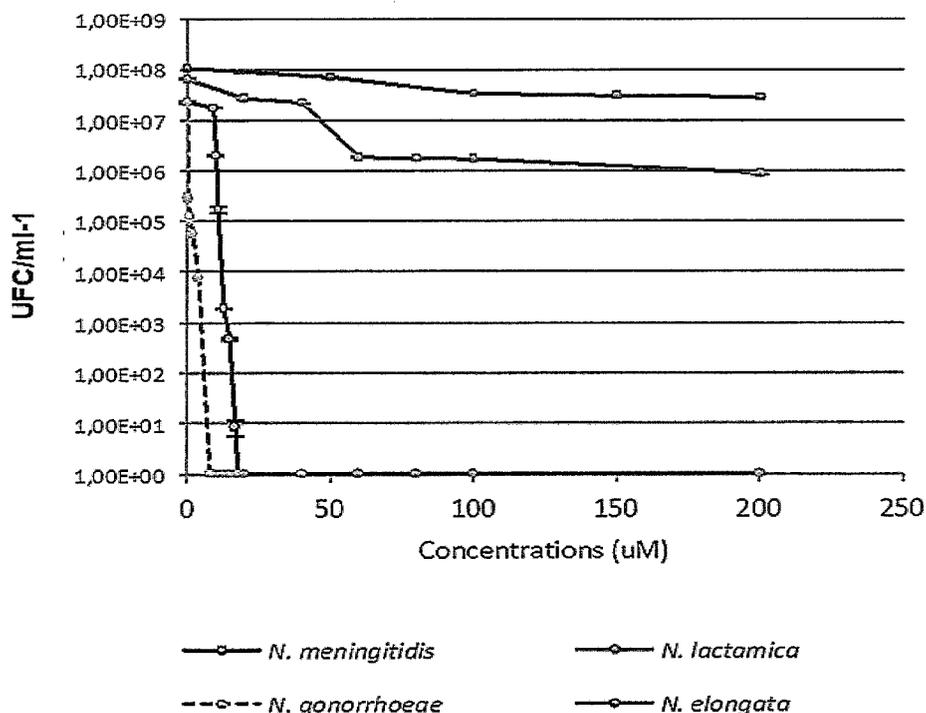


Figure 20. Activité dose dépendante comparative de  $Na^+ BPh_4^-$  sur la survie de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica* et *N. elongata*

### 3.2.2.3 Isolement des souches bactériennes résistantes provenant de ces deux pathogènes

Comme décrit dans la partie « Matériel et méthodes », nous avons essayé de comprendre le mécanisme d'action du composé et de comprendre aussi le mécanisme de résistance que la bactérie aura à développer face à ce composé. Ainsi, la souche luminescente de *Neisseria meningitidis* a été mise en culture sur milieu gélosé à des faibles concentrations (tuant 99,99 % des bactéries). Puis les colonies isolées ont été soumises à un test pour vérifier si leur sensibilité au  $Na^+ BPh_4^-$  avait changé. Ce test consistait à faire pousser pendant 16 heures les clones de *N. meningitidis* luminescent et isolé à partir de ces géloses avec des concentrations croissantes de  $Na^+ BPh_4^-$  en milieu liquide dans des plaques 96 puits blanches et de comparer leur croissance avec la souche sauvage. Après ce nouveau test, nous n'avons malheureusement pas pu confirmer cette résistance accrue. Ceci suggère que l'hypothèse que nous avons émise pour expliquer ces résultats est que soit le protocole utilisé n'était pas approprié pour générer ces souches résistantes soit la bactérie n'a pas eu le temps de développer des résistances.

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'utilisation massive et répétée des antibiotiques ces dernières années a considérablement fait reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses, mais a aussi conduit à la sélection des bactéries résistantes à ces antibiotiques. Aux États-Unis, des chercheurs du Center for Disease Control and Prevention (centre pour le contrôle et la prévention des maladies) (CDC) avaient découvert une souche d'*Escherichia coli* capable de résister au plus puissant des antibiotiques. Le phénomène de résistance prend de l'ampleur, ainsi des alternatives thérapeutiques sont à l'étude pour développer de nouveaux traitements efficaces contre les bactéries les plus dangereuses pour l'homme. Parmi eux, la phagothérapie, une méthode efficace consistant à utiliser des virus infectant naturellement des bactéries, nécessite un diagnostic précis de l'infection en amont (Lebeaux & Ghigo, 2012; G. Ren et al., 2009; Rudramurthy, Swamy, Sinniah, & Ghasemzadeh, 2016). Son principal avantage est sa haute spécificité d'action dirigée contre une seule espèce bactérienne, voire quelques sous-espèces d'un même genre bactérien (Nelson et al., 2001 ; Frias et al., 2009). Une autre technologie pourrait permettre de contourner l'usage des antibiotiques est le « Crispr-Cas9 ». C'est une méthode qui permet de supprimer, modifier ou remplacer un ou plusieurs gènes directement dans une cellule ou dans un organisme (Bikard & Barrangou, 2017).

