



**HAL**  
open science

# Isolement d'anticorps monoclonaux humains à visée thérapeutique contre le système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa*

Jean-Mathieu Desveaux

## ► To cite this version:

Jean-Mathieu Desveaux. Isolement d'anticorps monoclonaux humains à visée thérapeutique contre le système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa*. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV092 . tel-04086759

**HAL Id: tel-04086759**

**<https://theses.hal.science/tel-04086759>**

Submitted on 2 May 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Unité de recherche : Institut de Biologie Structurale

**Isolement d'anticorps monoclonaux humains à visée thérapeutique contre le système de sécrétion de type III de Pseudomonas aeruginosa**

**Therapeutic human monoclonal antibodies isolation against the Type III secretion system of P.aeruginosa**

Présentée par :

**Jean-Mathieu DESVEAUX**

Direction de thèse :

**Pascal POIGNARD**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Andréa DESSEN**

CNRS

Co-directrice de thèse

Rapporteurs :

**Patrick PLESIAT**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Franche-Comté

**Stéphanie SIMON**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Paris-Saclay

Thèse soutenue publiquement le **6 décembre 2022**, devant le jury composé de :

**Pascal POIGNARD**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Patrick PLESIAT**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Franche-Comté

Rapporteur

**Stéphanie SIMON**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Paris-Saclay

Rapporteuse

**Roger LEGRAND**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Paris-Saclay

Examineur

**Jean-Luc LENORMAND**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Examineur - Président du jury

**Andréa DESSEN**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Co-directrice de thèse





**Isolement d'anticorps monoclonaux  
humains à visée thérapeutique contre le  
système de sécrétion de type III de  
*Pseudomonas aeruginosa*.**

**Sous la direction d'Andrea Dessen et de  
Pascal Poignard**

**Préparée à l'Institut de Biologie Structure de Grenoble**

# Préambule

L'ensemble des données présentées dans ce manuscrit seront prochainement sujettes à publication.

# Remerciement

Aux membres du Jury pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement le Professeur Patrick Plésiat et la Docteure Stéphanie Simon pour leur relecture critique de mon manuscrit de thèse.

À mes parents et mon frère pour m'avoir toujours poussé à suivre ma curiosité et ce, depuis mon plus jeune âge, et de m'avoir soutenu lors de ces longues années d'études.

À mes directeurs de thèse, Andréa et Pascal, pour m'avoir confié ce projet et m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

À Pascal, mon directeur de thèse, ta passion de la science, palpable et inspirante, m'aura guidé tout au long de cette thèse. Merci pour ta patience, ton accessibilité et de m'avoir transmis ta rigueur scientifique aiguisée (on peut faire une bonne blague).

À Andréa, ma directrice de thèse, pour ta bienveillance, ton soutien et ton enthousiasme sans faille qui ont permis d'éclairer le long chemin fort sinueux qu'a été cette thèse. Merci pour tout.

Aux GAEC, Gauthier, Rémi, Jules, Félix, Julian, Martin, Victor, Nonette, Etienne, Bastien, Louïc et Victor que je n'ai malheureusement pu voir qu'à de trop rares occasions. Merci pour toutes ces grosses marades malgré la distance.

À l'AS J&J, Till, Tue, Rasmus, Lucas, Seb, Fred, Bertrand et bien d'autres pour ces sessions enflammées à taper le carton qui m'auront bien changées les idées après de longues journées de manip.

À mes co-thésards et camarades de paillasse, Quentin pour m'avoir tout appris de la biochimie et m'avoir accompagné lors de ces longues soirées purif, Kévin pour ta bonne humeur inébranlable, Romy pour la grande aventure de la spike SARS-COV2 et des gels fi incessantes, Benjamin pour le fou rire du répertoire anticorps simulé et Axelle pour ces pauses café salvatrices pleines de fou-rire, de mauvaise humeur et de sarcasmes.

À Isabelle, pour ta disponibilité et ton aide précieuse autant sur le plan scientifique qu'administratif qui m'a sauvé plus d'une fois.

A Sebas, por su inestimable ayuda en citometría y su indefectible disponibilidad para resolver dudas

À mes collègues des équipes PATBAC et CAID pour leur accueil, leurs conseils et leur aide.

À Jérôme-Harfang Vengeur pour son légendaire sens de la punchline et son humour.. tranchant ?

À Mickaël pour avoir accepté d'être mon tuteur de CST au pieds levé, pour ton intérêt pour le projet et ta bienveillance.

À Ina pour m'avoir permis de collaborer avec l'équipe PBRC dans les meilleures conditions et pour son enthousiasme communicatif et réconfortant.

À François, pour son aide et implication sur la partie fonctionnelle du projet, ses conseils et pour les discussions très intéressantes qui en ont découlé et avec qui ce fut un plaisir de travailler.

À Stéphanie et Viviana pour leur disponibilité, leur accessibilité et leur contribution au projet.

À l'ensemble de l'équipe PBRC pour leur accueil chaleureux, leur conseil avisé et leur bienveillance qui m'ont fait me sentir à l'aise comme dans une 3<sup>ème</sup> équipe. Merci à vous tous.

À Yvan, pour son implication dans la réalisation du protocole ABAC sans lequel cette thèse n'aurait pas été possible.

À Ségo, merci d'avoir toujours été là.

Je dédie cette thèse à mon grand-père Claude, qui restera pour moi un modèle de courage, de résilience et d'humilité.





# Table des matières

<b>Abréviations :</b>	<b>1</b>
<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>Chapitre I : Bactéries pathogènes et Antibiorésistance</b>	<b>2</b>
La résistance aux antibiotiques, menace émergente pour la santé publique	2
Principales alternatives aux antibiotiques	5
1.1 Phagothérapie	5
1.2 Peptides antimicrobiens	7
1.3 Anticorps	8
<b>Chapitre II : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, un pathogène prioritaire pour le développement d'alternatives thérapeutiques</b>	<b>9</b>
Taxonomie et description générale	9
Contexte et prévalence clinique des infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Mécanismes de résistance aux antibiotiques et limite des stratégies thérapeutiques disponibles contre <i>P. aeruginosa</i>	12
1.1 Mécanismes intrinsèques	12
1.2 Mécanismes acquis	13
Facteurs de virulences de <i>P.aeruginosa</i>	15
1.3 Pili de type IV et flagelle	16
1.4 Lipopolysaccharides	17
1.5 Exopolysaccharides	17
1.6 Biofilm	18
1.7 Quorum sensing	18
1.8 Siderophores	19
1.9 Pyocyanine	19
1.10 Systèmes de sécrétions de <i>P.aeruginosa</i>	20
1.10.1 Système de sécrétion en 1 étape	20
(a) <b>Système de sécrétion de type I</b>	20
(b) <b>Système de sécrétion de type III</b>	21
(c) <b>Système de sécrétion de type VI</b>	21
1.10.2 Système de sécrétion en 2 étapes	22
(d) <b>Système de sécrétion de type II</b>	22
(e) <b>Système de sécrétion de type V</b>	23
Le système de sécrétion de type III, facteur de virulence majeur de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.11 Description générale du système	24
1.11.3 L'aiguille du SSTIII de <i>P.aeruginosa</i>	26
1.11.4 Le translocon du SSTIII de <i>P.aeruginosa</i>	26
1.11.5 Effecteurs du SSTIII de <i>P.aeruginosa</i>	27
1.12 Implication du système de sécrétion de type III dans l'infection à <i>P. aeruginosa</i>	29
<b>Chapitre III : Les anticorps monoclonaux, alternative thérapeutique contre les bactéries résistantes</b>	<b>30</b>
Les anticorps	30
1.1 Structure	30
Mécanismes d'action	32
1.2 Fonctions effectrices.	32
1.2.1 Mécanismes d'action directs	33
Utilisation des anticorps en thérapie	34
1.3 Thérapie sérique et anticorps polyclonaux	34
1.4 Immunothérapie à base d'anticorps monoclonaux	36
1.5 Anticorps monoclonaux dans le traitement des infections bactériennes	39

1.5.2	Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA	39
1.5.3	Anticorps en essais cliniques	40
	Méthodes de développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques	41
1.6	Hybridomes	42
1.7	Phage display	43
1.8	Isolement d'anticorps monoclonaux par tri de lymphocytes B mémoires	45
1.9	Souris transgéniques humanisées possédant un répertoire d'immunoglobuline humaine	47
<b>Chapitre IV : Le système de sécrétion de type III, une cible attractive pour le développement d'anticorps monoclonaux humains contre P. aeruginosa</b>		<b>49</b>
	PcrV comme cible pour le développement d'anticorps monoclonaux	49
	Anticorps monoclonaux Anti-PcrV	50
1.1	Mab166, anticorps monoclonal murin anti-PcrV	50
1.2	KB001-A	52
1.3	V2L2MD	54
1.4	MEDI3902	55
<b>Projet de thèse :</b>		<b>59</b>
<b>1) Contexte</b>		<b>59</b>
<b>2) Sujet de thèse :</b>		<b>60</b>
<b>Matériel et méthodes :</b>		<b>61</b>
	Obtention des plasmides pET15b(His-PcrV) et pET22B(PscF-His)	62
	Construction pESPRIT001-His-PcrV-Avitag	62
	Construction pESPRIT002-His-PscF-Avitag	62
	Expression et purification de pET15b(His-PcrV)	63
	Expression et purification de pESPRIT(His-PcrV-Avitag)	63
	Expression et purification de pET22b-PscF-His	64
	Expression et purification de pESPRIT(His-PscF-Avitag)	65
	Protocole de recherche ABAC-IBS	65
	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	66
	ELISA de compétition contre His-PcrV	67
	Test d'infection des A549 avec la souche CHAdeltaExoSattB : exoS-bla en présence de sérums humains de patients atteints de mucoviscidose et de solution d'IgG purifiées à partir de ces sérums.	68
	Biotinylation de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag	69
	Déplétion des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag des solutions d'IgG totales des donneurs	70
	Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à partir du sang total	71
	Isolement d'anticorps monoclonaux à partir de cellules mononuclées du sang périphérique	72
1.1	Tri direct de lymphocytes B mémoires exprimant à leurs surfaces des anticorps spécifiques des PcrV et PscF recombinants	72
1.2	Amplification des gènes d'immunoglobulines à partir de l'ARNm de cellule unique.	73
1.3	Clonage et production d'anticorps monoclonaux	74
	Mutagenèse de chaînes lourdes de l'anticorps monoclonal S4P5B3Hc	75
	Production et purification du fragment Fab S4P5B3Fab	76
	Mesure d'affinité des anticorps monoclonaux par Bio Layer Interferometry (BLI)	76
	Préparation et criblage de conditions de cristallisation du complexe S4P5B3Fab-HisPcrV	77
<b>Résultats</b>		<b>78</b>
	Production et purification des antigènes recombinants	78
1.1	Purification de His-PcrV-Avitag	78
1.2	Purification de His-PscF-Avitag	80
	Constitution de la cohorte de patients	81
1.3	Criblage des sérums par ELISA	81
1.4	Criblage fonctionnel par test d'inhibition d'injection d'ExoS.	85
	Déplétions des anticorps spécifique de PcrV et PscF des IgG polyclonaux	86
1.5	Vérification de l'efficacité de déplétion par ELISA Direct	86

Comparaison de l'activité fonctionnelle des IgG non-déplétés et des IgG déplétées des protéines recombinantes	89
Biotinylation de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag	93
Tri cellulaire de cellules B mémoires spécifiques de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag par cytométrie en flux.	95
1.6 Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique	95
Production d'anticorps monoclonaux humains	98
1.7 Amplification des gènes d'immunoglobulines par PCR imbriquées	98
1.8 Clonage et production des anticorps monoclonaux	99
Criblage des anticorps monoclonaux par ELISA contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag	100
Alignement des séquences de chaînes d'immunoglobulines sur IMGT	101
Criblage fonctionnel des anticorps monoclonaux	103
Caractérisation des anticorps monoclonaux fonctionnels anti-PcrV isolés	105
1.9 Cartographie des épitopes par ELISA de compétition	105
1.10 Reconnaissance par S4P5B3 et S4P3D6 de variants de PcrV.	106
1.11 Mesure de l'affinité par Bio-layer interferometry (BLI)	109
1.12 Purification du complexe His-PcrV/S4P5B3fab	111
<b>Discussion et perspectives</b>	<b>115</b>
Réponses anticorps anti-PcrV et anti-PscF chez les sujets infectés par <i>P.aeruginosa</i> .	115
Isolement d'anticorps monoclonaux spécifiques de PcrV et PscF.	116
Les anticorps monoclonaux anti-PscF.	118
Les anticorps monoclonaux anti-PcrV	119
S1P3G9 et S4P5E10 : des anticorps sans activité d'inhibition du SSTIII ?	119
S4P5B3 et S4P3D6 : anticorps monoclonaux humains inhibiteurs du SSTIII.	120
Activité des anticorps monoclonaux isolés, en dehors de l'inhibition du SSTIII.	122
Amélioration des approches d'isolement d'anticorps inhibiteurs du SSTIII.	123
Conclusion	124
<b>Annexes</b>	<b>125</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>130</b>

# Abréviations :

ABC : ATP-binding-cassette

Ac : anticorps

ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity

ADCP : Antibody Dependent Cell Phagocytosis

ADPRT : ADP ribosyl transférase

BCR : B cell receptor

CET : Chromatographie d'exclusion de taille

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESKAPE : Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp

FcRn : Neonatal Fc receptor

GAP : GTPase activating protein

IgG : Immunoglobuline G

J Region : Joining Region

LPS : lipopolysaccharides

MDR : multi-drug resistant

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Protective antigen

PNAG : poly- $\beta$ -1,6-N-acetylglucosamine

RND : Resistance-Nodulation-Cell-Division

Scfv : single chain fragment variable

spA : Staphylococcal protein A

SVF : Sérum de Veau Fœtal

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

SSTX : Système de sécrétion de type X

Tat : twin-arginine translocation

TLR : Toll-like receptor

Tsp : Two-partner protein

V Region : Variable Region

XDR : extensively drug-resistant

# Introduction

## Chapitre I : Bactéries pathogènes et Antibiorésistance

### **La résistance aux antibiotiques, menace émergente pour la santé publique**

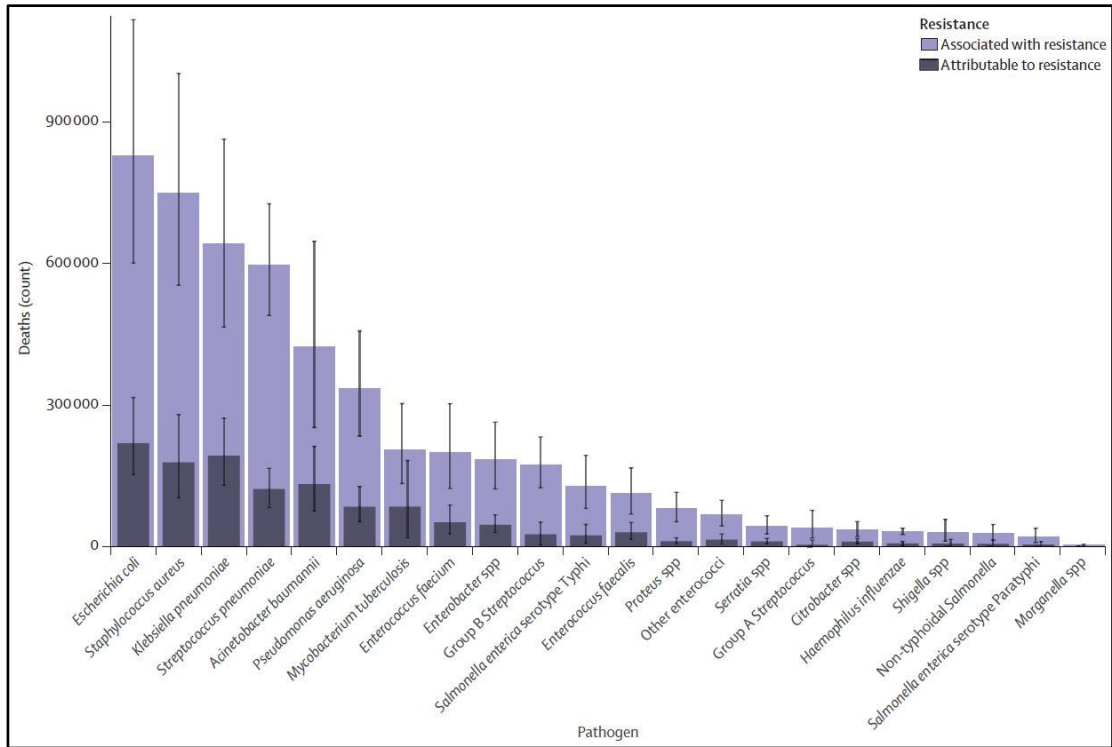
L'usage disproportionné des antibiotiques en thérapie et en agronomie durant le XX<sup>ème</sup> siècle et le début du XXI<sup>ème</sup> a eu pour effet d'accélérer la résistance bactérienne aux antibiotiques et de l'étendre à un nombre croissant de souches pathogènes.