D'autres agents antimicrobiens prometteurs, potentiellement dotés d'activité antibactérienne efficaces sont aussi développés et exploités pour faire face à ce phénomène de résistance tels que des microorganismes probiotiques, des peptides antimicrobiens ainsi que des nanoparticules. Bien que les deux précédentes alternatives ne semblent pas avoir une efficacité absolue, les nanoparticules antimicrobiennes ont déjà des applications considérables dans de nombreux domaines (industrie alimentaire, cosmétiques, médecine et génie) (Aderibigbe, 2017; Gold, Slay, Knackstedt, & Gaharwar, 2018; Raghunath & Perumal, 2017). Certaines nanoparticules composées d'atomes métalliques constituent des agents très prometteurs pour les applications antibactériennes, antifongiques et/ou antivirales. L'activité antimicrobienne spécifique contre *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* attire l'attention de nombreux chercheurs car ils pourraient être utilisés comme alternative aux antibiotiques. L'efficacité antimicrobienne des nanoparticules d'argent ou des nano-oxydes augmente avec la diminution de leur taille, ce qui peut être corrélé avec la surface totale de contact. Les nanoparticules peuvent arrêter la croissance (effet biostatique) ou tuer les microorganismes (effet biocide). Les nanoparticules se lient aux parois des bactéries provoquant leur

endommagement soit par la destruction mécanique des membranes plasmiques, soit par la production de radicaux libres (Vidic, 2013).

L'étude réalisée dans ce mémoire présente la tentative de découverte des molécules antimicrobiennes naturelles ou de synthèse ciblant spécifiquement les deux souches pathogènes de *Neisseria* : *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. En effet, bien que des avancées majeures dans le traitement des infections bactériennes aient été marquées par la découverte et le développement des antibiotiques, l'apparition de résistances bactériennes a été très rapidement identifiée suite à une utilisation très étendue et souvent inappropriée de ces antibiotiques (Carlet & Shlemmer, 2015). Ces résistances peuvent être d'abord simples puis multiples s'avérant en ce jour une menace tangible de l'échec thérapeutique (Zahar & Lesprit, 2014). La valeur de la surveillance de la résistance aux antimicrobiens devient particulièrement importante pour les maladies causées par l'infection à *Neisseria meningitidis* et à *Neisseria gonorrhoeae*, même si c'est pour des raisons différentes. Bien qu'il n'y ait pas d'alerte globale à la propagation de souches méningococciques résistantes, l'émergence de résistances pourrait menacer l'issue du traitement et la prophylaxie réussie des contacts étroits. En effet, peu de cas de résistance parmi les méningocoques ont été enregistrés dans le monde. On ne connaît cependant pas le mécanisme intrigant qui y serait lié, mais une étude récente suggère par exemple que les souches de *Neisseria meningitidis* présentant une résistance accrue à la pénicilline (dû à un changement d'allèle *penA*) serait moins virulente. Ceci s'expliquerait par leur caractère moins inflammatoire dû aux propriétés de leur peptidoglycane qui d'un côté augmente la résistance à la pénicilline mais diminue l'inflammation causée par la reconnaissance de leur peptidoglycane par les récepteurs immunitaires Nod1 (Zarantonelli et al., 2013). Malgré tout, il a été découvert certaines souches de *N. meningitidis* invasives ayant reçu une bêta-lactamase de type ROB-1 (rencontrée fréquemment chez *Haemophilus influenzae*) par transfert horizontal et dont la circulation augmenterait dans les dernières années. Sachant que les bêta-lactamases sont exceptionnellement efficaces chez les méningocoques, l'expansion de ces isolats pourrait donc compromettre le traitement efficace contre la méningococcie invasive (Hong, Deghmane, & Taha, 2018). D'un autre côté, l'émergence des souches multi-résistantes de *N. gonorrhoeae* est très commune et constitue un grand défi dans la lutte contre la gonorrhée, l'une des principales maladies bactériennes sexuellement transmissibles (Alirol et al., 2017; Quillin & Seifert, 2018).

C'est ainsi, devant le risque de se trouver devant une véritable impasse thérapeutique limitant le traitement de certaines infections, les chercheurs sont appelés à se pencher à de nouvelles

approches, de nouveaux médicaments susceptibles d'optimiser des traitements actuels (World Health, 2012)(WHO, FAO et OIE 2010, OMS 2015). Plusieurs approches existent pour trouver de nouvelles molécules, nous en avons utilisés trois. La première consiste à rechercher et à utiliser ce que les microorganismes produisent déjà et qui leur permettent de se concurrencer dans un même écosystème. Plusieurs antibiotiques ont été isolés de champignons mais les bactéries (surtout les non cultivables représentant à elles seules 99% de toutes les espèces dans les environnements externes) peuvent être aussi une source inexplorée de nouvelles molécules (Ling et al., 2015). Une autre approche consiste à tester des collections de mini-fragments de molécules et ensuite d'essayer d'augmenter leur activité par une approche ciblée (Ayotte, Bilodeau, Descoteaux, & LaPlante, 2018). Finalement, des projets de recherche sur l'évaluation du potentiel thérapeutique de certains composés métalliques en alternative ou en complément à l'antibiothérapie sont en cours. Ces récents progrès ont donc rendu possible la formation d'un nombre important de complexe de métaux de transition avec ligand organique d'intérêt qui peut être utilisé comme agent thérapeutique (Bobbarala, 2012; Castonguay et al.; Haghdoost et al., 2017; Rafique et al., 2010).