Il existe plusieurs niveaux de résistance qui sont définis en fonction du nombre de classes d'antibiotiques auxquels la souche résiste. Une classe ou famille d'antibiotiques regroupe des molécules ayant des structures chimiques et des mécanismes d'actions similaires. Par exemple la famille des  $\beta$ -lactamines possède un noyau  $\beta$ -lactame et agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (TIDWELL, 2008). Les bactéries classées comme MDR (pour « multi drug-resistant ») sont non-susceptibles à au moins un antibiotique parmi 3 classes ou plus.

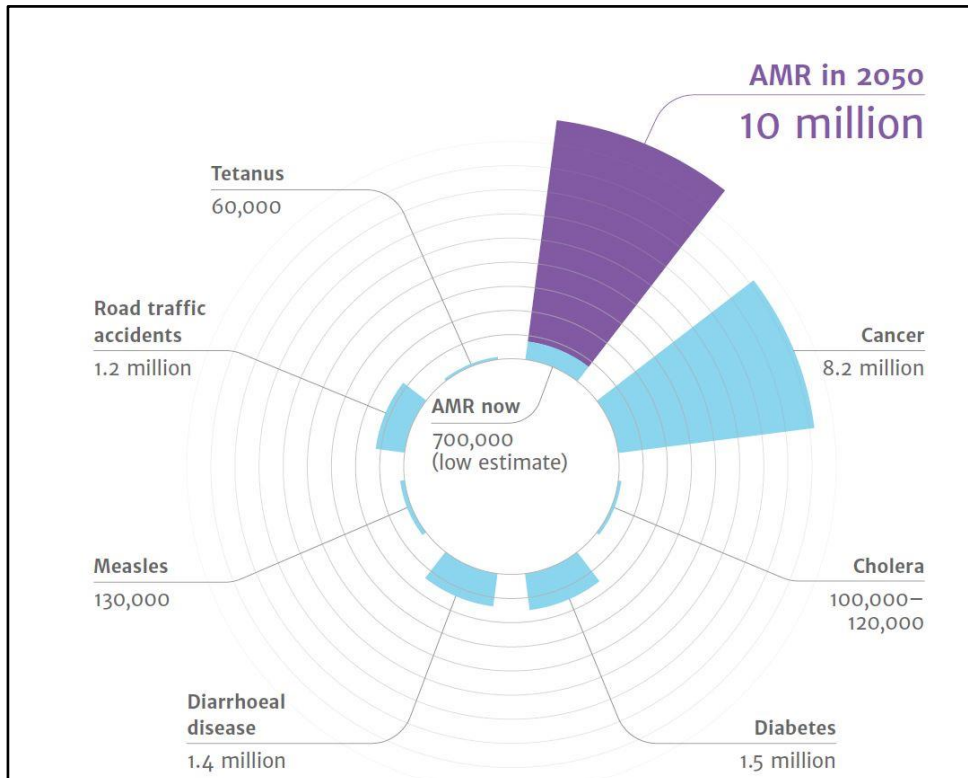
Les bactéries XDR (pour « extensively drug-resistant ») sont résistantes à au moins un agent de chacune des classes d'antibiotiques, sauf pour deux classes ou moins. Enfin, les bactéries PDR (pour « pan drug-resistant ») résistent à tous les agents de toutes les classes d'antibiotiques utilisés cliniquement (MAGIORAKOS et al, 2012).

En 2019, on a estimé à 4,95 millions le nombre de décès associés à la résistance aux antibiotiques, dont 1,27 million directement imputable à la résistance (MURRAY et al, 2022) (Figure 1 A). Selon des projections effectuées par l'OMS, ce nombre de décès pourrait s'élever à 10 millions par an d'ici à 2050 et occasionner un coût financier de 100 milliards de dollars si aucune contre-mesure n'est prise afin d'endiguer cette menace rampante pour la santé publique (O'NEILL, 2016) (Figure 1 B).

**A**



**B**



**Figure 1 : Nombre de décès associés aux infections de bactéries résistantes aux antibiotiques. A) Nombre de décès associés et attribués à la résistance aux antibiotiques par pathogène en 2019 (MURRAY et al, 2022) B) Projection du nombre de décès dans le monde selon diverses causes d’ici à 2050. La résistance aux antibiotiques pourrait causer 10 millions de décès par an en 2050 et serait la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité dans le monde (O’Neill et al, 2016)**

En 2017, un conseil d'expert mandaté par l'OMS a publié un rapport listant des pathogènes pour lesquels il est urgent de développer de nouveaux antibiotiques, en particulier avec de nouveaux mécanismes d'action (TACCONELLI et al, 2018). La majeure partie des pathogènes cités appartient aux germes ESKAPE, un acronyme popularisé par une publication de Louis B. Rice datant de 2008 et désignant les bactéries pathogènes les plus résistantes aux traitements antibiotiques : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et la famille des *Enterobacter sp* (RICE et al, 2008).

Les problèmes de santé publique posés par la résistance aux antibiotiques des pathogènes ESKAPE sont multiples. Ces bactéries entraînent dans la plupart des cas des infections nosocomiales, notamment chez les sujets immunodéprimés et ceux hospitalisés dans les unités de soins intensifs. La résistance aux antibiotiques augmente la fréquence de ces infections, rallonge les durées d'hospitalisation, entraîne une surmortalité. Les conséquences économiques sont considérables : le coût annuel occasionné par ces infections aux États-Unis s'élève à 55 milliards de dollars, dont 20 milliards de frais supplémentaires pour le système de santé et 35 milliards en termes de perte de productivité (SMITH et al, 2013). Au sein de l'Union européenne, on estime ce coût à 1,1 milliard d'euros pour l'année 2020 (WHO REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2022–2020 Data).

Malgré l'urgence de la situation, la recherche et développement sur les molécules antimicrobiennes représente moins de 5% des investissements dans le domaine pharmaceutique (O'NEILL, 2016). Ce manque d'engouement peut notamment s'expliquer par la difficulté et le coût de telles recherches qui rendent peu attractifs les investissements dans ce domaine malgré l'urgence de la situation. Ainsi cette recherche connaît un « vide de découverte » depuis les années 1980, les antibiotiques en essai clinique aujourd'hui étant des dérivés de classes existantes (GOULD et al, 2009) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis) (THEURETZBACHER et al, 2020).

Devant l'absence de progrès dans la mise au point de nouveaux antibiotiques, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques est une priorité. De nombreuses pistes ont été proposées dont les principales sont détaillées ci-dessous.

## **Principales alternatives aux antibiotiques**

De nombreuses approches thérapeutiques alternatives aux antibiotiques ont été proposées telles que l'utilisation de bactériophages (SULAKVELIDZE et al, 2001) (Matsuzaki et al, 2005), de molécules antibactériennes comme les bactériolysines (FISCHETTI et al, 2008) et les peptides antimicrobiens (Bahar et REN, 2013) ou des molécules du système immunitaire comme les anticorps (MOTLEY et al, 2019) (WANG et al, 2022). Nous nous concentrerons sur les 3 principales approches développées à ce jour : phagothérapie, les peptides antimicrobiens et les anticorps.

### **1.1 Phagothérapie**

Les bactériophages sont des virus qui infectent exclusivement les bactéries, avec une grande spécificité d'hôte. La spécificité est conditionnée par la nature des récepteurs, des molécules exprimées à la surface des bactéries permettant l'adsorption du phage sur la paroi (HYMAN et al, 2010). On distingue les monophages, qui ne reconnaissent qu'un type de récepteur et les polyphages, qui en reconnaissent plusieurs.

La découverte des bactériophages date de plus d'un siècle et avait été envisagée comme piste thérapeutique contre les infections bactériennes avant d'être abandonnée à la suite de la découverte des antibiotiques (SULAKVELIDZE et al, 2001). Cette approche a cependant connu un récent regain d'intérêt à la suite de la prise de conscience de la menace suscitée par la résistance aux antibiotiques (SUMMERS, 2012).

On distingue deux types de phages sur la base de leur cycle de vie : les phages lytiques et les phages lysogéniques. Les phages lytiques stricts vont infecter et se répliquer dans la cellule hôte jusqu'à la lyse de celle-ci par rupture de la membrane plasmique et de la paroi, permettant alors la libération de virions.



Leur rapidité et efficacité d'action sont préférées aux phages lysogéniques qui s'intègrent dans le génome de leur hôte et qui ne rentrent en phase lytique qu'en réponse à un stress. En plus d'avoir une action plus tardive, ils ont l'inconvénient de pouvoir également être des vecteurs pour des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques (BOYD et al, 2002) (CHEN et al, 2009).

La phagothérapie comporte plusieurs avantages par rapport à l'antibiothérapie conventionnelle. La possibilité de spécificité pour une espèce ou même une souche précise de bactéries élimine le risque d'effets secondaires liés à un éventuel ciblage du microbiote ou encore des cellules eucaryotes (ABHILASH et al, 2009). La forte capacité de prolifération des phages permet leur utilisation à faible dose tout en permettant une forte concentration au site de l'infection (DOMINGO-CALAP et al, 2018). De plus, les phages peuvent être utilisés sur des sites normalement difficiles à traiter grâce à leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (WITTEBOLE et al, 2014) ou à pénétrer les biofilms bactériens (KUTTER et al, 2010).

Contrairement aux antibiotiques, ils ont également l'avantage d'avoir un coût de production faible ce qui les rend intéressants pour une utilisation à grande échelle (ABHILASH et al, 2009) et permettrait également de faire baisser le coût global des infections bactériennes. Enfin, la nature virale du phage lui permet de co-évoluer avec son hôte ce qui permettrait de contrecarrer le développement de résistance de la bactérie (PIRNAY et al, 2018).

Il existe cependant certaines limites et prérequis à l'utilisation de phages pour traiter les infections bactériennes. Tout d'abord, la spécificité des phages peut être un inconvénient, il est nécessaire d'identifier précisément la souche bactérienne à l'origine de l'infection pour utiliser le phage correspondant dans le traitement. Cela peut s'avérer compliqué en pratique dans les hôpitaux où chaque patient devrait recevoir une thérapie personnalisée. L'utilisation d'un cocktail de phages pourrait permettre de contourner cette limite (CHAN et al, 2013). Malgré la capacité d'adaptation des phages discutée précédemment, des cas de résistance chez la bactérie ont été observés (OECHSLIN et al, 2018) compliquant ainsi le traitement. Des mécanismes tels que la modification de la composition de la paroi bactérienne qui empêche l'adsorption des phages, l'inhibition de l'entrée du matériel génétique ou la dégradation des acides nucléiques phagiques, permettent d'expliquer cette résistance (LABRIE et al, 2010).

Cette approche alternative reste cependant prometteuse pour la lutte contre les bactéries multi-résistantes. Les essais cliniques menés jusqu'à présent visant à mesurer l'efficacité de phagothérapie dans un grand nombre d'infections bactériennes ont rencontré des succès variables (SYBESMA et al, 2018).

Plusieurs cas cliniques rapportent l'efficacité de cocktails de phage dans le traitement d'infection par des bactéries ESKAPE comme *A. baumannii* (SCHOOLEY et al, 2017) (LAVERGNE et al, 2018), *S. aureus* (FISH et al, 2016) ou encore *P. aeruginosa* (JENNES et al, 2017) menant à une forte réduction voire l'élimination complète de la charge bactérienne.

Cependant, les phages étant des virus, ils ne sont pas exempts de réponse immunitaire à leur égard (Van BELLEGHEM et al, 2018). La production d'anticorps neutralisants dirigés contre les phages peut fortement diminuer leur efficacité en thérapie. Une étude récente rapporte qu'un patient traité par phagothérapie contre *Mycobacterium abscessus* a développé une réponse IgA et IgG contre le cocktail de phages utilisé, ce qui a limité l'efficacité de la thérapie (DEDRICK et al, 2021).

Un manque d'information sur l'effet du traitement par les phages sur l'Homme et la formulation thérapeutique optimale subsiste cependant. Une optimisation de cette approche ainsi que de nouveaux essais pourraient permettre de finalement valider la phagothérapie comme stratégie thérapeutique viable pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (SYBESMA et al, 2018) (Liu et al, 2021).

## **1.2 Peptides antimicrobiens**

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont une classe de molécules du système immunitaire inné présente dans tous les règnes du vivant (MAHLAPUU et al, 2016). Ce sont des oligopeptides contenant jusqu'à 100 acides aminés, généralement chargés positivement avec des propriétés amphipathiques (présence d'une région hydrophile et d'une région hydrophobe) (HARRIS et al, 2009). Ces peptides possèdent une large variété de fonctions dues à leur grande diversité d'organismes d'origine, et à leurs propriétés physico-chimiques et structurelles.

Dans le cadre des infections bactériennes, les AMP interagissent avec la membrane bactérienne chargée négativement, la déstabilise et entraîne la lyse de la bactérie (MORETTA et al, 2021). Les AMP ont par ailleurs diverses autres fonctions complémentaires liées à la modulation du système immunitaire, à l'angiogenèse ou à la réduction de l'inflammation (KOSIKOWSKA et al, 2016).

Le mode d'action principal des AMP basé sur des interactions électrostatiques engendrant des dommages mécaniques, ainsi que leurs autres possibles modes d'action leur confèrent une efficacité à large spectre tout en diminuant le risque de résistance, faisant de ces molécules des candidats attractifs pour le développement de nouvelles stratégies antibactériennes (PFALZGRAFF et al, 2018).

Leur nature peptidique les rend cependant sensibles aux protéases, aux variations de pH et de sels, ce qui peut limiter leur usage en thérapie. Comme les antibiotiques, leur action à large spectre pourrait endommager le microbiote. Bien qu'ils n'interagissent pas avec les cellules eucaryotes de charge neutre, l'absence de toxicité de ces agents reste à confirmer (LAVERTY et al, 2011) (SEO et al, 2012). Enfin, leur coût de production peut s'avérer prohibitif pour un usage thérapeutique (SEO et al, 2012). Des essais cliniques en cours visent à confirmer l'efficacité des AMP dans le traitement de bactéries réfractaires aux traitements antibiotiques. Les principaux problèmes rencontrés lors de ces essais sont similaires à ceux cités précédemment : coût de production, faible stabilité et cytotoxicité. Plusieurs solutions ont été proposées afin de pallier ces limites, comme l'utilisation de liposomes pour leur délivrance, la modification des peptides permettant d'améliorer leur biodisponibilité et leur efficacité ainsi que l'optimisation des doses et des modes d'administration (DIJKSTEEL et al, 2021). Avec l'existence d'un réservoir conséquent d'AMP dans le règne du vivant et la possibilité de synthèse de nouvelles molécules, cette stratégie alternative reste attractive pour la lutte contre l'antibiorésistance bien que de plus amples travaux restent nécessaires.

### **1.3 Anticorps**

Les anticorps constituent une classe de molécules très prometteuse dans le traitement d'infection causées par des bactéries multi-résistantes. Ils représentent l'approche que nous avons choisie de développer pour ce travail de thèse, par le ciblage de facteurs de virulence, et seront traités en détail à la suite au chapitre III.

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène prioritaire pour le développement d'alternatives thérapeutiques

### Taxonomie et description générale

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est un bacille à Gram négatif mobile, hétérotrophe et aérobic. Cette bactérie est capable d'utiliser plus de 100 molécules organiques comme source de carbone et/ou d'énergie (DIGGLE et WHITELEY, 2020) ; sa température de croissance optimale est de 37°C, mais elle tolère des températures variant de 15°C à 42°C. Cette grande versatilité lui permet de vivre dans de nombreuses niches écologiques et de coloniser une large variété d'hôtes (animaux, plantes et humains) (COGGAN et al, 2012).

*P.aeruginosa* peut utiliser plusieurs systèmes de sécrétion, des nanomachines macromoléculaires capable de sécréter de nombreux substrats remplissant de nombreuses fonctions telles que la récupération de nutriments, la colonisation d'hôtes et la compétition inter-bactérienne. Ces systèmes participent grandement à la survie de la bactérie dans son environnement (FILLOUX, 2011).

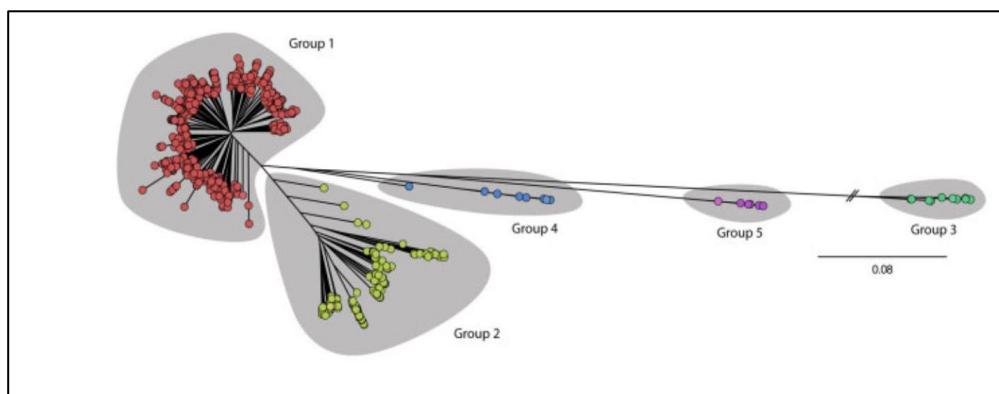
Le génome de *P. aeruginosa* est de taille conséquente et varie de 5,5 à 7 Mb (KLOCKGETHER et al, 2011). On distingue le génome principal qui est fortement conservé d'une souche à l'autre et le génome accessoire qui est d'une grande variabilité entre les souches (Kung et al, 2010). Le génome accessoire est inséré dans le génome principal à des loci privilégiés appelés régions de plasticité génomique (MATHEE et al, 2008). Le génome accessoire est principalement composé d'éléments génétiques mobiles : intégrons, transposons, plasmides, phages et prophages. L'acquisition de ces éléments par transfert horizontal est un facteur important d'évolution du génome de *P. aeruginosa* (KUNG et al, 2010). De plus, une importante proportion des gènes de *P. aeruginosa* est consacrée à la régulation (STOVER et al, 2000) (Huang et al, 2019) permettant une forte capacité d'adaptation.