Ainsi, dans ce présent travail, même si l'approche dite « naturelle » n'a pas donnée les résultats escomptées et qu'aucune molécule n'a pu être isolée, l'approche dite « de synthèse » a donné de bien meilleurs résultats. En effet, plusieurs composés ont pu être isolés avec une activité importante et sélective contre les deux pathogènes d'intérêt : *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Cette sélectivité est importante dans un contexte où *Neisseria gonorrhoeae* infecte annuellement 1 million de personnes aux États-Unis seulement. Le traitement d'un nombre aussi important de personnes avec des antibiotiques à large spectre entraîne inévitablement des problèmes (par exemple diminution de la flore intestinale et dysbiose). Une autre conséquence est la diminution de l'immunité de groupe contre les *Neisseria*. En effet, la colonisation par d'autres souches de *Neisseria* comme *N. lactamica* peut protéger contre l'infection par *N. meningitidis* (Deasy et al., 2015) et doit donc être promue. L'utilisation à grande échelle d'antibiotiques non-spécifiques pour les deux pathogènes pourrait donc altérer cette colonisation.

En effet, partant de criblage de plusieurs molécules (testées par lot de 10 composés par puits) de type fragment, une dizaine de molécules s'étaient avérées posséder une activité bactéricide sur *Neisseria*. Après des tests individuels de ces composés, il avait été identifié quatre seulement possédant une activité bactéricide ou bactériostatique dont le B02 ou MAGA 0011 sur le *Neisseria meningitidis* et non sur les autres bactéries (*E. coli*, *M. smegmatis*, *M.*

*catarrhalis*, *Staphylocoque aureus* résistant à la méthicilline). Et pour répondre à certains critères des inhibiteurs de *Neisseria* (meilleure affinité et spécificité), la molécule a été par la suite optimisée par la synthèse des nouveaux analogues grâce à des procédés chimiques. C'est ainsi qu'ont été mis au point les dérivés du composé B02. Un de ces composés (MAGA0019) montre une activité 100X supérieure. Nonobstant le fait que la nature chimique de B02 demeure confidentielle, une étude avancée de ces propriétés permettrait de comprendre la spécificité et l'affinité sur les deux souches pathogènes d'intérêt de l'étude. Nous n'avons cependant pas encore déterminé si les autres *Neisseria* spp. étaient aussi sensibles à ce composé.

Une autre molécule qui a été isolée grâce à la librairie des composés organométalliques  $Na^+BP h_4^-$ , connue comme agent de précipitation dans la préparation de ces composés initialement testés (sels) s'est avérée avoir une sélectivité/spécificité sur les deux souches pathogènes d'intérêt. Aucune sensibilité du même ordre n'a été observée par ailleurs, ni sur les espèces issues du même genre *Neisseria*, ni sur les autres souches contrôle de l'étude. Ce groupement  $BP h_4^-$ , simple est utilisé dans la préparation de nombreux composés et augmente leurs propriétés lipophiles et de solubilité. Aucune littérature ne fait mention de cette découverte même si son utilisation pourrait paraître très simple. Le mécanisme par lequel le composé affecte les deux espèces pathogènes de *Neisseria* et interagit avec les composantes de la bactérie n'est pas encore élucidée mais d'autres études sont en cours. Toutefois, ce candidat médicament devra passer par des tests précliniques au préalable *in vitro* sur des modèles expérimentaux (cellules eucaryotes, poissons zèbres, modèle murin) pour en évaluer sa toxicité.

## CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Les infections à *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* constituent un problème majeur en santé publique de par l'apparition des souches résistantes aux antibiotiques usuels. Bien que peu de cas de résistantes au méningocoque soit enregistrés, on assiste actuellement à l'émergence des souches résistantes de *Neisseria gonorrhoeae*. Vue le danger de se retrouver face à une impasse thérapeutique, d'autres alternatives devront être envisagées. C'est dans cette optique que s'est inscrit mon projet de recherche basé sur la découverte de nouvelles molécules antibactériennes naturelles ou de synthèse ciblant spécifiquement *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*.

Ainsi, les expériences réalisées dans ce présent projet ont exploité deux volets à savoir le volet naturel et le volet chimique. Pour de raisons d'ordre technique, la souche luminescente de *Neisseria meningitidis* (exprimant *luxCDABE* sous contrôle du promoteur constitutif *porBp*) nous avait servi d'organisme modèle.

Le volet naturel, basé sur le criblage des deux souches bactériennes identifiées bactéricides (LNP 16475 et 18695) lors d'une étude antérieure ne nous a pas permis de générer des souches mutantes ayant perdu leur capacité à tuer la souche de *Neisseria meningitidis* et de rechercher le mécanisme pouvant être lié à cette perte. Ceci allait nous conduire à rechercher l'activité naturelle bactéricide des bactéries et de contrer ainsi la survenue des phénomènes de résistances. Des études sont en cours.

Le second volet, s'est réalisé en collaboration avec les laboratoires de chimie (Dr Laplante et Dr Castonguay). Il nous a permis de cribler plusieurs molécules aussi bien les fragments de molécules que les organométalliques sur l'activité des deux souches d'intérêt de l'étude en premier, puis de comparer leur activité aux souches ayant servies de contrôles. L'activité bactériostatique ou bactéricide avait été recherchée de deux manières : par la mesure de la luminescence avec le luminomètre de Wallac et par le comptage des colonies.