Une étude récente basée sur la comparaison de 1311 génomes a permis de distinguer 5 groupes distincts d'isolats de *P. aeruginosa*. Parmi ceux-ci, trois groupes étaient déjà connus, disposant chacun d'une souche de référence, et deux groupes ont été nouvellement identifiés (FRESCHI et al, 2019) (Figure 2).

Le génome de PAO1, souche de référence du groupe 1, fut le premier à être entièrement séquencé (STOVER et al, 2000). La souche de référence du groupe 2, PA14, partage une forte homologie de son génome principal avec PAO1 (LEE et al, 2006). Cet isolat se démarque cependant par sa forte cytotoxicité due à la présence d'un effecteur particulier du système de sécrétion de type III (SSTIII) (le SSTIII est considéré comme une composante majeure de la virulence de *P. aeruginosa* et sera décrit en détail au chapitre III). Cet effecteur ExoU caractéristique du groupe 2 est une phospholipase hautement toxique pour les cellules de mammifères (OZER et al, 2019).

Le groupe 3 possède une divergence significative avec les groupes 1 et 2 (FRESCHI et al, 2019). La souche de référence de ce groupe nommée PA7 a initialement été isolée en Argentine et possède un spectre étendu de résistance aux antibiotiques (ROY et al, 2010). Aucun phénotype de virulence n'a été décrit pour PA7, qui ne possède pas de SSTIII (COBURN et al, 2007) (HAUSER et al, 2009) (ROY et al, 2010). Cependant, CLJ1, un isolat proche de PA7, a été décrit pour avoir causé une pneumonie hémorragique chez un patient en soins intensifs (ELSEN et al, 2014). La forte pathogénicité de cette souche résulte de la sécrétion de l'exolysine A (ExlA), une protéine de la famille hémagglutinine/hémolysine qui forme des pores dans le cytoplasme des cellules de mammifères (BASSO et al, 2017) (REBOUD et al, 2017) (BERTRAND et al 2020)

Enfin, les groupes 4 et 5 se situent entre les groupes 1-2 et 3 en termes d'homologie de génome principal et ne possèdent pas de souches de référence à l'heure actuelle (FRESCHI et al, 2019).



**Figure 2** : Arbre phylogénétique des groupes de *P. aeruginosa* basé sur l'analyse de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) du génome de 1311 isolats. Les différents groupes sous coloriés en gris. (FRESCHI et al, 2019).

## **Contexte et prévalence clinique des infections à *Pseudomonas aeruginosa***

La versatilité de *P. aeruginosa* permet à cette bactérie d'infecter une grande variété de tissus (LYCZAK et al, 2000) expliquant sa prévalence dans les infections nosocomiales en tant que pathogène opportuniste, infectant notamment les patients atteints de mucoviscidose (DE BENTZMAN and PLESIAI, 2011), les patients en soins intensifs (ORTEGA et al, 2004), les patients immunodéprimés (CARRATALA et al, 1998) ou encore les grands brûlés (CHURCH et al, 2006). Dans les unités de soins intensifs, *P. aeruginosa* est responsable de la majorité des cas de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (RAMIREZ-ESTRADA et al, 2016). Ce pathogène est également une cause importante d'infection du tractus urinaire (LAMAS FERREIRO et al, 2017), de bactériémie (MICEK et al, 2005) ainsi que d'infections de plaies (SERRA et al, 2015).

Deux études menées entre 2011 et 2014 dans des hôpitaux aux Etats-Unis rapportent que *P.aeruginosa* était associée à 7% des infections nosocomiales en plus d'être la seconde cause de pneumopathie (MAGILL et al, 2014) (WEINER et al, 2016). La bactérie est également directement et indirectement responsable d'environ 300 000 décès dus à la résistance aux antibiotiques à travers le monde en 2019, soit près de 10% des décès liés à l'antibiorésistance pour cette année (MURRAY et al, 2022).

*P. aeruginosa* est également un facteur majeur de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (FOTHERGILL et al, 2012). La bactérie colonise les patients dès l'enfance et s'établit rapidement de façon chronique. La prévalence de la bactérie augmente avec l'âge pour atteindre environ 50% à l'âge adulte (Registre français de la mucoviscidose, 2022) (Cystic Fibrosis Canada, 2022). La progression de l'infection va causer une perte progressive des fonctions pulmonaires menant au décès du patient (DAVIES et al, 2006). Les traitements actuels ne sont malheureusement pas en mesure d'empêcher l'établissement d'infections chroniques chez ces patients.

## **Mécanismes de résistance aux antibiotiques et limite des stratégies thérapeutiques disponibles contre *P. aeruginosa***

La prévalence et les conséquences cliniques des infections à *P. aeruginosa* ont été l'objet d'une inquiétude croissante ces dernières années. Cette bactérie fait partie des pathogènes prioritaires désignés par l'OMS pour lesquels de nouveaux antibiotiques sont nécessaires (TACCONELLI et al, 2018).

Ainsi, l'arsenal d'antibiotiques efficaces dans la lutte contre *P. aeruginosa* s'épuise peu à peu face à l'émergence grandissante de souches multi-résistantes (NATHWANI et al, 2014) (OLIVER et al, 2015) (HORCAJADA et al, 2019). Ce phénomène est associé à une augmentation des délais de soins, une complication des traitements et une hausse de la mortalité chez les patients.

### **1.1 Mécanismes intrinsèques**

*P. aeruginosa* est intrinsèquement résistant à certains antibiotiques en raison de propriétés acquises au cours de son évolution pour lutter contre les molécules antibactériennes rencontrées dans l'environnement.

La réduction de la perméabilité cellulaire est un des facteurs majeurs de la résistance intrinsèque, notamment aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Afin d'atteindre leur cible, ces molécules diffusent vers le périplasme via des canaux formés par les porines.

La porine OprD est une protéine membranaire impliquée dans l'acquisition de petits peptides et d'acides aminés basiques, mais elle permet également le passage de ces antibiotiques à cause de sa faible spécificité (LI et al, 2012). Une faible expression de cette porine est fréquemment observée dans les souches résistantes aux céphalosporines et aux carbapénèmes (AMIN et al, 2005) (BAUMGART et al, 2010) (TRIAS and NIKAIDO, 1990).

De plus, *P. aeruginosa* exprime plusieurs types de pompes à efflux appartenant à la famille RND (Resistance-Nodulation-Cell Division). Ces assemblages protéiques tripartites s'étendent du cytoplasme à la membrane externe, ils ont pour fonction d'évacuer de potentielles substances antimicrobiennes vers le milieu extracellulaire (NIKAIIDO et al, 2009).

On dénombre 4 assemblages de la famille RND ayant un rôle dans la résistance de *P.aeruginosa* aux antibiotiques: MexAB/OprM, MexXY/OprM, MexCD/OprJ et MexEF/OprN.

En effet, ces pompes sont capables de prendre en charge une grande variété d'antibiotiques incluant la plupart des  $\beta$ -lactamines dont certains carbapénèmes, des fluoroquinolones et des aminoglycosides (FERNÁNDEZ et al, 2012) (DREIER and RUGGERONE, 2015).

Enfin la production de la  $\beta$ -lactamase inductible nommée AmpC est également un important mécanisme de résistance. Cette enzyme, produite en réponse au traitement par certains  $\beta$ -lactamines, est capable d'inactiver la plupart des céphalosporines et des pénicillines par hydrolyse, conférant à la bactérie un niveau de résistance basal pour ces antibiotiques (BHATTACHARJEE et al, 2008) (CHEN et al, 1995).

## 1.2 Mécanismes acquis

Les traitements antibiotiques exercent une forte pression de sélection sur les bactéries, provoquant l'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance majoritairement par mutations dans le génome et par transfert horizontal de matériel génétique exogène (DAVIES et al, 2010). Les mutations qui ont un impact sur la résistance sont principalement localisées dans les gènes codant pour les cibles d'antibiotiques, les gènes impliqués de façon directe dans les mécanismes intrinsèques de résistance ou dans la régulation de ces derniers. Ainsi, des mutations qui engendrent l'inactivation d'OprD ont été observées dans des isolats cliniques résistants aux carbapénèmes (Fang et al, 2014) (LEE, et al, 2012) (GUTIÉRREZ et al, 2007). La réduction de l'expression ou l'absence d'OprD ont été décrites comme les principaux mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les souches déficientes en carbapénémases (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al, 2009). L'inactivation de répresseur des gènes codant pour les pompes à efflux joue également un rôle important dans la résistance en induisant une surexpression des pompes (LISTER et al, 2009).

Il a été montré que des mutations « perte de fonction » dans les gènes de régulation *mexR*, *nalD*, *nalB*, and *nalC* impliqués dans la répression de *MexAB/OprM* étaient corrélées avec une résistance accrue aux carbapénèmes (QUALE et al, 2006).



De même, des mutations dans les gènes codants pour AmpR et AmpD, deux répresseurs de AmpC, mènent à sa surexpression constitutive (JUAN et al, 2005) (KONG et al, 2005) (LANGAEE et al, 2000). La conséquence de cette surproduction d'AmpC élargit le spectre de résistance aux  $\beta$ -lactamines dans les isolats cliniques (SCHMIDTKE et al, 2008) (BERRAZEG et al, 2015).

Les résistances aux fluoroquinolones sont quant à elles médiées par l'apparition de mutations dans les gènes codant pour les ADN gyrases (GyrA et GyB) et de la topoisomérase IV (ParC, ParE) (LEE et al, 2005). Ces mutations concernent des domaines de ces protéines ciblées par les fluoroquinolones, procurant alors à la bactérie une forte résistance pour ces antibiotiques (BRUCHMANN et al, 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* a également acquis des gènes dont l'expression a un impact significatif sur la résistance à certains antibiotiques via le transfert horizontal. De nombreux gènes issus de transfert horizontal (généralement via des plasmides) et codant pour des  $\beta$ -Lactamases à large spectre et des carbapénèmases ont été décrits chez *P. aeruginosa* (POOLE, 2011). Le transfert horizontal de ces gènes peut même être accompagné de gènes de résistances aux aminoglycosides (DIENE et ROLAIN, 2014). La prévalence croissante de résistance acquise par transfert horizontal varie de 1 à 50% selon les hôpitaux et les zones géographiques, et fait l'objet d'une inquiétude grandissante dans le milieu médical (PATEL et al, 2011). De plus, la combinaison des différents mécanismes intrinsèques et acquis a un effet synergique sur l'efficacité et la variété des résistances de *P. aeruginosa*. Par exemple, la surexpression d'AmpC couplée à l'inactivation d'OprD confère une résistance à tout antibiotique du type  $\beta$ -lactamines (MOYÁ et al, 2012).

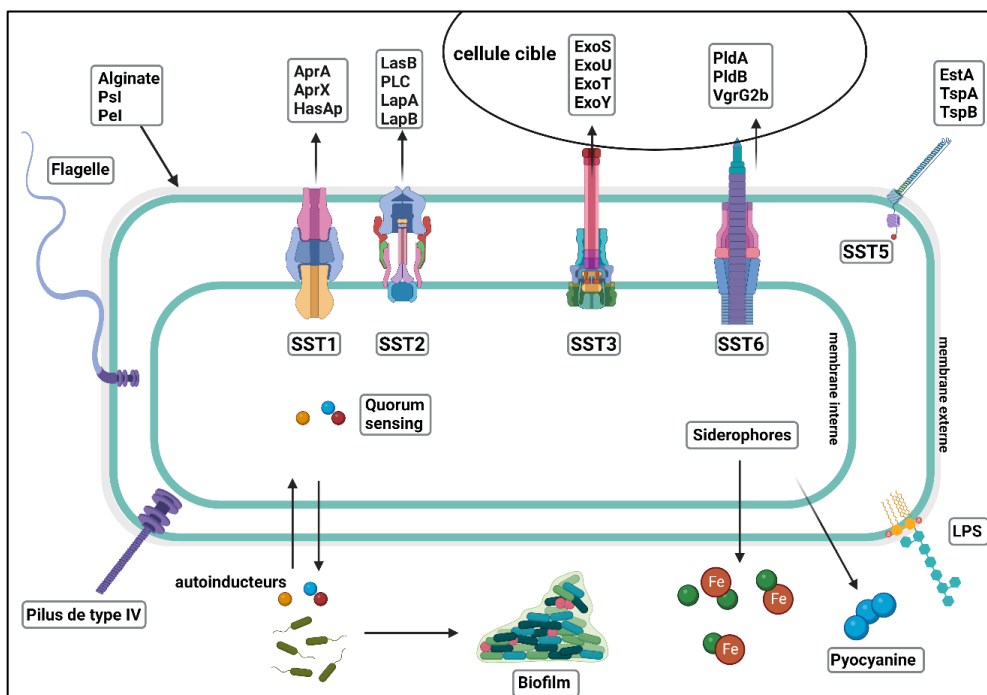
L'émergence de clones à haut risque caractérisés par un profil de résistance multiple est la conséquence de l'acquisition de mécanismes de résistance par transferts horizontaux.

Ces clones sont actuellement considérés comme la plus grande menace à la santé publique parmi les souches de *P. aeruginosa* en raison de l'extrême difficulté à mettre en œuvre des traitements efficaces (DEL BARRIO-TOFIÑO et al, 2020) (OLIVER et al, 2015) (MATASEJE et al, 2016). L'utilisation de la colistine par exemple comme traitement de dernier recours est généralement nécessaire pour endiguer ces infections (FALAGAS et al, 2005). Ces antibiotiques sont sciemment peu utilisés à cause de leur toxicité pour le patient ou afin d'éviter le développement de résistance.

Malgré cela, le développement de résistance à la colistine par mutation génomique et par transfert de plasmides a déjà été documenté chez *P. aeruginosa* (GUTU et al, 2013) (LIU et al, 2016). La situation actuelle semble tendre vers l'apparition plus fréquente de souches pan-résistantes, insensibles à toutes les classes d'antibiotiques connues, cependant rarement décrites jusqu'à aujourd'hui (WANG et al, 2006).

### Facteurs de virulence de *P.aeruginosa*

Les facteurs de virulence regroupent l'ensemble des molécules produites par un pathogène causant des dommages à l'hôte et menant à l'apparition de maladies. Chez les bactéries, ces facteurs sont impliqués dans l'adhérence, l'invasion, la suppression de l'échappement au système immunitaire et la déplétion en nutriments de l'hôte, et peuvent causer des dommages aux tissus (PETERSON, 1996) (LIAO et al, 2022) ((MOISSENET et KHEDHER, 2011) (Figure 3). Ce chapitre se concentrera particulièrement sur les facteurs de virulence de *P.aeruginosa*. Le développement d'approches thérapeutiques alternatives contre les facteurs de virulence bactériens pourrait permettre de neutraliser des mécanismes clés de pathogenèse des bactériens tout en n'ayant pas d'effet direct sur la viabilité des bactéries, réduisant ainsi le risque de développement de résistance à ces approches (CEGELSKI et al, 2008) (LIAO et al, 2022).



**Figure 3 : Schéma récapitulatif des différents facteurs de virulence de *P.aeruginosa*.**  
Inspiré de LIAO et al, 2022. Créé avec BioRender

### 1.3 Pili de type IV et flagelle

Les pili de type IV sont des fibres localisées sur la surface de la bactérie et composées de répétition de la protéine PilA insérée dans un corps basal s'étendant à travers les deux membranes (BURROWS, 2012) (CHIANG et al, 2005). Ces structures sont capables de s'étendre pour adhérer à des surfaces ou à des cellules mammifères puis de se rétracter ce qui permet la mobilité de la bactérie (MAIER et al, 2015) (TALÀ et al, 2019). Ces mouvements sont alimentés par deux ATPases chez *P.aeruginosa* nommées PilB et PilT respectivement, responsables de l'extension et de la rétractation (CRAIG et al, 2019). Les pili de type IV sont également impliqués dans l'adhésion aux tissus de l'hôte et la cytotoxicité (COMOLLI et al, 1999), dans la régulation des facteurs de virulence (PERSAT et al, 2015) ainsi que dans la formation de biofilm (voir ci-dessous) (O'TOOLE et al, 1998) (BARKEN et al, 2008).