Des fragments de molécules, le B02 qui avait montré une activité intéressante sur la croissance des deux souches avait subi une amélioration de sa structure. Il a été généré plusieurs composés similaires qui ont été testés sur les deux pathogènes d'intérêt et deux souches contrôles. Mais un seul avait une activité de loin meilleure que le B02 de départ. Bien que nous notions la survie négligeable des bactéries, ce composé d'intérêt pourrait être encore améliorés.

Des organométalliques, plusieurs composés avaient été testés et il en a résulté que seuls les composés portant une unité  $BPh_4^-$  avaient une activité sélective sur la survie de deux pathogènes. Aucune des deux bactéries ne survivaient au contact de ces composés. Par contre ces composés n'avaient une activité comparable sur les autres souches contrôle.

Au vue de ces résultats, le  $Na^+BPh_4^-$  ainsi que les autres sels de  $BPh_4^-$  et  $BF_4^-$  avaient été testés pour rechercher leur activité sur la croissance des *N. meningitidis* et *N. gonorrhoea*. Et de cette expérience seuls les sels de  $BPh_4^-$  avaient une activité bactéricide sur les deux pathogènes contrairement aux sels de  $BF_4^-$  ou  $BPh_3$ . De part cette découverte, le composé  $Na^+BPh_4^-$  a été utilisé durant toute l'expérience en vue de comparer l'activité sur la croissance des deux pathogènes et des souches de contrôle. Son activité bactéricide a été mise en évidence que sur les deux souches d'intérêt : il s'agit de notre composé actif  $Na^+BPh_4^-$  découvert dans cette étude. A cela, plusieurs essais avaient été réalisés pour rechercher des souches résistantes à ce composé actif  $Na^+BPh_4^-$  mais n'ont pas su généré des mutants. Cette découverte constitue donc une piste à explorer pour découvrir le mécanisme d'action de ce composé et expliquer la sélectivité et la spécificité. Ce composé simple pourrait être envisagé comme une alternative thérapeutique.

## CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES

L'approche dite « naturelle » n'a pas permis d'identifier les molécules responsables de l'activité bactéricide observé. Peut-être que la recherche de mutants ayant perdu leur activité n'est pas la bonne méthode. Nous envisageons d'isoler les molécules responsables par différentes étapes de purification (extraction par des solvants et chromatographie sur différents types de support solide) et ensuite chercher à les caractériser en vue de leur identification structurale par RMN.

Pour les autres approches, vu que les applications thérapeutiques des composés organométalliques sur les infections bactériennes sont sous-développées, malgré qu'ils offrent de nombreuses possibilités de progrès, la synthèse de nouvelles molécules et le développement de nouvelles méthodologies de recherche des mécanismes de résistances bactériennes devront être effectués. Ainsi, ceci mènera par ailleurs à la découverte d'une panoplie d'autres nouveaux composés efficaces qui pourront faire face à l'émergence des souches résistantes chez d'autres pathogènes. Nous avons pu démontrer que ceux-ci peuvent être améliorés. Nonobstant leur potentielle activité bactéricide, il serait important de connaître le mécanisme par lequel ils interagissent avec les différentes composantes de la cellule bactérienne. Nous pensons doser leur transport grâce à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). En effet, peut-être que la sensibilité accrue de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* est due à une meilleure pénétration du composé.

De plus, des études seront envisagées pour tester la toxicité de ces composés sur les modèles eucaryotes ou des modèles animaux. L'évaluation de la toxicité, *in vivo*, depuis ces dernières années peut se faire en utilisant le modèle de poisson-zèbre (*Danio rerio*) en raison de leur développement rapide, leur haute fertilité et leur transparence (MacRae & Peterson, 2015). Quoique les poissons zèbre soient phylogénétiquement plus éloignés de l'homme que les rongeurs, ils possèdent des orthologues de 82 % des gènes associés aux maladies humaines. Et dans de nombreux cas, ils présentent une conservation physiologique et pharmacologique qui se rapproche de celle des rongeurs. Pour produire des phénotypes *in vivo* dans les dosages de poisson-zèbre, les composés doivent avoir la capacité d'être absorbés, d'atteindre le tissu cible et d'éviter un métabolisme et une excrétion rapides. (Spitsbergen & Kent, 2003). Si le composé s'avère peu ou pas toxique, nous serons alors en mesure de tester son efficacité lors d'une infection aigüe à *Neisseria meningitidis* dans un modèle murin.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aderibigbe, A. B. (2017). Metal-Based Nanoparticles for the Treatment of Infectious Diseases. *Molecules*, 22(8). doi:10.3390/molecules22081370
- Alirol, E., Wi, T. E., Bala, M., Bazzo, M. L., Chen, X.-S., Deal, C., Balasegaram, M. (2017). Multidrug-resistant gonorrhoea: A research and development roadmap to discover new medicines. *PLoS Medicine*, 14(7), e1002366. doi:10.1371/journal.pmed.1002366
- Allen, V. G., Mitterni, L., Seah, C., & et al. (2013). Neisseria gonorrhoeae treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. *JAMA*, 309(2), 163-170. doi:10.1001/jama.2012.176575
- Anderson, D. M., & Schneewind, O. (1999). Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. *Current opinion in microbiology*, 2(1), 18-24.
- Andrès, E., & Dimarcq, J. L. (2007). Peptides antimicrobiens cationiques: de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. Mise à jour. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37(4), 194-199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.09.009>
- Ayotte, Y., Bilodeau, F., Descoteaux, A., & LaPlante, S. R. (2018). Fragment-Based Phenotypic Lead Discovery: Cell-Based Assay to Target Leishmaniasis. *ChemMedChem*.
- Bennett, J. S., Griffiths, D. T., McCarthy, N. D., Sleeman, K. L., Jolley, K. A., Crook, D. W., & Maiden, M. C. J. (2005). Genetic Diversity and Carriage Dynamics of Neisseria lactamica in Infants. *Infection and Immunity*, 73(4), 2424-2432. doi:10.1128/IAI.73.4.2424-2432.2005
- Bertrand, B., Doulain, P.-E., Goze, C., & Bodio, E. (2016). Development of trackable metal-based drugs: new generation of therapeutic agents. *Dalton Transactions*, 45(33), 13005-13011. doi:10.1039/C5DT04275E
- Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Les systèmes CRISPR-Cas comme arme contre les bactéries pathogènes. *Biologie Aujourd'hui*, 211(4), 265-270.
- Bingle, L. E. H., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 3-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006>
- Black, C. G., Fyfe, J. A. M., & Davies, J. K. (1998). Absence of an SOS-like system in Neisseria gonorrhoeae. *Gene*, 208(1), 61-66. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00653-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00653-7)
- Bobbarala, V. (2012). A search for antibacterial agents. *InTech, Rijeka, Croatia*.
- Bogaert, D., Keijsers, B., Huse, S., Rossen, J., Veenhoven, R., van Gils, E., Sanders, E. (2011). Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. *PLoS ONE*, 6(2), e17035. doi:10.1371/journal.pone.0017035
- Braff, M. H., Hawkins, M. i. A., Nardo, A. D., Lopez-Garcia, B., Howell, M. D., Wong, C., Gallo, R. L. (2005). Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides: Dissociation of Antimicrobial Properties from Host Immunostimulatory Activities. *The Journal of Immunology*, 174(7), 4271.

- Brigham, K. S., & Sandora, T. J. (2009). *Neisseria meningitidis*: epidemiology, treatment and prevention in adolescents. *Current opinion in pediatrics*, 21(4), 437-443.
- Brugger, S. D., Frei, L., Frey, P. M., Aebi, S., Mühlemann, K., & Hilty, M. (2012). 16S rRNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for the Characterization of the Nasopharyngeal Microbiota. *PLOS ONE*, 7(12), e52241. doi:10.1371/journal.pone.0052241
- Campbell, L. A., & Yasbin, R. E. (1984). Mutagenesis of *Neisseria gonorrhoeae*: absence of error-prone repair. *Journal of Bacteriology*, 160(1), 288-293.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Albertí, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infection and Immunity*, 72(12), 7107-7114. doi:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004
- Carlet, J., & Shlemmer, B. (2015). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable.
- Cascales, E. (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO Reports*, 9(8), 735-741. doi:10.1038/embor.2008.131
- Castonguay, A., Golbaghi, G., & Haghdoost, M. M. Ruthenium-based Organometallic Therapeutics and Development of Novel Strategies for their Thermoresponsive Targeted Delivery.
- Caugant, D. A., & Maiden, M. C. J. (2009). Meningococcal carriage and disease—Population biology and evolution. *Vaccine*, 27(4), B64-B70. doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.061
- Caugant, D. A., Tzanakaki, G., & Kriz, P. (2007). Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(1), 52-63. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00052.x
- Chen, C. (1996). Distribution of a newly described species, *Kingella oralis*, in the human oral cavity. *Molecular Oral Microbiology*, 11(6), 425-427.
- Collins, J. W., Keeney, K. M., Crepin, V. F., Rathinam, V. A. K., Fitzgerald, K. A., Finlay, B. B., & Frankel, G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 612. doi:10.1038/nrmicro3315
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777. doi:10.1038/nrmicro1273
- Coulthurst, S. J. (2013). The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology*, 164(6), 640-654. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.017>
- Coureuil, M., Join-Lambert, O., Lécuyer, H., Bourdoulous, S., Marullo, S., & Nassif, X. (2013). Pathogenesis of Meningococemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(6), a012393. doi:10.1101/cshperspect.a012393
- Cámara, J., Serra, J., Ayats, J., Bastida, T., Carnicer-Pont, D., Andreu, A., & Ardanuy, C. (2012). Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1858-1860. doi:10.1093/jac/dks162