*P.aeruginosa* possède un flagelle unique polaire composé de trois sous-unités : un corps basal inséré dans la membrane externe, un filament protéique composé de polymères de la protéine FliC et connectée au corps basal par une structure en crochet (DASGUPTA et al, 2004) (MACNAB et al, 2003).

Le mouvement rotatif exercé par le crochet permet la motilité par nage (DASGUPTA et al, 2004). Le flagelle est également impliqué dans l'adhésion aux mucines, des protéines sécrétées par les cellules épithéliales de l'hôte et présentes dans le mucus (ARORA et al, 1998) et dans la formation de biofilm (O'TOOLE et al, 1998) (OZER et al, 2021).

L'absence ou la déficience du flagelle réduit la pathogénicité de *P.aeruginosa* dans des modèles animaux soulignant son importance comme facteur de virulence (FELDMAN et al, 1998) (BALLOY et al, 2007) (ARORA et al, 2005). Le flagelle est reconnu par le récepteur toll-like 5 (TLR5) ce qui induit une forte réaction inflammatoire chez l'hôte (ADAMO et al, 2005) (CAMPODÓNICO et al, 2010) (FEUILLET et al, 2006). Ces propriétés immunogènes ont motivé son inclusion dans des cocktails vaccinaux avec le polysaccharide alginate (FAEZI et al, 2017) ou les protéines de membrane externe OprF et OprI (Hassan et al, 2018) capables d'induire une immunité protectrice chez la souris.

## 1.4 Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) constituent une composante structurale majeure de la membrane externe de la plupart des bactéries à Gram négatif (SUTCLIFFE, 2010). Les LPS sont composés de 3 régions distinctes : le lipide A dont la structure est généralement conservée et qui s'insère dans la membrane externe, un oligosaccharide « noyau » reliant le lipide A avec l'antigène-O, un oligosaccharide ayant une forte variabilité inter et intraspécifique de longueur et de structure (WHITFIELD et TRENT, 2014) (PIER, 2007). Les LPS sont notamment impliqués dans l'évasion immunitaire de *P.aeruginosa*. L'antigène-O peut en effet conférer une résistance à la voie du complément en bloquant l'accès à la membrane externe par encombrement stérique (RAUTEMAA et MERI, 1999). La résistance à une ou plusieurs voies du complément peut varier en fonction de la bactérie, de la longueur de l'antigène-O et la structure des LPS (GROSSMAN et LEIVE, 1984) (BURNS et HULL, 1998) (HONG et PAYNE, 1997) (MURRAY et al, 2003) (BRAVO et al, 2008).

Chez *P.aeruginosa*, la résistance au complément semble être associée à la longueur de l'antigène-O (KINTZ et al, 2008) (IVANOV et al, 2011) (OHNO et al, 1995). L'implication de l'antigène-O dans la résistance à l'opsonophagocytose a également été montrée dans de nombreux pathogènes dont *P.aeruginosa* (ENGELS et al, 1985) (MARCH et al, 2013) (SALDÍAS et al, 2009) (DUERR et al, 2009) (BURNS et al, 1999) (WILLIAMS et al, 1986). La reconnaissance du lipide A des LPS par le complexe formé par les récepteurs Toll-like 4 induit fortement la réponse immunitaire innée (TLR4) (MILLER et al, 2005) (KAWAI et AKIRA, 2010). L'immunogénicité et l'accessibilité des LPS à la surface de la bactérie ont soulevé un intérêt certain pour le développement de vaccins (ZHU et al, 2021).

## 1.5 Exopolysaccharides

*P.aeruginosa* est capable de synthétiser et sécréter des exopolysaccharides qui forment une matrice extracellulaire permettant à la bactérie de résister à des conditions défavorables (dessiccation, présence d'agents oxydants, réponse immunitaire) (FRANKLIN et al, 2011).

On distingue au moins 3 exopolysaccharides chez *P.aeruginosa* : Psl et Pel généralement sécrétés par des souches environnementales (JACKSON et al, 2004) et des souches cliniques, et les alginates sécrétés par des souches infectant des patients atteints de mucoviscidose (MAY et al, 1991) (FRIEDMAN et KOLTER, 2004). Les exopolysaccharides sont une composante majeure des biofilms de *P.aeruginosa* (NIVENS et al, 2001) (GHAFOR et al, 2011) et sont également impliqués dans des mécanismes d'évasion du système immunitaire (SONG et al, 2003) (JONES et WOZNIAK, 2017) (DONLAN, 2002).

## **1.6 Biofilm**

Le biofilm se définit par une agrégation communautaire de bactéries enveloppées dans une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN (PAMP et al, 2009). La formation du biofilm chez *P.aeruginosa* est complexe et multi-réglée (revue par THI et al, 2020). Les bactéries au sein du biofilm sont moins susceptibles aux conditions défavorables de l'environnement telles que les changements de température, les agents antimicrobiens ou la déplétion en nutriments (ROLLET et al, 2009) (O'TOOLE et al, 2015) (DONLAN, 2002). La formation de biofilm joue donc un rôle important dans la persistance des bactéries sur les surfaces non-organiques ou dans le cadre d'infections chroniques comme c'est notamment le cas pour les infections à *P.aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (COSTERTON et STEWART, 1999) (Lewis, 2001).

## **1.7 Quorum sensing**

Le quorum sensing est un réseau de signalisation inter-bactériens impliquant la production, la reconnaissance et la réponse à des molécules appelées auto-inducteurs (RUTHERFORD et al, 2012). La signalisation des auto-inducteurs est dépendante de la densité cellulaire. La production et la concentration locale d'auto-inducteurs se doivent d'atteindre un seuil suffisant pour leur détection par des récepteurs dédiés et la réponse associée à celle-ci (KAPLAN et al, 1985) (NG et al, 2009) (WILLIAMS et CAMARA, 2009).

Ce mécanisme permet au quorum sensing de coordonner de nombreux mécanismes au niveau d'une population : production de facteurs de virulence et de métabolites secondaires, compétence, bioluminescence, formation et maturation de biofilm (MUKHERJEE et al, 2019) ((MILLER et BASSLER, 2001) (SCHUSTER et al, 2003) (WAGNER et al, 2004). Quatre voies de quorum sensing sont présentes chez *P.aeruginosa* : Las, Rhl, IQS et PQS, elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (revu par DICKEY et al, 2017).

## 1.8 Sidérophores

*P.aeruginosa* sécrète des protéines capables de chélater le fer appelées sidérophores, dont les principales sont la pyoverdine et la pyochéline (CORNELIS et al, 2010). Dans un contexte d'infection, la séquestration du fer, disponible en très faible quantité, est un mécanisme clé de défense contre les pathogènes (HOOD et al, 2012).

Ces sidérophores sont capables de chélater le fer provenant à la fois de source inorganique, mais également de protéines chélatrices de l'hôte comme la lactoferrine et la transferrine (MEYER et al, 1996) (DÖRING et al, 1988). Des liens ont été établis entre la sécrétion de ces sidérophores, la virulence et la formation de biofilm chez *P.aeruginosa* (COX, 1982) (BANIN et al, 2005). La production de sidérophores est, en effet, nécessaire à la virulence et est impliquée dans la régulation d'autres facteurs de virulence comme les sidérophores eux-mêmes (pyoverdine), l'endoprotéase PrpL et l'exotoxine A (LAMONT et al, 2002) (BEARE et al, 2003).

## 1.9 Pyocyanine

La pyocyanine est un métabolite bleu ayant une activité redox capable de pénétrer dans les cellules de l'hôte (LAU et al, 2004). A l'intérieur des cellules, la pyocyanine induit un important stress oxydatif (HALL et al, 2016), perturbe de nombreux mécanismes cellulaires tels que le transport d'électrons (RADA et LETO, 2013) ou l'homéostasie du calcium (DENNING et 1998) et cause des dommages puis la mort des cellules cibles (BRITIGAN et al, 1992) (LI et al, 2019) (MULLER, 2006).

## **1.10 Systèmes de sécrétion de *P.aeruginosa***

Les systèmes de sécrétion sont des nanomachines macromoléculaires chargées de sécréter des protéines, appelées effecteurs, du cytoplasme de la bactérie vers le milieu extracellulaire ou directement dans le cytoplasme d'une cellule cible. Ces effecteurs sont dotés d'une large variété de fonctions : récupération de nutriments, adhésion, intoxication de cellules de mammifères, compétition inter-bactérienne (GREEN et MECSAS, 2016) (FILLOUX, 2011). On distingue deux types de mécanisme de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif : la sécrétion en une étape où le substrat est directement pris en charge dans le cytoplasme bactérien et envoyé au travers de la machinerie du système de sécrétion pour se retrouver à l'extérieur de la cellule et la sécrétion en deux étapes où le substrat est d'abord transloqué dans le périplasma de façon indépendante du système de sécrétion puis pris en charge par celui-ci pour sa sécrétion (REGO et al, 2010).

Les systèmes SEC et Tat (Twin-arginine translocation) assurent cette première étape de translocation permettant aux substrats de passer à travers la membrane interne à l'état déplié pour le premier, et à l'état replié pour le second (KOROTKOV et al, 2012) (PAPANIKOU et al, 2007).

Les systèmes de sécrétions de type I, II, III, V et VI sont présents chez *P.aeruginosa* (FILLOUX, 2011). Chacun de ces systèmes fera l'objet d'une brève description à l'exception du système de sécrétion de type III qui sera traité plus en détails ultérieurement.

### **1.10.1 Systèmes de sécrétion en une étape**

#### **(a) Système de sécrétion de type I**

Le système de sécrétion de type I est composé d'un transporteur ABC (ATP-binding-cassette) qui fournit l'énergie nécessaire au transport, d'une protéine localisée au niveau de la membrane externe par laquelle passe le substrat ainsi que d'une protéine adaptatrice reliant ces dernières (DELEPELAIRE, 2004) (HOLLAND, 2005).

*P.aeruginosa* possède deux systèmes de sécrétion de type I : le système Apr et le système Has (BLEVES et al, 2010).

Le système Apr est composé du transporteur ABC AprD, de AprE et d'une protéine de la membrane externe appelée protéine AprF et est impliqué dans la sécrétion de AprA, une protéase alcaline impliquée dans l'évasion immunitaire, le blocage de la voie classique du complément et la voie des lectines ainsi que la production de pyocyanine (GUZZO et al, 1991) (LAARMAN et al, 2012) (IIYAMA et al, 2017) (CASILAG et al, 2016). Ce système sécrète également le substrat AprX de fonction encore inconnue (DUONG et al, 2001).

Le système Has est composé des protéines HasD (transporteur), HasE (adaptateur) et HasF (protéine de membrane externe.) Ce système prend en charge la sécrétion de l'hémophore HasAp impliqué dans la récupération du fer via la capture et l'internalisation du groupement hème de l'hémoglobine (LÉTOFFÉ et al, 1998) (WANDERSMAN et DELEPELAIRE, 2004).

### **(b) Système de sécrétion de type III**

Le système de sécrétion de type III forme une aiguille permettant la translocation des substrats du cytoplasme de la bactérie vers le cytoplasme de la cellule cible.

Étant le facteur de virulence que nous avons ciblé pour une approche thérapeutique basée sur les anticorps monoclonaux, il sera détaillé ultérieurement dans ce chapitre.

### **(c) Systèmes de sécrétion de type VI**

Le système de sécrétion de type VI propulse une aiguille contractile qui perce la membrane de la cellule cible et assure l'injection des substrats directement dans le cytoplasme (le mécanisme et l'assemblage de ce système ont été revus en détail par CIANFANELLI et al, 2016). Initialement considéré comme un mécanisme impliqué dans la compétition inter-bactérienne, ce système joue également un rôle dans la formation de biofilm, le transport des ions et l'intoxication des cellules eucaryotes (MONJARÁS FERIA et VALVANO, 2020).



*P.aeruginosa* exprime 3 SSTVI : H1, H2 et H3-SSTVI. Le SSTVI H1 cible exclusivement les bactéries alors que les systèmes H2 et H3 ciblent également les cellules eucaryotes (Russell et al, 2011). Les protéines PldA et PldB, respectivement sécrétées par le système H2 et les systèmes H2 et H3, sont des phospholipases impliquées dans l'internalisation de *P.aeruginosa* par les cellules de l'hôte via l'activation de la voie PI3K/Akt (BLEVES et al, 2014) (JIANG et al, 2014) (SANA et al, 2012). VgrG2b est un autre effecteur du T6SS H2 de *P.aeruginosa* également impliqué dans l'invasion cellulaire via son interaction avec le complexe  $\alpha/\beta$  tubuline et  $\gamma$ -tubuline, qui provoque un réarrangement du cytosquelette d'actine et une internalisation de la bactérie (SANA et al, 2015) (WOOD et al, 2019).

### 1.10.2 Systèmes de sécrétion en deux étapes

#### (d) Systèmes de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II est composé de quatre sous-unités : un pore localisé au niveau de la membrane externe formé de l'oligomérisation d'une protéine de la famille des sécrétines, un complexe au niveau de la membrane interne, une ATPase cytoplasmique procurant l'énergie nécessaire à la sécrétion et un pseudopilus formé par 5 pseudopilines différentes (KOROTKOV et al, 2012).

Le mécanisme exact de sécrétion n'a pas encore été pleinement élucidé, mais il impliquerait la translocation préalable du substrat par les voies SEC ou Tat (VOULHOUX et al, 2001) suivi de sa reconnaissance par la plateforme de la membrane interne du système qui activerait la polymérisation du pseudopilus agissant comme un piston poussant le substrat à travers le pore formé par la sécrétine (HOBBS et al, 1993) (SHEVCHIK et al, 1997) (REICHOW et al, 2011).

On distingue deux systèmes de sécrétion de type II (SSTII) chez *P.aeruginosa* : le système Xcp et le système Hxc. Le système Xcp sécrète une grande variété de substrats impliqués dans la virulence tels que des protéases, des lipases ou toxines (l'ensemble des effecteurs et leurs fonctions ont été revus par KIPNIS et al, 2006). Par exemple, l'élastase LasB qui est sécrétée par ce système est impliquée dans la dégradation de l'élastine, une protéine de jonction de l'épithélium pulmonaire, induisant la rupture de cet épithélium (DE BENTZMANN et al, 2000).

LasB inactive également les protéines SP-A et SP-D (Surfactant protein A et D) qui sont impliquées dans l'immunité innée notamment au niveau des poumons (MARIENCHECK et ALCORN, 2003) (ALCORN et WRIGHT, 2004). La phospholipase C est capable de dégrader les phospholipides des cellules de mammifères, elle participe également à la pathogénicité en occasionnant directement des dommages aux tissus ou indirectement via le recrutement excessif de neutrophiles induit par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production d'interleukine-8 (WIENER-KRONISH et al, 1993) (VASIL et al, 1991) (KÖNIG et PREVOST, 1997). L'ensemble des substrats sécrétés par le SSTII et leurs effets ont été revus par BLEVES et al, 2010 et KIPNIS et al, 2006.

Le système Hxc sécrète seulement deux protéines : LapA et LapB, des phosphatases alcalines produites en conditions de carence en phosphate (BALL et al, 2002) (BALL et al, 2012).

#### **(e) Système de sécrétion de type V**

Le système de sécrétion de type 5 permet la sécrétion de grandes protéines à travers un pore formé dans la membrane externe. Les protéines sont toutes d'abord transloquées par le système de sécrétion SEC vers le périplasme puis traversent la membrane externe via le pore cité précédemment, et peuvent soit rester associées au pore soit être clivées et relâchées dans le milieu (FAN et al, 2016) (LEO et al, 2012).

On distingue deux sous-types de systèmes de sécrétion de type V : les autotransporteurs et les transporteurs à deux partenaires.

Les autotransporteurs sont des protéines possédant (i) un peptide signal en partie N-terminale permettant leur export dans le périplasme, (ii) un domaine « autotransporteur » en carboxy-terminal structuré en tonneau  $\beta$  qui s'insère dans la membrane externe et forme un pore, (iii) et d'un domaine « passager » qui va traverser le pore et être, soit clivé, soit rester attaché au domaine transporteur (DAUTIN et BERNSTEIN, 2007) (LEO et al, 2012) (SHERE et al, 1997) (VAN ULSEN et al, 2003). Ces protéines sont donc capables de procéder à leur propre sécrétion une fois localisées dans le périplasme. Un seul autotransporteur a été décrit à ce jour chez *P.aeruginosa*, il s'agit d'EstA, un autotransporteur possédant un domaine catalytique estérase capable d'hydrolyser le glycérol (WILHELM et al, 1999). Cet autotransporteur serait impliqué dans la mobilité bactérienne et dans la formation de biofilm (WILHELM et al, 2007).

Le type de sécrétion à deux partenaires du SSTV est relativement similaire aux autotransporteurs à la différence que le domaine passager et autotransporteur sont localisés sur deux protéines distinctes respectivement nommées TspA et TspB (Two-partner protein) (MAZAR et COTTER, 2007). Chez *P.aeruginosa*, le couple LepA/LepB a été identifié. LepB est requise pour la sécrétion de LepA, une protéase qui clive les récepteurs PAR-1, 2 et 4 (protease associated receptor) menant à l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B impliquée dans l'inflammation (KIDA et al, 2008).

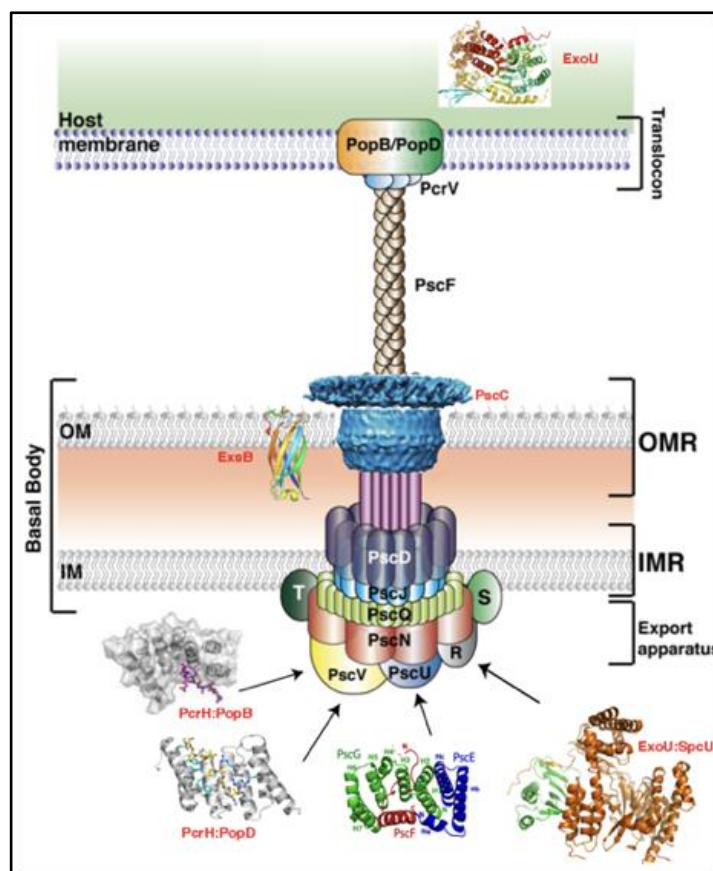
## **Le système de sécrétion de type III, élément de virulence majeur de *Pseudomonas aeruginosa***

### **1.11 Description générale du système**

Le système de sécrétion de type III (SSTIII) est un assemblage multiprotéique qui s'étend à travers les deux membranes de la paroi bactérienne et qui permet à la bactérie d'injecter des protéines (effecteurs) impliquées dans la pathogenèse directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Ce système est présent chez de nombreuses bactéries pathogènes (HUECK et al, 1998). Il est composé de quatre sous-unités distinctes : le corps basal, l'aiguille, le translocon et les effecteurs (Figure 4). On observe une similarité structurale entre les protéines formant le corps du SSTIII de différentes bactéries pathogènes (*Yersina Sp*, *Salmonella Sp*, *E.coli*, *Pseudomonas Sp*) (revue IZORE et al, 2011). Le corps basal est composé d'une série de protéines hautement oligomérisées s'étendant de la membranes interne à la membrane externe de la bactérie (DENG et al, 2017). Chez les principales bactéries pathogènes pour l'Homme cités précédemment, une aiguille creuse formée par une protéine polymérisée s'insère dans le corps basal et forme un canal au travers duquel les effecteurs peuvent transiter vers le translocon (KUBORI et al, 2000) (HOICZYK et al, 2001) (PASTOR et al, 2005). Le translocon est un complexe protéique tripartite sécrété par le SSTIII, et impliqué dans la formation de pores dans la membrane de la cellule cible.

Deux protéines hydrophobes sous forme d'oligomères, PopB et PopD chez *P.aeruginosa*, sont directement impliquées dans l'interaction avec la membrane (SCHOEHN et al, 2003) (MONTAGNER et al, 2011) (MYENI et al, 2013).

Le troisième partenaire, PcrV chez *P.aeruginosa*, est une protéine hydrophile formant un anneau oligomérique à l'extrémité de l'aiguille et qui sert de plateforme en connectant l'aiguille et le pore (MATTEÏ et al, 2011) (GÉBUS et al, 2009) (MUELLER et al, 2005) (PETTERSSON et al, 1999) (PICKING et al, 2005) (KANIGA et al, 1995). La structure précise, l'assemblage et la régulation du SSTIII ont été revus en détails par les auteurs suivants : IZORE et al, 2011 ; HAUSER, 2009 ; DENG et al, 2017.



**Figure 4** : Représentation schématique du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. Le corps basal permet le passage de l'aiguille formée par la polymérisation de PscF. Suite à cela, la sécrétion des protéines PcrV, PopB, PopD permet la formation du translocon qui entraîne l'injection d'effecteurs comme ExoU directement dans le cytoplasme de la cellule cible. IMR : Inner Membrane ring ; OMR : Outer Membrane ring ; OM : Outer Membrane ; IM: Inner Membrane (Izoré et al, 2014)

### 1.11.3 L'aiguille du SSTIII de *P.aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, la polymérisation d'une protéine de 9 kDa nommée PscF est responsable de la formation de l'aiguille. Des observations par microscopie électronique et immunofluorescence ont montré que l'aiguille mesurait environ 60-80 nm de longueur totale et 6-7 nm de largeur, et se localisait à la surface de la bactérie (PASTOR et al, 2005). Dans le cytoplasme de la bactérie, PscF forme un complexe ternaire avec deux protéines chaperonnes PscE et PscG dont les structures ont été résolues par cristallographie et diffraction de rayons X (QUINAUD et al, 2007). Ce complexe permet de séquestrer PscF dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi de polymériser avant l'activation du SSTIII (QUINAUD et al, 2005). La protéine PscF ainsi que ses chaperonnes sont nécessaires à l'injection des effecteurs du SSTIII et donc à la cytotoxicité du système (PASTOR et al, 2005). Lors de l'activation du SSTIII, la taille de l'aiguille est régulée par PscP qui agit comme une « règle moléculaire » (BERGERON et al, 2016).

### 1.11.4 Le translocon du SSTIII de *P.aeruginosa*

Dans le SSTIII de *P.aeruginosa*, le translocon se compose de deux protéines hydrophobes appelées translocateurs, PopB et PopD, et de la protéine hydrophile PcrV. Les translocateurs PopB/PopD forment des oligomères qui s'insèrent dans la membrane de la cellule cible pour former un pore par lequel peuvent entrer les effecteurs du SSTIII ayant transité par l'aiguille (SCHOEHN et al, 2003) (FAUDRY et al, 2006). La protéine du translocon PcrV a initialement été identifiée par séquençage amino-terminal du sécrétome de *P. aeruginosa* (YAHR et al, 1997). Cette protéine de 32,2 kDa est codée par l'opéron *pcrGVH-popBD* qui détermine également les séquences de PopB et PopD (GOURE et al, 2004). Cette protéine occupe un rôle important dans le mécanisme d'injection et de translocation d'effecteurs du SSTIII. En effet, PcrV se localise sur la pointe de l'aiguille formée par PscF et est chargée de l'insertion de PopB/PopD dans la membrane. PcrV est également requise pour la translocation des effecteurs dans la cellule cible (SAWA et al, 1999) (GOURE et al, 2004) (GOURE et al, 2005). Afin de remplir cette fonction, PcrV forme des oligomères après un processus de dépliement et de repliement induit par son passage dans l'aiguille (AKEDA et al, 2005) (GEBUS et al, 2009).

Il a été montré que la mutation de résidus localisés sur l'hélice  $\alpha 12$  de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine abolissait l'oligomérisation de PcrV ce qui avait pour conséquence une absence d'insertion de PopD dans la membrane et donc de cytotoxicité médiée par le SSTIII (GEBUS et al, 2009).

#### 1.11.5 Effecteurs du SSTIII de *P.aeruginosa*

Le système SSTIII de *P. aeruginosa* comporte quatre protéines effectrices : ExoU, ExoS, ExoT et ExoY. ExoS et ExoT sont des effecteurs fonctionnellement proches possédant des activités GAP (GTPase activating protein) (GOEHRING et al, 1999) (Krall et al, 2000) et ADPRT (ADP ribosyl transférase) (KNIGHT et al, 1995) (LIU et al, 1997).

La composante GAP de ces toxines est impliquée dans la déstabilisation du cytosquelette d'actine, avec pour conséquences un arrondissement des cellules, une perturbation de l'adhérence cellulaire et une inhibition de la phagocytose des macrophages (PEDERSON et al, 1999) (GARRITY-RYAN et al, 2000).

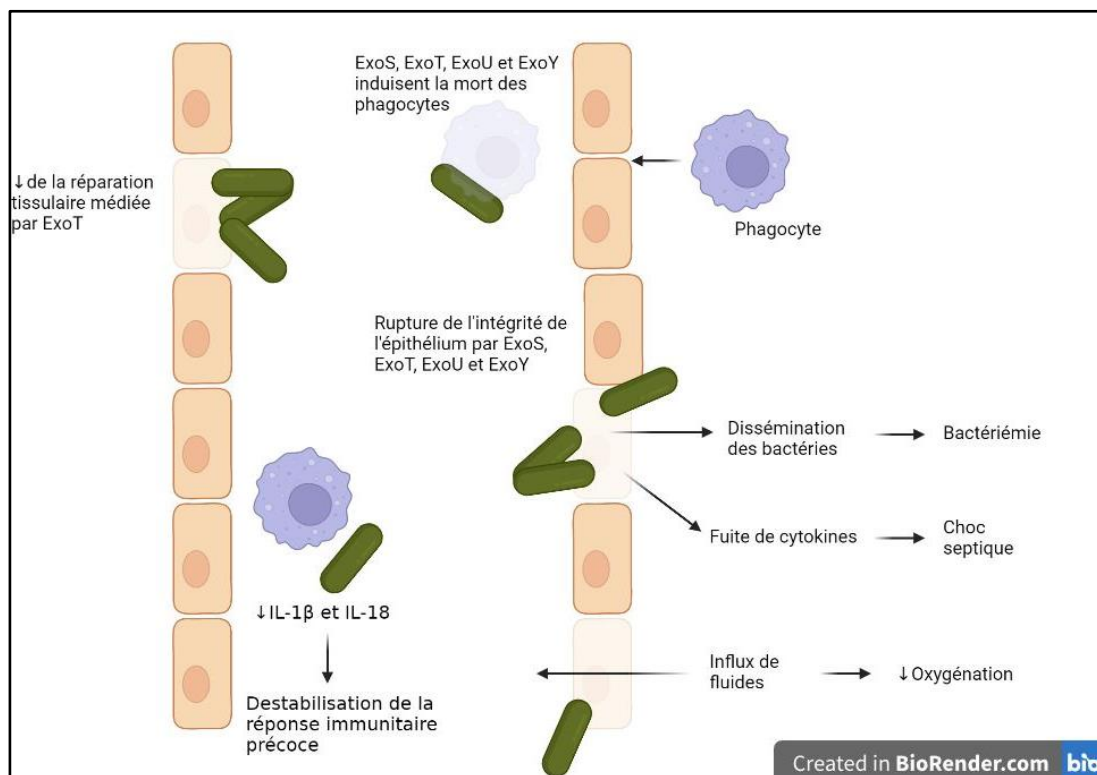
Les protéines eucaryotes ciblées diffèrent entre les composantes ADPRT d'ExoS et d'ExoT, ce qui se traduit par des effets différents de ces toxines sur la cellule cible. La composante ADPRT de ExoS possède un grand nombre de cibles. Ceci concorde avec la variété d'effets néfastes observés chez la cellule cible tels que la mort cellulaire, la déstabilisation irréversible du cytosquelette, l'inhibition de la synthèse d'ADN et de l'endocytose (ROCHA et al, 2003) (PEDERSON et al, 1998) (Figure 5). L'activité ADPRT d'ExoT est plus restreinte, elle cible principalement les protéines de la famille CRK (CT10 regulator of kinase) (SUN et al, 2003) et inhibe la division cellulaire (SHAFIKHANI et al, 2006).

ExoU est une phospholipase capable d'hydrolyser plusieurs substrats tels que les phospholipides, les lysophospholipides ou encore les lipides neutres (SATO et al, 2003) (PHILLIPS et al, 2003). Il s'agit de l'effecteur du SSTIII ayant la plus haute cytotoxicité : l'injection d'ExoU va mener à une perte rapide de l'intégrité membranaire de la cellule cible (FINCK-BARBANÇON et al, 1997) (DIAZ et al, 2008) (Gendrin et al., 2012) (Figure 5).

Enfin ExoY est une adelynyl cyclase responsable de l'augmentation de la concentration d'AMPc dans la cellule cible perturbant ainsi l'expression des gènes régulés par l'AMPc (YAHR et al, 1998).

Les principaux effets induits par cette toxine incluent la déstabilisation du cytosquelette, la réduction de la perméabilité cellulaire et de la phagocytose (YAHR et al, 1998) (VALLIS et al, 1999) (COWELL et al, 2005) (SAYNER et al, 2004) (Figure 5).

Bien que la majorité des souches de *P. aeruginosa* possède les gènes codant pour le SSTIII, la prévalence des gènes codant pour les effecteurs peut varier. La plupart des isolats cliniques possèdent les gènes qui codent pour ExoY et ExoT, cependant, la présence des gènes codant pour ExoS et ExoU est mutuellement exclusive dans l'écrasante majorité des isolats (FELTMAN et al, 2001) (BERTHELOT et al, 2003).



**Figure 5 : Rôle synergique des effecteurs du système de sécrétion de type III lors de l'infection aiguë à *P. aeruginosa* au niveau des voies respiratoires.** Lors des phases précoces de l'infection, l'action d'ExoU et ExoS réduit la sécrétion des cytokines IL-1B et IL-18, la mise en place d'une réaction inflammatoire précoce est alors ralentie. L'activité phospholipase d'ExoU mène à la fois à la production d'eicosanoïdes, à un recrutement excessif de macrophages et de neutrophiles et à des dommages tissulaires. La destruction des phagocytes par l'effet des effecteurs peut également induire une surinfection par d'autres pathogènes. Les actions de ExoY, ExoU, ExoT et ExoS produisent des brèches dans l'épithélium respiratoire appuyé par l'action d'inhibition de la réparation tissulaire d'ExoT. Ces brèches permettent la dissémination systémique de bactéries et de cytokines entraînant respectivement une bactériémie et un choc septique. (Adapté d'après Hauser et al, 2009). Créé avec à biorender.com.

### **1.12 Implication du système de sécrétion de type III dans l'infection à *P. aeruginosa***

Le système de sécrétion de type III est un élément majeur de virulence de *P. aeruginosa*. L'expression et la sécrétion des effecteurs du SSTIII sont associées à une morbidité et une mortalité importante chez le patient. Le phénotype observé lors de l'infection est associé aux types d'effecteurs sécrétés. En effet, les souches sécrétant ExoU se montrent plus virulentes chez le patient comparées aux souches sécrétant ExoS (FLEISZIG et al, 1997) (SCHULERT et al, 2003).

Une étude rétrospective menée sur 85 cas de bactériémie à *P. aeruginosa* a montré que l'infection par des souches qui sécrètent au moins 1 effecteur du SSTIII était associée à un taux de mortalité deux fois plus élevé comparé aux infections par des souches non-sécrétrices (EL-SOLH et al, 2012). De plus, aucun patient infecté par des souches sécrétant ExoU n'a survécu lors de la période de 30 jours de l'étude. Le SSTIII entraîne également des conséquences sur le pronostic vital des patients atteints de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Là aussi, la sécrétion des effecteurs est associée à une sévérité accrue de l'infection, incluant le décès du patient ou une récurrence de la pneumopathie. De façon similaire, l'étude d'une cohorte de 35 patients atteints de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique causée par *P. aeruginosa* a montré que parmi les souches isolées capables de sécréter au moins 1 effecteur, 81% d'entre elles provenaient de patients ayant des symptômes sévères (HAUSER et al, 2002). De plus, Roy-Burman *et al* rapportent un taux de mortalité de 21% chez des patients colonisés au niveau des poumons par des souches qui sécrètent au moins un effecteur, contre seulement 3% chez les patients infectés par des souches qui n'expriment pas le SSTIII (ROY-BURMAN et al, 2001). Ces données montrent une forte implication de la sécrétion d'effecteurs du SSTIII dans la sévérité et la persistance des infections à *P. aeruginosa*. L'effet des différentes toxines détaillées précédemment induit des dommages aux tissus et une suppression de l'immunité locale supportant la colonisation et la persistance de *P. aeruginosa* (DIAZ et al, 2008) (SHAVER et al, 2004) (HAUSER et al, 2009). La rupture de l'épithélium au site de l'infection peut également permettre le passage de *P. aeruginosa* dans la circulation sanguine ainsi que la fuite de cytokines et peut provoquer un choc septique (KURAHASHI et al, 1999).