- Dandekar, T., & Eisenreich, W. (2015). Host-adapted metabolism and its regulation in bacterial pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 28.
- Deasy, A. M., Guccione, E., Dale, A. P., Andrews, N., Evans, C. M., Bennett, J. S., Read, R. C. (2015). Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: a controlled human infection study. *Clinical Infectious Diseases*, 60(10), 1512-1520.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Current pharmaceutical design*, 15(21), 2377-2392.
- Fedders, H., Podschun, R., & Leippe, M. (2010). The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 264-266. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.04.008>
- Ferrandez, Y. (2008). Caractérisation du second système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*.
- Garbutcheon-Singh, K. B., Maxine, P. G., Benjamin, W. H., Anwen, M. K.-H., Madhura, M., & Nikita Orkey and Janice, R. A.-W. (2011). Transition Metal Based Anticancer Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(5), 521-542. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/156802611794785226>
- García-Rodríguez, J. Á., & Fresnadillo Martínez, M. J. (2002). Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(suppl\_3), 59-74.
- Gasser, G., & Metzler-Nolte, N. (2012). The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(1), 84-91. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.01.013>
- Gold, K., Slay, B., Knackstedt, M., & Gaharwar, A. (2018). *Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles* (Vol. 1).
- Golparian, D., Ohlsson, A. K., Janson, H., Lidbrink, P., Richtner, T., Ekelund, O., Unemo, M. (2014). Four treatment failures of pharyngeal gonorrhoea with ceftriaxone (500 mg) or cefotaxime (500 mg), Sweden, 2013 and 2014. *Eurosurveillance*, 19(30), 20862.
- Green, A., Pham, N., Osby, K., Aram, A., Claudius, R., Patray, S., & Jayasinghe, S. A. (2016). Are the curli proteins CsgE and CsgF intrinsically disordered? *Intrinsically disordered proteins*, 4(1), e1130675.
- Guiddir, T., Deghmane, A.-E., Giorgini, D., & Taha, M.-K. (2014). Lipocalin 2 in cerebrospinal fluid as a marker of acute bacterial meningitis. *BMC Infectious Diseases*, 14, 276-276. doi:10.1186/1471-2334-14-276
- Haghdoost, M., Golbaghi, G., Létourneau, M., Patten, S. A., & Castonguay, A. (2017). Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium(II) arene complex with considerable in vitro cytotoxicity against cancer cells and a lower in vivo toxicity in zebrafish embryos than clinically approved cis-platin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132, 282-293. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.029>

- Hancock, R. E. W. (2000). Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(8), 1723-1729. doi:10.1517/13543784.9.8.1723
- Harrison, L. H. (2010). The Epidemiology of Meningococcal Disease in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(S2), S37. doi:10.1086/648963
- Harrison, O. B., Claus, H., Jiang, Y., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J. (2013). Description and Nomenclature of Neisseria meningitidis Capsule Locus. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), 566-573. doi:10.3201/eid1904.111799
- Harrison, O. B., Cole, K., Peters, J., Cresswell, F., Dean, G., Eyre, D. W., Maiden, M. C. J. (2017). Genomic analysis of urogenital and rectal *Neisseria meningitidis* isolates reveals encapsulated hyperinvasive meningococci and coincident multidrug-resistant gonococci. *Sexually Transmitted Infections*, 93(6), 445.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 692-744.
- Hobbs, M., & Mattick, J. S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular microbiology*, 10(2), 233-243.
- Hong, E., Deghmane, A.-E., & Taha, M.-K. (2018). Acquisition of beta-lactamase by Neisseria meningitidis through possible horizontal gene transfer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00831.
- Houben, E. N. G., Korotkov, K. V., & Bitter, W. (2014). Take five Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1707-1716. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.003>
- Hsiao, J.-F., Lee, M.-H., Chia, J.-H., Ho, W.-J., Chu, J.-J., & Chu, P.-H. (2008). Neisseria elongata endocarditis complicated by brain embolism and abscess. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3), 376-381. doi:doi:10.1099/jmm.0.47493-0
- Janda, W. M., & Gaydos, C. A. (2007). Neisseria. In: Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press.
- Jaouen, G., & Metzler-Nolte, N. (2010). *Medicinal organometallic chemistry* (Vol. 32): Springer.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511. doi:10.1128/CMR.00056-05
- Jeurissen, A., Stroy, J. P., Wielenga, R. P., & Andriessse, G. I. (2006). Severe infective endocarditis due to neisseria sicca: case report and review of literature. *Acta Clinica Belgica*, 61(5), 256-258. doi:10.1179/acb.2006.043
- Lafaye, C. (2009). *Biochemical and Structural Study of DsbA1, DsbA2 and DsbA3, the three homologues of the Thiol-Disulfide Oxidoreductase DsbA in Neisseria meningitidis*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00440935> Ujf Cea Ibs Univ-grenoble1 Cnrs Uga Ibs-dyc Dsv Fdonzel Cea-drf database.

- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141. doi:10.1016/j.it.2008.12.003
- Lebeaux, D., & Ghigo, J.-M. (2012). Infections associées aux biofilms-Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *médecine/sciences*, 28(8-9), 727-739.
- Lefebvre, B., Martin, I., Demczuk, W., Deshaies, L., Michaud, S., Labbé, A.-C., Longtin, J. (2018). Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 24(2), 381-383. doi:10.3201/eid2402.171756
- Leone, P., Roche, J., Vincent, M. S., Tran, Q. H., Desmyter, A., Cascales, E., Roussel, A. (2018). Type IX secretion system PorM and gliding machinery GldM form arches spanning the periplasmic space. *Nature communications*, 9(1), 429.
- Lepargneur, J. P., & Rousseau, V. (2002). Rôle protecteur de la flore de Doderleïn.
- Les Maladies, P. L. E. S. C. C. (2015). Surveillance nationale de la sensibilité aux antimicrobiens de *Neisseria gonorrhoeae* Rapport sommaire annuel de 2014.
- Lewis, D. A., Sriruttan, C., Müller, E. E., Golparian, D., Gumede, L., Fick, D., Unemo, M. (2013). Phenotypic and genetic characterization of the first two cases of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* infection in South Africa and association with cefixime treatment failure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(6), 1267-1270. doi:10.1093/jac/dkt034
- Li, F., Grant Collins, J., & Richard Keene, F. (2015). *Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents* (Vol. 44).
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Epstein, S. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455.
- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 721. doi:10.1038/nrd4627
- Margos, G., Hepner, S., Mang, C., Marosevic, D., Reynolds, S. E., Krebs, S., Fingerle, V. (2017). Lost in plasmids: next generation sequencing and the complex genome of the tick-borne pathogen *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genomics*, 18, 422. doi:10.1186/s12864-017-3804-5
- Marri, P. R., Paniscus, M., Weyand, N. J., Rendón, M. A., Calton, C. M., Hernández, D. R., So, M. (2010). Genome Sequencing Reveals Widespread Virulence Gene Exchange among Human *Neisseria* Species. *PLOS ONE*, 5(7), e11835. doi:10.1371/journal.pone.0011835
- Martel, J., Ojcius, D., Chang, C.-J., Ko, Y.-F., Lai, H.-C., & Young, J. D. (2015). Microbiome et santé.
- Mellin, J. R., & Hill, S. (2010). *Gene expression strategies of the pathogenic Neisseria*: Horizon Scientific Press Norfolk, UK.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Mekalanos, J. J. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion

- Apparatus. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5779), 1526-1530. doi:10.1126/science.1128393
- Neelakantan, M. A., Esakkiammal, M., Mariappan, S. S., Dharmaraja, J., & Jeyakumar, T. (2010). Synthesis, Characterization and Biocidal Activities of Some Schiff Base Metal Complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(2), 216-222. doi:10.4103/0250-474X.65015
- Nes, I. F. (2011). History, Current Knowledge, and Future Directions on Bacteriocin Research in Lactic Acid Bacteria. In D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* (pp. 3-12). New York, NY: Springer New York.
- Ng, N. S., Leverett, P., Hibbs, D. E., Yang, Q., Bulanadi, J. C., Jie Wu, M., & Aldrich-Wright, J. R. (2013). The antimicrobial properties of some copper(ii) and platinum(ii) 1,10-phenanthroline complexes. *Dalton Transactions*, 42(9), 3196-3209. doi:10.1039/C2DT32392C
- Ohnishi, M., Golparian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., Unemo, M. (2011). Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhoea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3538-3545. doi:10.1128/AAC.00325-11
- Ohnishi, M., Watanabe, Y., Ono, E., Takahashi, C., Oya, H., Kuroki, T., Watanabe, H. (2010). Spread of a Chromosomal Cefixime-Resistant penA Gene among Different *Neisseria gonorrhoeae* Lineages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1060-1067. doi:10.1128/AAC.01010-09
- Pavis, A. (2002). Flores génitales normale et pathologique. *Infections en Gynécologie. Judlin*, 2002.
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691. doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1528-1533. doi:10.1073/pnas.0510322103
- Quillin, S. J., & Seifert, H. S. (2018). *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 226. doi:10.1038/nrmicro.2017.169
- Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H., & Athar, A. (2010). *Transition metal complexes as potential therapeutic agent* (Vol. 5).
- Raghunath, A., & Perumal, E. (2017). Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 137-152. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>
- Read, P. J., Limnios, E. A., McNulty, A., Whiley, D., & Lahra, M. M. (2013). One confirmed and one suspected case of pharyngeal gonorrhoea treatment failure following 500 mg ceftriaxone in Sydney, Australia. *Sexual health*, 10(5), 460-462.

- Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W. C., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(6), 587-590. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>
- Ren, T., Glatt Dominique, U., Nguyen Tam, N., Allen Emma, K., Early Stephen, V., Sale, M., Wu, M. (2012). 16S rRNA survey revealed complex bacterial communities and evidence of bacterial interference on human adenoids. *Environmental Microbiology*, 15(2), 535-547. doi:10.1111/1462-2920.12000
- Richards, A. D., Rodger, A., Hannon, M. J., & Bolhuis, A. (2009). Antimicrobial activity of an iron triple helicate. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 469-472. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.031>
- Rjafallah, A., Hsini, H., Ghazlani, H., Barhmi, R., & Kharbach, A. (2007). Flore vaginale: nature et prise en charge des déséquilibres. *Espérance médicale*, 14(143), 500-502.
- Roberts, M. C., Wagenvoort, J. H., van Klingeren, B., & Knapp, J. S. (1988). tetM- and beta-lactamase-containing *Neisseria gonorrhoeae* (tetracycline resistant and penicillinase producing) in The Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(1), 158.
- Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Popovic, T., & Hughes, J. M. (2001). Meningococcal Disease. *New England Journal of Medicine*, 344(18), 1378-1388. doi:10.1056/NEJM200105033441807
- Rudramurthy, R. G., Swamy, K. M., Sinniah, R. U., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*, 21(7). doi:10.3390/molecules21070836
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Medical microbiology. *McGraw Hill*, 4, 370.
- Schoen, C., Kischkies, L., Elias, J., & Ampattu, B. J. (2014). Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 114. doi:10.3389/fcimb.2014.00114
- Schwarz, S., Hood, R. D., & Mougous, J. D. (2010). What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends in microbiology*, 18(12), 531-537. doi:10.1016/j.tim.2010.09.001
- Sekhon, B. S. (2010). Matrix metalloproteinases—an overview. *Research and Reports in Biology*, 1, 1-20.
- Snyder, L. A. S., & Saunders, N. J. (2006). The majority of genes in the pathogenic *Neisseria* species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes'. *BMC Genomics*, 7, 128-128. doi:10.1186/1471-2164-7-128
- Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., Farah, C. S. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications*, 6, 6453. doi:10.1038/ncomms7453  
<https://www.nature.com/articles/ncomms7453#supplementary-information>
- Spitsbergen, J. M., & Kent, M. L. (2003). The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research-Advantages and Current Limitations. *Toxicologic pathology*, 31(Suppl), 62-87.