# Chapitre III : Les anticorps monoclonaux, alternative thérapeutique contre les bactéries résistantes aux antibiotiques

## Les anticorps

### 1.1 Structure

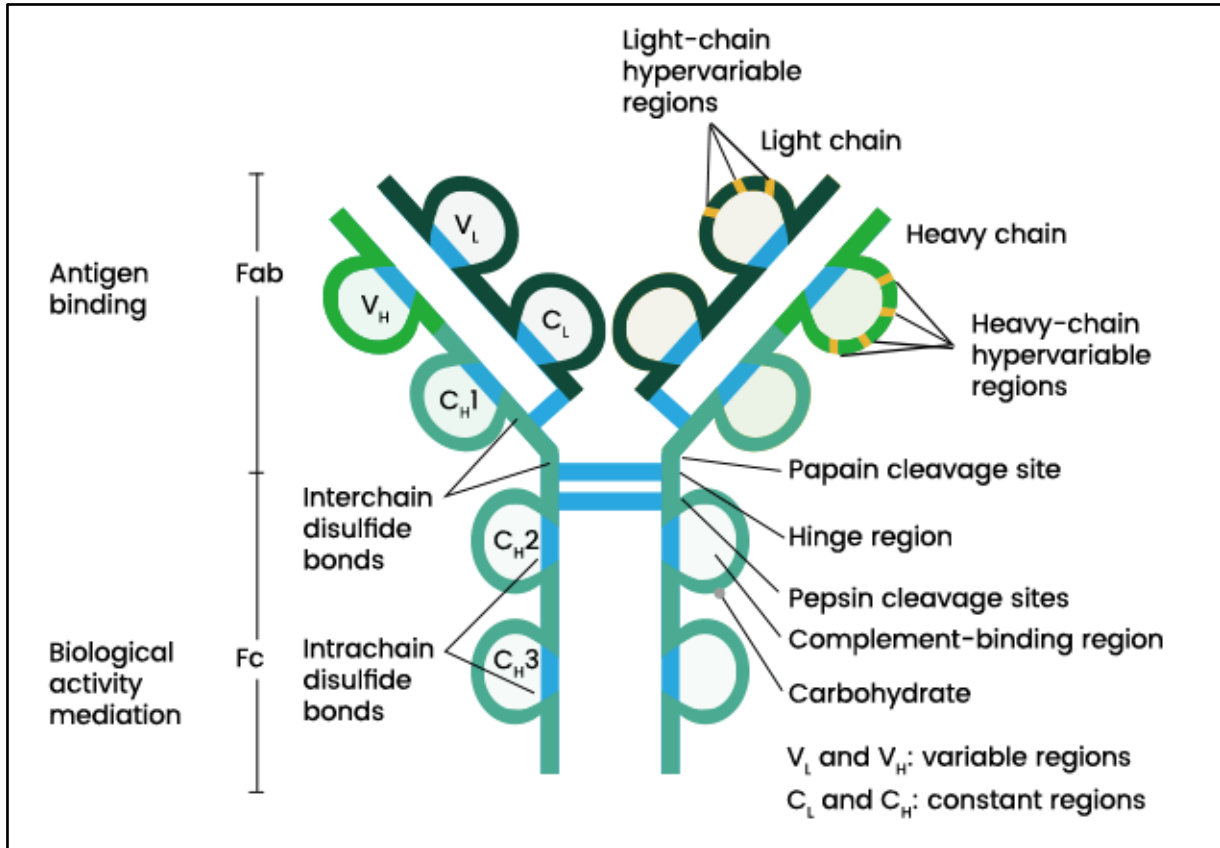
L'immunité humorale est la réponse du système immunitaire adaptatif qui se traduit par la sécrétion d'anticorps dans le milieu extracellulaire afin de permettre l'élimination de molécules ou d'organismes étrangers. Un anticorps est une glycoprotéine sécrétée par des cellules spécialisées dérivant des lymphocytes B, appelées plasmocytes (ALBERTS et al, 2002).

Chez l'Homme, les anticorps sont composés de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques (Figure 6).

La chaîne lourde est composée d'un domaine variable (VH) et de 3 à 4 domaines constants selon le type d'anticorps (**CH1**, **CH2**, **CH3** et **CH4**). Les domaines CH1 et CH2 de chaque chaîne lourde sont reliés par une région charnière flexible. La chaîne légère est composée d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Il existe deux types de chaînes légères :  $\kappa$  et  $\lambda$ . Un anticorps ne peut comporter que deux chaînes légères d'un même type. Il est également possible de diviser l'anticorps en 2 composantes sur la base de la digestion par la protéase papaïne (Figure 6) : le fragment de liaison à l'antigène (Fab) et le fragment cristallisable (Fc).

Le fragment Fab est composé des domaines CH1 et VH d'une chaîne lourde appareillés avec les domaines CL et VL d'une chaîne légère. Les domaines VH et VL du Fab contiennent le site de reconnaissance de l'antigène ou paratope, qui va interagir avec une portion de l'antigène appelée épitope permettant ainsi la reconnaissance de celui-ci par l'anticorps. Grâce à la gigantesque diversité du répertoire d'immunoglobulines humaines, les anticorps sont capables de reconnaître une immense variété de molécules et de structures (BACKHAUS, 2018).

Le fragment Fc est composé des domaines CH2 et CH3 de deux chaînes lourdes reliées de façon covalente par des ponts disulfures au niveau de la région charnière (JAZAYERI et al, 2008).



**Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'un anticorps.** Un anticorps est un hétéro-tétramère composé d'une paire de chaînes lourdes et d'une paire de chaînes légères. La molécule est stabilisée par des ponts disulfures inter et intra-chaînes. Chaque chaîne contient une partie constante et une partie variable. Les parties variables de chaque chaîne contiennent des régions hypervariables cruciales dans la reconnaissance de l'antigène. Les régions variables V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> contiennent le site de liaison à l'antigène ou paratope. Les domaines V<sub>H</sub> et C<sub>H</sub>1 de la chaîne lourde appariés avec les domaines V<sub>L</sub> et C<sub>L</sub> de la chaîne légère constituent le fragment Fab qui est impliqué dans la reconnaissance de l'antigène. Deux paires de domaines C<sub>H</sub>2 et C<sub>H</sub>3 appariés forment le fragment Fc impliqué dans les fonctions biologiques de l'anticorps. Ces deux fragments sont reliés par une région charnière flexible (Hinge). Les fragments Fc et Fab ont initialement été définis sur la base de produits de digestion à la papaine. La digestion à la pepsine permet d'obtenir le fragment (Fab')<sub>2</sub> constitué de deux fragments Fab reliés par la région charnière. (Sino Biological Inc).

La région constante de la chaîne lourde définit l'isotype de l'anticorps : IgM ( $\mu$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgG ( $\gamma$ ), IgE ( $\epsilon$ ) et IgD ( $\delta$ ). On dénombre également 4 sous-isotypes pour les IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) et 2 sous-isotypes pour les IgA (IgA1 et IgA2). Les différents isotypes se distinguent par leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles (Figure 7).

Chaque isotype va jouer un rôle précis, notamment dans un compartiment du corps donné, permettant ainsi une diversité de fonctions entrant en jeu dans l'élimination de pathogènes ou de cellules cancéreuses, la sécrétion de médiateurs de l'immunité et de l'allergie ou encore la neutralisation de toxines et de virus (MURPHY et WEAVER, 2016).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Chaîne lourde	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\mu$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\delta$	$\epsilon$
Masse molaire (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Niveau dans le sérum (moyenne chez un adulte mg/mL)	9	3	1	0,5	1,5	3	0,5	0,03	$5 \times 10^{-5}$
Demi-vie dans le sérum (Jours)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Activation de la voie classique du complément	++	+	+++	-	++++	-	-	-	-
Activation de la voie alterne du complément	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Interaction avec le récepteur Fc des macrophages et phagocytes	+	-	+	+/-	-	+	+	-	+
Interaction avec les basophiles et les mastocytes	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

**Figure 7** : Tableau récapitulatif des caractéristiques des isotypes d'anticorps humains. Adapté de Janeway 9th edition p 193.

## Mécanismes d'action

### 1.2 Fonctions effectrices.

Lors de la réponse humorale, l'anticorps va se lier à l'antigène à l'origine de cette réponse et recruter des molécules et/ou des cellules effectrices afin de permettre son élimination. L'anticorps fait office d'interface entre les cibles et les effecteurs du système immunitaire. Le fragment Fc est capable de recruter la voie classique du complément via son interaction avec C1q, entraînant la formation du complexe d'attaque membranaire et la lyse de la cible (Figure 8A) (AMIR et al, 1990) (BROWN et al, 2002) (FRASCH et al, 2009).

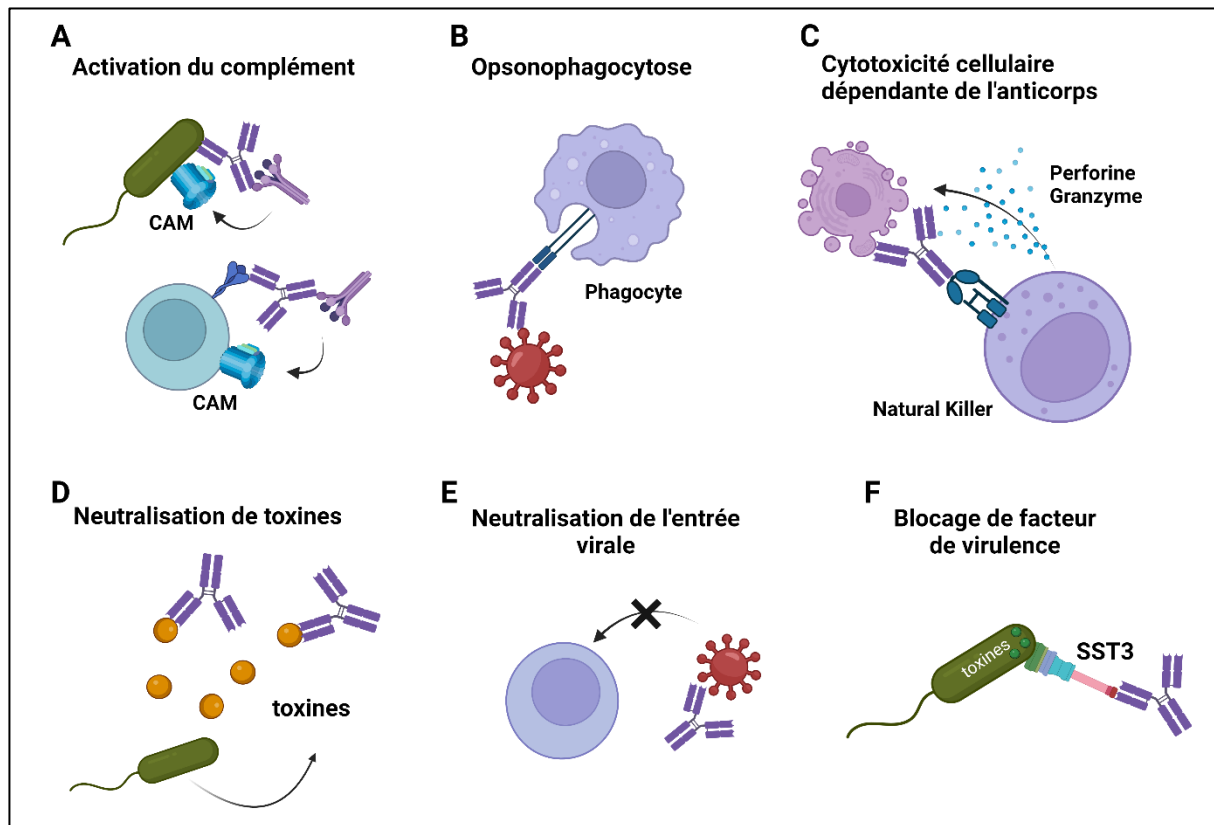
Après reconnaissance de l'antigène, le fragment Fc de l'anticorps peut également interagir avec les récepteurs Fc présents (FcγR par exemple dans le cas d'une IgG) sur des cellules immunitaires telles que les monocytes, neutrophiles ou encore les macrophages ce qui permet la phagocytose. Ce mécanisme est appelé phagocytose dépendante de l'anticorps (Figure 8B) (BREDIUS et al, 1994) (FIJEN et al, 2000) (HELLWIG et al, 2001). De même, après reconnaissance d'un antigène exprimé à la surface d'une cellule de l'hôte infecté par un pathogène, l'interaction entre le fragment Fc de l'anticorps et les récepteurs FcγIIIa et/ou FcγIIc des cellules NK active ces dernières et induit la sécrétion de granzyme et de perforine menant à la lyse de la cellule ainsi que la sécrétion d'interféron-γ permettant le recrutement de cellules du système immunitaire adaptatif (BRYCESON et al, 2006) (Figure 8C). Ce mécanisme est notamment impliqué dans l'élimination de cellules infectées par des pathogènes intracellulaires viraux comme le HIV (ACKERMAN et al, 2016), parasitaires comme *Plasmodium falciparum* (JAFARSHAD et al, 2007) ou encore bactériens comme *Chlamydia trachomatis* (MOORE et al, 2002).

### 1.2.1 Mécanismes d'action directs

La neutralisation directe est un mécanisme fonctionnel qui inhibe la pathogenèse d'un agent infectieux par interaction directe entre l'anticorps et un antigène spécifique du pathogène en question en absence de cellules effectrices (LU et al, 2018).

Ce mécanisme peut inhiber l'entrée et la réplication d'un pathogène intracellulaire par interaction avec les antigènes impliqués dans ce processus comme c'est le cas pour la gp120, la glycoprotéine décorant l'enveloppe du VIH impliquée dans l'entrée du virus dans les cellules cibles (PANTOPHLET et al, 2006) (Figure 8E). L'interaction de l'anticorps avec des toxines peut mener à l'inactivation de celles-ci en occupant leurs sites actifs (VISCIDI et al, 1983) (MAROZSAN et al, 2012) (WENZEL et al, 2020) (Figure 8D).

Les anticorps peuvent également neutraliser des facteurs de virulence variés en interagissant avec des protéines impliquées dans la formation de biofilm chez les bactéries (SUN et al, 2005), l'adhérence (KAUR et al, 2014) ou encore la translocation de toxines médiées par le SSTIII de *P.aeruginosa* (SAWA et al, 1999) (Figure 8F).



**Figure 8 : Fonctions des anticorps dans la lutte contre les bactéries.** **A)** Recrutement du complément par le fragment Fc de l'anticorps menant à la formation d'un complexe d'attaque membrane (CAM) et à la lyse de la bactérie. **B)** Opsonisation de la bactérie cible permettant le recrutement de phagocytes et phagocytose de la bactérie cible. **C)** Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps permettant le recrutement de cellules NK qui va induire la lyse de la cellule cible. **D)** Neutralisation de toxines par interaction du fragment Fab avec le site actif de la toxine. **E)** Neutralisation de l'entrée d'un pathogène intracellulaire par interaction directe de celui-ci avec l'anticorps. **F)** Blocage de la sécrétion de toxines par le système de sécrétion de type III.

## Utilisation des anticorps en thérapie

### 1.3 Thérapie sérique et anticorps polyclonaux

Le recours aux anticorps en thérapie date de plus d'un siècle. Les travaux de von Behring et Kitasato ont montré qu'il était possible d'utiliser des sérums de lapins immunisés pour traiter la diphtérie et le tétanos chez le lapin (BEHRING and KITASATO, 1890) (GRAHAM et al, 2015). Cette découverte a ouvert la voie à l'immunisation passive qui se définit par l'injection d'anticorps pour prévenir ou guérir une infection chez un individu.

À l'origine, des solutions d'anticorps polyclonaux sous forme de sérum (contenant de nombreux anticorps issus de populations de lymphocytes B différentes) étaient utilisées, provenant notamment d'animaux immunisés, comme les chevaux. La sérothérapie pouvait entraîner des effets secondaires tels qu'une maladie sérique, un syndrome d'hypersensibilité se traduisant par une réaction immunitaire inappropriée contre les protéines du sérum et la formation de complexe immuns menant à des symptômes tels que la fièvre, le développement d'arthrose et un choc anaphylactique (JACKSON, 2000) (LAWLEY et al, 1984). L'utilisation d'anticorps purifiés du sérum a plus tard permis de réduire la toxicité et les effets secondaires dûs à la présence de protéines sériques hétérologues (CASADEVALL et al, 2004). Malgré ses effets secondaires, parfois sévères, l'immunisation passive a été largement utilisée au début du XXème siècle particulièrement pour traiter les infections à *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* (pour un historique complet de l'utilisation des anticorps contre les maladies infectieuses pendant l'ère pré-antibiotique se référer à CASADEVALL et SCHARFF, 1994 ainsi que CASADEVALL et SCHARFF, 1995).

L'utilisation d'anti-sérum ou d'anticorps purifiés du sérum d'animaux immunisés ou de donneurs convalescents comporte aussi d'autres inconvénients. La grande diversité des antigènes reconnus par ces anticorps peut se traduire par une concentration faible en anticorps spécifiques et une faible efficacité contre un antigène donné, nécessitant de fortes doses d'anti-sérums pour obtenir l'effet désiré, augmentant ainsi le risque de réactivité croisée entre les anticorps non-fixés et les tissus (HAURUM, 2006).

Par ailleurs, il est difficile de garantir une homogénéité entre les lots ou une disponibilité stable des stocks (STIEHM et al, 2008) (WANG et al, 2013).

La sérothérapie reste aujourd'hui utilisée comme traitement d'urgence en cas d'intoxication par des toxines comme la toxine botulique, la toxine de l'anthrax ou le venin de scorpion et de serpent (SIATKOWSKI, 1993) (SLIFKA et al, 2018) (MORAIS, 2018). L'immunisation passive par du sérum de donneurs convalescents est également en première ligne lors des épidémies dûes à des virus émergents comme ce fut le cas par exemple pour le MERS-CoV en 2012 ou la pandémie de COVID 19 depuis 2020 (DUAN et al, 2020) (MONTELONGO-JAUREGUI et al, 2021) (BLOCH et al, 2020).

Enfin, les immunoglobulines polyvalentes purifiées de sujets sains constituent un traitement standard pour les patients souffrant d'immunodéficience primaire (SRIARON et al, 2015). Cependant, à cause de ses effets secondaires, de l'émergence et du succès de l'antibiothérapie, l'immunisation passive à base de sérum pour le traitement des infections bactériennes a été largement abandonnée dans la seconde moitié du vingtième siècle (GRAHAM et AMBROSINO, 2015).

#### **1.4 Immunothérapie à base d'anticorps monoclonaux**

Si la sérothérapie et l'immunisation passive à base d'anticorps polyclonaux purifiés ont été largement abandonnées dans le traitement des pathologies bactériennes au profit des antibiotiques, l'avènement des méthodes permettant de produire des anticorps monoclonaux a entraîné un retour de l'utilisation des anticorps, essentiellement dans le domaine des pathologies cancéreuses et des maladies inflammatoires.

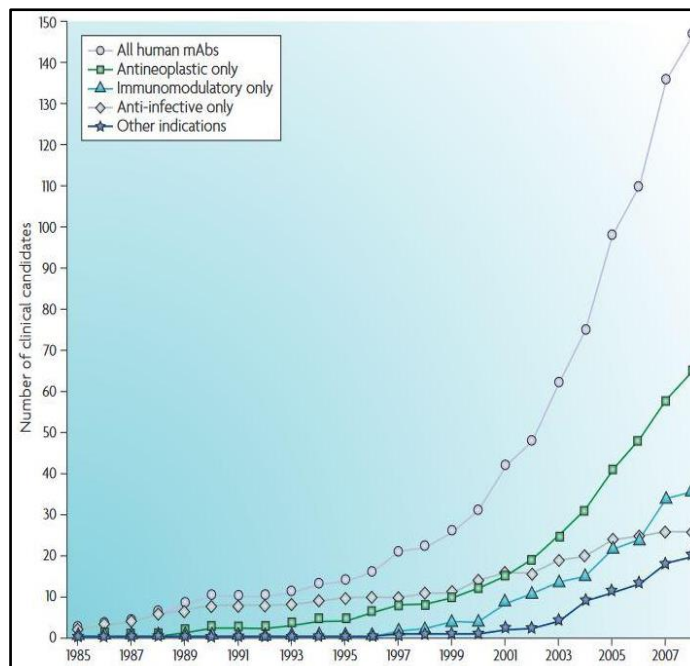
Un anticorps monoclonal reconnaît un unique antigène/épitope ce qui le rend très spécifique de sa cible. Ceci permet de limiter des effets secondaires dus au ciblage non désiré d'autres molécules. Par exemple, dans le cas d'anticorps dirigés contre des antigènes bactériens, l'utilisation d'anticorps monoclonaux pourrait permettre de cibler spécifiquement la souche de bactéries à l'origine de l'infection sans endommager la flore commensale comme le font les antibiotiques à large spectre (JONES-NELSON et al, 2020). Cette caractéristique peut cependant s'avérer à double tranchant dans le cas de mutations ponctuelles altérant l'antigène de façon à diminuer son interaction avec l'anticorps, pouvant ainsi provoquer une diminution d'efficacité de ce dernier (HAURUM et al, 2006) (LANGDON et al, 2016).

L'intérêt pour l'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapie a été croissant lors des dernières décennies. Depuis la validation par la FDA du premier anticorps thérapeutique en 1986, de nombreux autres ont été développés.

Le nombre d'anticorps monoclonaux humains entrés en phase d'essai clinique a subi une augmentation impressionnante entre 1985 et 2008 (Figure 9) (NELSON et al, 2010).

On compte aujourd'hui 79 anticorps thérapeutiques sur le marché, dont 19 acceptés pour la seule année 2018.

Bien que largement utilisés pour le traitement de cancers et de pathologies inflammatoires, ainsi que contre les rejets de greffes, les anticorps monoclonaux destinés à traiter les maladies infectieuses restent en faible nombre (ZHAVI et al, 2020) (ECKER et al, 2015) (NELSON et al, 2010). La plupart de ces derniers ciblent des virus : Palivizumab indiqué dans la prévention des infections dues au virus respiratoire syncytial (VRS) (FENTON et al, 2004) (IMPACT-RSV STUDY GROUP, 2008), l'Ansuvimab indiqué chez les patients atteints d'une infection par le virus Ebola (LEE, 2021) et l'Ibalizumab pour les infections dues au VIH résistantes aux anti-rétroviraux (MARKHAM et al, 2018).



**Figure 9 : Représentation graphique du nombre d'anticorps humains entrés en phase d'essai clinique entre 1985 et 2008.** Un total de 147 anticorps monoclonaux humains a été testé en essai clinique entre 1985 et 2008. On peut noter une forte prévalence des anticorps anti-cancéreux comparé aux autres classes d'anticorps. Les anticorps indiqués pour les maladies infectieuses représentent seulement 13% de tous les anticorps humains de phase clinique. (NELSON et al, 2010).

La récente pandémie de COVID 19 a cependant accéléré le développement des anticorps monoclonaux anti-infectieux avec un grand nombre d'anticorps contre le SARS-CoV-2 entrés en phase d'essai clinique et autorisés par la FDA et l'agence Européenne du médicament (EMA) (FOCOSI et al, 2022) pour la prévention et le traitement de la COVID-19.



En dehors des avantages sur les polyclonaux purifiés cités ci-dessus, les anticorps monoclonaux, d'une grande spécificité, sont aussi de plus en plus attractifs comme molécules thérapeutiques, car les connaissances portant sur leur isolement et leur ingénierie ont grandement progressés.

Par exemple, comme expliqué précédemment, un mécanisme d'action potentiel des anticorps est de recruter des effecteurs du système immunitaire. Pour favoriser ce mécanisme, l'isotype IgG1 est le plus communément utilisé pour les anticorps monoclonaux à visée thérapeutique. En effet, cet isotype combine la faculté d'interagir avec les protéines du complément ainsi que le FcγR des phagocytes (macrophages, monocytes, neutrophiles) dénotant une capacité fonctionnelle intéressante (MURPHY et WEAVER, 2016). De plus, la demi-vie dans le sérum des IgG1 est conséquente (21 jours).

À l'inverse, on peut utiliser d'autres isotopes si l'on veut bénéficier uniquement de l'action directe de l'anticorps et éviter l'activation d'autres mécanismes de la réponse immune.

D'autres interventions permettent de modifier les anticorps monoclonaux pour favoriser différents mécanismes effecteurs (VACCA et al, 2022) (LAZAR et al, 2006). Après interaction avec l'antigène, la formation d'hexamère d'IgG permet d'activer le complément (DIEBOLDER et al, 2014). Par exemple, l'introduction de certaines mutations dans la partie Fc de l'anticorps permet de promouvoir l'hexamérisation des IgG et ainsi le recrutement du complément (DE JONG et al, 2016). Un anticorps porteur d'une mutation de ce type (E430G), dirigé contre *Neisseria gonorrhoeae*, a ainsi montré un meilleur recrutement de la protéine du complément C1q et une meilleure efficacité *in vitro* et *in vivo*, comparée à l'anticorps non-muté (GULATI et al, 2019).

Grâce à différentes plateformes, il est également possible de produire des molécules anticorps de plusieurs spécificités en modifiant par exemple la région Fc de la chaîne lourde d'un anticorps A pour qu'elle forme un hétérodimère avec celle d'un anticorps B, ou en greffant la séquence d'une portion de la région Fab d'un anticorps (scfv – single chain fragment variable) sur un autre (SPIESS et al, 2015) (LIU et al, 2017).

Des mutations permettent également d'améliorer l'interaction du fragment Fc au récepteur FcRn (Neonatal Fc receptor) qui est impliqué dans le recyclage des anticorps, ce qui permet d'augmenter très substantiellement la demi-vie de l'anticorps en question (DALL'ACQUA et al, 2006) permettant ainsi une administration espacée de plusieurs mois.

Enfin, la glycosylation au niveau du site conservé de N-glycosylation Asn297 de la partie Fc joue un rôle important dans la structure, la stabilité et la fonction des anticorps (ARNOLD et al, 2007) (VIDARSSON et al, 2014). Il est ainsi possible de moduler la fonction de l'anticorps en modifiant le profil de glycosylation.

Par exemple, la présence ou l'absence de fucosylation sur ce site peut respectivement promouvoir le recrutement du complément ou l'activation de voies cellulaires comme la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps et l'opsonophagocytose (SHIELDS et al, 2002) (KAPUR et al, 2014).

Toutes ces modalités d'optimisation des anticorps ouvrent de vastes possibilités pour leur utilisation future en clinique et dans le traitement des infections bactériennes en particulier.

## **1.5 Anticorps monoclonaux dans le traitement des infections bactériennes**

### **1.5.2 Anticorps monoclonaux approuvés par la FDA**

À ce jour, seulement 3 anticorps monoclonaux ont été approuvés par la FDA pour le traitement d'infections bactériennes (MOTLEY et al, 2019). Le Raxibacumab et l'Obiltoximab sont deux anticorps monoclonaux anti-PA (Protective antigen) de la toxine de l'anthrax, indiqués dans la prévention et le traitement d'infections à *Bacillus anthracis* par inhalation (SUBRAMANIAN et al, 2005) (MIGONE et al, 2009) (GREIG et al, 2016).

Ces anticorps neutralisent la toxine en empêchant la liaison de PA à son récepteur sur la cellule cible et ainsi sa pénétration à l'intérieur de celle-ci (CHEN et al, 2011). Le Bezlotoxumab est un anticorps monoclonal humain neutralisant la toxine B (TcdB) de *Clostridium difficile* indiqué pour la prévention et le traitement d'infections récurrentes par ce pathogène (WILCOX et al, 2017).

De façon similaire aux anticorps précédents, cet anticorps bloque l'interaction de la toxine avec les cellules mammifères ce qui neutralise son effet (ORTH et al, 2014).

L'efficacité de ces anticorps repose sur le fait que lesdites toxines constituent les effecteurs principaux de la pathogénicité de ces bactéries, le choix du facteur de virulence ciblé est donc crucial pour le succès d'une telle thérapie (MORRISON, 2015).

### 1.5.3 Anticorps en essais cliniques

Si très peu d'anticorps visant les bactéries sont sur le marché, un nombre nettement plus important a atteint le stade des essais cliniques, certains ciblant également des toxines, d'autres bactéries pathogènes, et aussi d'autres facteurs de virulences (MOTLEY et al, 2019) (WANG-LIN et al, 2018) (WANG et al, 2022).

Parmi les plus prometteurs, on peut notamment citer l'anticorps KBSA301 (Salvecin™) ciblant l' $\alpha$ -hémolysine de *Staphylococcus aureus*, une toxine induisant l'apoptose de certaines cellules immunitaires, qui a rempli les prérequis fixés lors de la phase 2 des essais cliniques et dont le recrutement pour un essai en phase 3 est en cours (NCT03816956) (FRANÇOIS et al, 2018).

Des stratégies ciblant les exopolysaccharides de la paroi bactérienne comme la poly- $\beta$ -1,6-N-acetylglucosamine (PNAG), présent à la surface cellulaire, dans le biofilm, et fortement conservé entre différentes bactéries multi-résistantes, ont également été développées (ROUX et al, 2012). Par exemple, l'anticorps F598 a montré un effet protecteur dans un modèle animal contre une grande variété de bactéries pathogènes (CYWES-BENTLEY et al, 2012). Des essais cliniques de phase 2 ont également été entrepris, mais ont malheureusement été stoppés prématurément, des études intermédiaires ayant montré que la conception de l'essai n'était pas suffisamment adaptée pour mesurer un effet thérapeutique (NCT03222401).

D'autres approches ont opté pour le ciblage d'autres facteurs de virulence. Ainsi, l'anticorps 514G3 cible la protéine spA (Staphylococcal protein A). Cette protéine interagit avec le Fc $\gamma$  des IgG1, IgG2 et IgG4, inhibant ainsi l'opsonophagocytose médiée par ces isotypes (KANE et al, 2018).

L'anticorps 514G3 est capable de bloquer ce mécanisme d'évasion et de permettre la phagocytose des bactéries dans un modèle animal d'infection à staphylocoque (VARSHNEY et al, 2018).

Une étude clinique de phases 1 et 2 a été effectuée, mais l'échantillon de patients inclus n'a pas permis de tirer une conclusion significative sur l'innocuité de cet anticorps (NCT02357966).

Concernant *P.aeruginosa*, plusieurs anticorps spécifiques de la protéine PcrV du SSTIII ont également été développés et testés en essais clinique (phases 1, 2 et 2b) (JAIN et al, 2018) (ALI et al, 2018) (CHASTRE et al, 2020).

Les résultats de ces études seront discutés en détail dans le chapitre 4 de ce manuscrit, les stratégies développées se rapprochant de nos travaux.

Au total, très peu d'anticorps ont franchi la barre des essais de phase 3 et au regard des possibilités des anticorps monoclonaux, ce champ de recherche et développement est certainement amené à prospérer dans les années à venir. Pour une liste exhaustive des anticorps monoclonaux développés contre les infections bactériennes se référer à MOTLEY et al, 2019, WANG-LIN et al, 2018 et WANG et al, 2022.

## **Méthodes de développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques**

Il existe de nombreuses approches de production d'anticorps monoclonaux d'origine animale, et plus récemment, humaine. Si les anticorps humains, étant à l'origine des molécules sécrétées par le système immunitaire, sont généralement bien tolérés par les patients, l'utilisation d'anticorps monoclonaux d'origine animale peut poser des problèmes. Ainsi, l'administration d'anticorps murins peut donner lieu à une réponse immunitaire et à la sécrétion d'anticorps humains anti-anticorps de souris (HAMA), limitant l'utilisation de tels anticorps en thérapie (AZINOVIC et al, 2006) (GRUBER et al, 2000) (SCHROFF et al, 1985) (MIOTTI et al, 1999). Ces limites ont fortement motivé le développement et la sophistication de méthodes d'humanisation, ainsi que de production d'anticorps monoclonaux humains (WALDMANN, 2019). Les principales approches permettant l'obtention d'anticorps monoclonaux sont détaillées ci-dessous.

## 1.6 Hybridomes

L'introduction de la technologie des hybridomes en 1975 a permis pour la première fois la production d'anticorps monoclonaux (KÖHLER et MILSTEIN, 1975). Cette technique consiste à immuniser des souris avec un antigène donné.

Les splénocytes des souris immunisées sont ensuite récoltés et fusionnés avec des cellules myélomateuses permettant l'établissement de lignées immortelles de cellules productrices d'anticorps monoclonaux. Le profil de transcription cancéreux des cellules myélomatoses permet une sécrétion continue des anticorps (SHI et al, 2015). Différentes techniques de criblage permettent ensuite de sélectionner les hybridomes produisant les anticorps les plus intéressants en termes d'affinité pour l'antigène d'intérêt et d'efficacité fonctionnelle (SAKAGUCHI et al, 2021). Cette méthode permet de générer des anticorps avec l'appariement d'origine des chaînes lourdes et légères ayant subi le processus naturel de maturation dans les organes lymphoïdes secondaires, ce qui peut leur conférer une haute spécificité et affinité pour l'antigène d'immunisation (ZAROFF et al, 2019).

De plus, la production en cellules de mammifères permet d'assurer une présence de modifications post-traductionnelles similaires à l'hôte d'origine qui sont nécessaires aux fonctions et à la stabilité de l'anticorps (JEFFERIS, 2016).

Le modèle souris est aujourd'hui encore largement utilisé pour la production d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique. Comme expliqué ci-dessus, l'utilisation d'anticorps monoclonaux non-humains peut s'avérer limitante dans un contexte thérapeutique, entraînant une réponse immunitaire anti-anticorps se traduisant généralement par une baisse d'efficacité, une élimination rapide de l'anticorps thérapeutique ou des effets secondaires indésirables (GOMEZ-MANTILLA et al, 2014) (LEGOUFFE et al, 1994) (HANSEL et al, 2010). Bien qu'il soit possible de générer des hybridomes à partir de splénocytes humains, il n'existe pas de partenaire de fusion d'origine humaine qui soient pleinement compatible.

La fusion de cellules productrices d'anticorps humains avec des cellules myélomateuses d'une autre origine conduit à la formation d'hétéro-hybridomes qui sont sujet à une instabilité chromosomique : la croissance des cellules est affectée ainsi que la sécrétion des anticorps (SMITH et al, 2015).