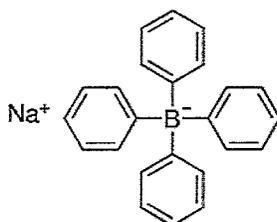
- Stephens, D. S., Greenwood, B., & Brandtzaeg, P. (2007). Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *The Lancet*, 369(9580), 2196-2210. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61016-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61016-2)
- Taha, M.-K., Claus, H., Lappann, M., Veyrier, F. J., Otto, A., Becher, D., Vogel, U. (2016). Evolutionary Events Associated with an Outbreak of Meningococcal Disease in Men Who Have Sex with Men. *PLOS ONE*, 11(5), e0154047. doi:10.1371/journal.pone.0154047
- Taha, M.-K., & Deghmane, A. E. (2010). Vaccins anti-méningococciques et développement des vaccins contre le méningocoque B. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 13(2), 156-160.
- Tapsall, J. W., Ndowa, F., Lewis, D. A., & Unemo, M. (2009). Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 7(7), 821-834. doi:10.1586/eri.09.63
- Tzeng, Y.-L., Bazan, J. A., Turner, A. N., Wang, X., Retchless, A. C., Read, T. D., Stephens, D. S. (2017). Emergence of a new *Neisseria meningitidis* clonal complex 11 lineage 11.2 clade as an effective urogenital pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), 4237-4242. doi:10.1073/pnas.1620971114
- Unemo, M., Golparian, D., Nicholas, R., Ohnishi, M., Gallay, A., & Sednaoui, P. (2012). High-Level Cefixime- and Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA Mosaic Allele in a Successful International Clone Causes Treatment Failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1273-1280. doi:10.1128/AAC.05760-11
- Unemo, M., & Nicholas, R. A. (2012). Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiology*, 7(12), 1401-1422. doi:10.2217/fmb.12.117
- Unemo, M., & Shafer, W. M. (2014). Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 587-613. doi:10.1128/CMR.00010-14
- Veyrier, F. J., Biais, N., Morales, P., Belkacem, N., Guillhen, C., Ranjeva, S., Boneca, I. G. (2015). Common Cell Shape Evolution of Two Nasopharyngeal Pathogens. *PLOS Genetics*, 11(7), e1005338. doi:10.1371/journal.pgen.1005338
- Vidic, J. (2013). Nanoparticules pour des applications antibactériennes, antifongiques et antivirales.
- Wandersman, C. (1996). Secretion across the bacterial outer membrane. *Escherichia and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 1, 955-966.
- Wi, T., Lahra, M. M., Ndowa, F., Bala, M., Dillon, J.-A. R., Ramon-Pardo, P., Unemo, M. (2017). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS medicine*, 14(7), e1002344.
- Wong, E., & Giandomenico, C. M. (1999). Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chemical Reviews*, 99(9), 2451-2466. doi:10.1021/cr980420v

- World Health, O. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. In *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008*.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27.
- Zahar, J. R., & Lesprit, P. (2014). Management of multidrug resistant bacterial endemic. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(9), 405-411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.07.006>
- Zarantonelli, Maria L., Skoczynska, A., Antignac, A., El Ghachi, M., Deghmane, A.-E., Szatanik, M., Boneca, Ivo G. (2013). Penicillin Resistance Compromises Nod1-Dependent Proinflammatory Activity and Virulence Fitness of *Neisseria meningitidis*. *Cell Host & Microbe*, 13(6), 735-745. doi:10.1016/j.chom.2013.04.016
- Zaslloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389. doi:10.1038/415389a

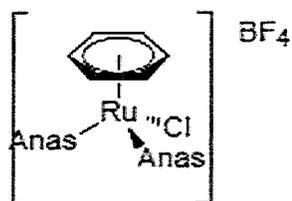
# ANNEXE

## Structures chimiques des composés organométalliques de l'étude

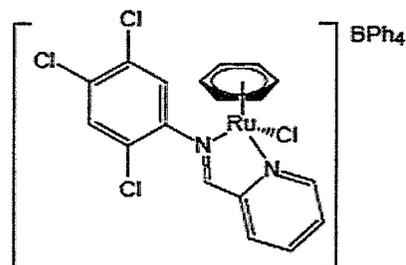
1. NaBPh<sub>4</sub> : Sodium tétraphénylborate



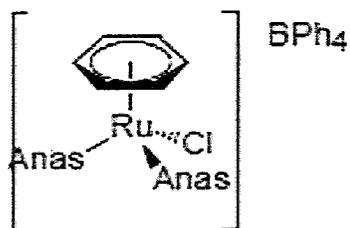
2. AnII-17 :



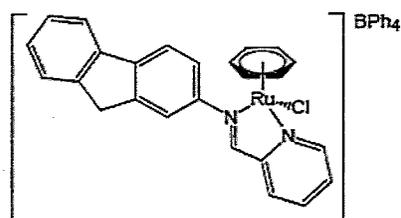
4. AnIII-6 :



3. AnII-18 :



5. AnIII-7 :



6. AnIII-8 :