Des progrès dans l'ingénierie des anticorps ont tout de même permis de réduire l'immunogénicité des anticorps monoclonaux murins. Le remplacement de domaines variables de chaînes lourdes et légères sur un anticorps humain par leurs homologues murins a permis d'obtenir des anticorps chimères mieux tolérés par l'organisme que les anticorps natifs de souris tout en conservant la même affinité pour l'antigène que l'anticorps d'origine (MORRISON et al, 1984) (IDUSOGIE et al, 2000). De plus amples avancées ont ensuite été faites avec le développement d'anticorps humanisés par greffe de régions déterminant la complémentarité (CDR) sur des anticorps humains (RIECHMANN et al, 1988). Les CDR sont des séquences localisées dans la région variable des chaînes lourdes et légères qui jouent un rôle majeur dans l'interaction avec l'antigène (TSUCHIYA et al, 2016). Cette méthode permet de garder une fonctionnalité similaire à l'anticorps d'origine tout en minimisant les séquences d'origine non-humaine (AHMADZADEH et al, 2014) (STUDNICKA et al, 1994).

### **1.7 Phage display**

La technologie du phage display initialement développée par Robert P. Smith a été une véritable révolution pour la production d'anticorps monoclonaux humains recombinants. Smith a montré qu'il était possible d'exprimer des peptides exogènes à la surface du phage filamentueux M13 en insérant la séquence du peptide d'intérêt dans le gène codant pour la protéine pIII du phage (SMITH, 1985). Cette méthode permet un criblage à haut débit des peptides ainsi présentés. Le phage display a rapidement été appliqué au criblage d'anticorps monoclonaux (MCCAFFERTY et al, 1990) (Winter et al, 1994) (BARBAS 3RD et al, 1991) (BURTON et al, 1991).

Pour cela, une banque des gènes d'immunoglobulines humaines (soit synthétique, soit provenant de sujets immuns) est constituée et exprimée dans le phage M13. Les fragments d'anticorps exprimés sur les phages sous le format « single chain variable fragment » (scFv), composé des régions variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère reliées par un linker (AHMAD et al, 2012), sont ensuite criblés contre un antigène immobilisé.

Les phages incapables de se lier à l'antigène sont éliminés par lavage et les phages sélectionnés sont amplifiés pour un autre cycle de criblage.

Ce processus de criblage appelé « biopanning » permet un enrichissement des phages présentant les fragments d'anticorps avec la plus haute affinité pour l'antigène (PARMLEY et al, 1988). Le séquençage des phages ainsi triés permet de récupérer les séquences des anticorps d'intérêt pour une production à grande échelle. Cette plateforme permet ainsi l'isolement rapide d'anticorps dirigés contre un large panel de cibles.

L'immunisation n'étant pas requise, en particulier avec les librairies synthétiques, il est possible d'isoler des anticorps dirigés contre des antigènes peu immunogènes ou toxiques (KUMAR et al, 2019). Les banques génomiques à partir de cellules de patients atteints d'une pathologie précise permettent aussi d'isoler des anticorps de plus hautes affinités pour des antigènes impliqués dans la maladie (GRAUS et al, 1998) (ROTHER et al, 2004).

Cette plateforme comporte néanmoins certaines limites. Lors de la construction de la banque de gènes d'immunoglobulines, les chaînes lourdes et légères sont appareillées aléatoirement ce qui ne permet pas de préserver l'appariement originel tel qu'il pouvait être chez l'individu dont provient la banque (SHEETS et al, 1998) (STEINWAND et al, 2014). Lors du criblage, les anticorps exprimés dans *E. coli* ne sont pas glycosylés ce qui peut fausser la sélection et générer des biais vis-à-vis des réelles propriétés physico-chimiques des anticorps lors du passage à des systèmes d'expression de mammifères (ALFALEH et al, 2020) (HUANG et al, 2006). En effet, il a été montré que la glycosylation des régions variables pouvait avoir un impact significatif sur la stabilité et la reconnaissance de l'antigène (WRIGHT et al, 1991) (MELO-BRAGA et al, 2021). Cette approche est également dépendante de la disponibilité de l'antigène recombinant en quantité suffisante. De plus, la nature du processus d'immobilisation d'une protéine peut provoquer des changements conformationnels menant à la sélection d'anticorps reconnaissant des épitopes non exposés dans un contexte physiologique (KUMAR et al, 2015) (LIPES et al, 2008).

Le développement de nouvelles technologies comme l'utilisation de cellules pour présenter des antigènes lors du biopanning (ALFALEH et al, 2017) et le remplacement de phages par des levures ou des cellules de mammifères pourrait permettre de contourner ces limites (GERA et al, 2013) (HO et al, 2009).

## **1.8 Isolement d'anticorps monoclonaux par tri de lymphocytes B mémoire**

Les progrès technologiques en biologie cellulaire et moléculaire, et scientifiques en immunologie des lymphocytes B a permis l'avènement de nouvelles approches pour l'isolement et la production des anticorps monoclonaux, en particulier humains.

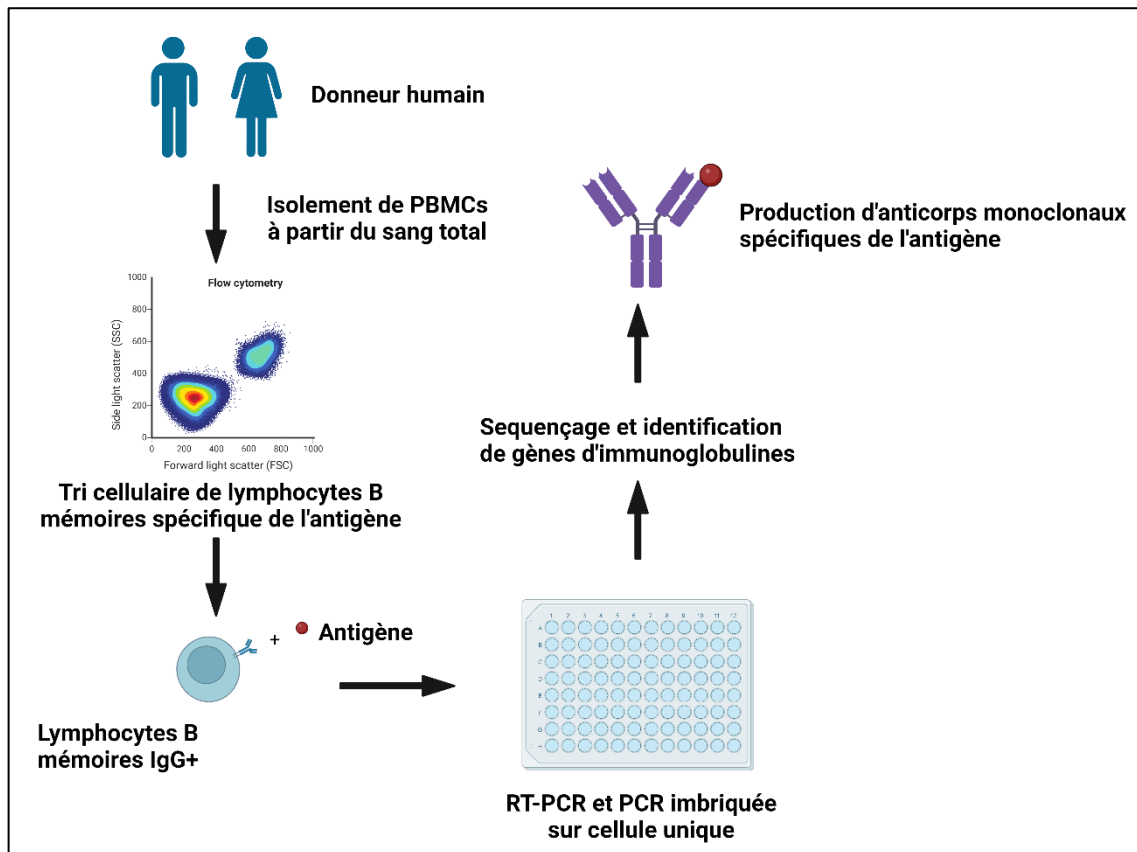
Ces différentes approches ont été détaillées dans l'excellente revue de Pedrioli et Oxenius (PEDRIOLI et OXENIUS, 2021). Ainsi, le tri de lymphocytes B par cytométrie en flux ou FACS (Fluorescence-Activated Cell sorting) est une méthode permettant l'isolement de lymphocytes B mémoires dont les anticorps de surface ou « B cell receptor » (BCR) reconnaissent un antigène précis (Figure 10).

Dans cette approche, les lymphocytes B mémoires sont sélectionnés sur la base de leur capacité à se lier à un antigène marqué avec une sonde fluorescente. Les cellules d'intérêt sont ensuite clonées à raison d'une cellule par puits dans des plaques de 96 puits. L'ARNm de ces cellules est ensuite extrait et rétro-transcrit en ADNc par RT-PCR. Les gènes d'immunoglobulines peuvent ainsi être amplifiés par PCR et clonés dans des vecteurs d'expression afin de permettre la production des anticorps correspondants (TILLER et al, 2008).

Cette approche, rendue possible par les progrès de la biologie moléculaire et le développement de PCR sur cellule unique, permet de conserver le couplage des chaînes lourde et légère. La production ensuite en cellules de mammifères permet des modifications post-traductionnelles natives, réduisant aussi le risque d'immunogénicité et d'agrégation (JEFFERIS et al, 2016). Les anticorps sélectionnés ainsi, ayant pour beaucoup subi le processus de maturation *in vivo* au sein des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, présentent généralement une forte affinité pour l'antigène reconnu et une faible réactivité contre les molécules du soi (CARTER et al, 2006). L'aspect haut débit du tri cellulaire rend possible le criblage de nombreuses cellules et l'identification d'anticorps rares. Une application notable a été l'isolement d'anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1, reconnaissant la gp120 (WU et al, 2010) (ZHOU et al, 2010) (WALKER et al, 2009) (WALKER et al, 2011).



Le recours à des antigènes protéiques recombinants constitue cependant une limite de cette technique. Par exemple, la conformation de la protéine recombinante ne mimant pas nécessairement celle de la protéine native, les épitopes exposés lors de la sélection des lymphocytes B ne sont peut-être pas accessibles dans la protéine native (MOODY et al, 2008).



**Figure 10 : Isolement d'anticorps monoclonaux humains par tri de lymphocytes B mémoires exprimant des BCR spécifiques d'un antigène.** Dans cette approche, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) sont isolées à partir du sang total d'un donneur humain. Cette fraction du sang contient notamment les lymphocytes B. Les lymphocytes B mémoires capables d'interagir avec un antigène donné via leurs anticorps de surface (BCR) sont triés à la fréquence d'une cellule par puits dans une plaque 96 puits. Les gènes d'immunoglobulines sont amplifiés à partir des ARNm par RT-PCR et PCR imbriqués. L'obtention et l'identification de ces gènes permet la production d'anticorps monoclonaux humains spécifiques de l'antigène utilisé lors du tri. Créée avec biorender.com

Le tri de lymphocytes B spécifiques par FACS est maintenant une technique robuste et rapide permettant l'identification, l'isolement et la production d'anticorps humains. L'accès direct au répertoire d'anticorps humains représente un fort atout pour une finalité thérapeutique.

Cette technique nécessite cependant la production des anticorps afin de tester leur fonctionnalité sur le pathogène cible ce qui peut s'avérer laborieux et chronophage si le nombre d'anticorps isolés est élevé, et si les anticorps d'intérêt sont rares dans le répertoire.

Une autre approche permettant l'isolement d'anticorps monoclonaux en particulier humains consiste à trier l'ensemble des lymphocytes B mémoires d'un échantillon de PBMC à la fréquence d'une cellule par puits et de les activer via un cocktail de cytokines et de cellules nourricières pour induire la sécrétion des anticorps. Les surnageants de culture chargés d'anticorps peuvent ensuite être criblés en tests de fixation ou en tests fonctionnels *in vitro* pour identifier et ne produire que ceux qui possèdent les caractéristiques recherchées. Comme précédemment, les gènes d'immunoglobulines sont alors amplifiés par PCR à partir de cellules uniques, puis clonés dans des vecteurs d'expression.

Cette méthode a aussi été utilisée avec succès pour isoler par exemple des anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH (WRAMMERT et al, 2008) (SMITH et al, 2009) (WALKER et al, 2009) (WALKER et al, 2011).

### **1.9 Souris transgéniques humanisées possédant un répertoire d'immunoglobuline humain**

Le développement de plusieurs lignées de souris transgéniques porteuses du répertoire anticorps humains permet aujourd'hui la production d'anticorps humains dans la souris (LONBERG et al, 1997) (MENDEZ et al, 1997) (ISHIDA et al, 2002) (MURPHY et al, 2014). L'anticorps monoclonal humain Panitumumab spécifique d'EGRF humain (epidermal growth factor receptor) indiqué pour le traitement du cancer colorectal a été le premier anticorps dérivé de souris humanisée à être accepté par la FDA en 2006 (JAKOBOVITS et al, 2007).

En conclusion, les progrès en matière d'isolement d'anticorps monoclonaux ont été spectaculaires au cours des deux dernières décennies et participent de la progression de ces molécules dans le champ clinique. Certaines des plateformes permettent l'isolement très rapide d'anticorps humains thérapeutiques fonctionnels.

Durant la pandémie de SARS-CoV-2, des anticorps neutralisants ont été isolés grâce à des approches d'immunisation de souris humanisées et des approches d'isolement de cellules B mémoire de patients convalescents dans des délais compris entre quelques semaines et quelques mois, permettant une mise sur le marché extrêmement rapide. Les anticorps monoclonaux ont été le premier traitement efficace contre la COVID-19 mis à la disposition des cliniciens. L'équipe de Dennis Burton et collaborateurs a même décrit une approche permettant d'isoler des anticorps fonctionnels à partir de cellules B de patients infectés en seulement 10 jours (ROGERS et al, 2020).

## **Chapitre IV : Le système de sécrétion de type III, une cible attractive pour le développement d'anticorps monoclonaux humains contre *P. aeruginosa***

Le rôle et l'importance de PcrV dans le mécanisme d'action du système de sécrétion de type III, détaillés au chapitre 2, font de cette protéine une cible intéressante pour le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques.

### **PcrV comme cible pour le développement d'anticorps monoclonaux**

Comme vu précédemment, l'expression de PcrV est requise pour la cytotoxicité et la virulence médiée par le SSTIII *in vitro* et *in vivo* (SAWA et al, 1999). Sawa et collègues ont, par exemple, montré que la délétion chromosomique du gène codant PcrV dans la souche PA103 s'accompagnait de l'abolition de la cytotoxicité sur une lignée cellulaire de macrophages (J774) et de sa virulence dans la souris (SAWA et al, 1999). Ces résultats soulignent l'importance de PcrV dans la pathogénicité induite par le T3SS de *P. aeruginosa*.

Ces résultats ont tout d'abord motivé le développement d'IgG polyclonales anti-PcrV en immunisant des lapins avec la protéine PcrV recombinante.

L'utilisation de ces anticorps a montré un blocage de la translocation d'ExoY et une réduction drastique de la cytotoxicité de PA103 sur des macrophages *in vitro* (SAWA et al, 1999).

L'immunisation passive de souris par ces IgG polyclonales anti-PcrV ainsi que l'immunisation active avec PcrV recombinant ont confirmé ces résultats *in vivo*. Les souris immunisées ont bénéficié d'une protection complète contre l'infection par PA103 contrairement aux souris non immunisées. Ces résultats ont fortement stimulé l'intérêt de la communauté scientifique pour PcrV comme cible pour le développement d'anticorps ou de vaccins. Une telle approche pourrait permettre de neutraliser la virulence médiée par le

SSTIII et ainsi de restaurer l'activité des macrophages, permettant l'élimination des bactéries par phagocytose (BARON et al, 2007) (SAWA et al, 1999) (HOWELL et al, 2013). Le SSTIII est uniquement exprimé par des souches pathogènes, cette approche n'aurait donc pas d'effet sur le microbiote.

Contrairement aux antibiotiques, le ciblage de facteurs de virulence n'a pas d'effet direct sur la croissance et la viabilité des bactéries ce qui exerce une pression de sélection plus faible et réduit le risque d'apparition de résistances (FASCIANO et al, 2019) (CEGELSKI et al, 2008) (LIAO et al, 2022).

Tous ces travaux ont ensuite mené au développement d'anticorps monoclonaux contre PcrV.

## **Anticorps monoclonaux Anti-PcrV**

### **1.1 Mab166, anticorps monoclonal murin anti-PcrV**

L'anticorps monoclonal murin anti-PcrV mab166 a été isolé à partir du criblage d'hybridomes obtenus de splénocytes de souris immunisées avec du PcrV recombinant (FRANK et al, 2002). Le mab166 a ainsi pu être isolé par criblage ELISA pour sa capacité à interagir avec PcrV ainsi qu'en criblage fonctionnel pour son activité d'inhibition de l'injection d'ExoU par la souche PA103. Le mab166 a été capable de protéger les souris dans un modèle de pneumopathie aiguë induite par PA103. L'addition de 50 µg et 10 µg de mab166 à un inoculum de PA103 (4 fois la dose létale) permet respectivement la protection de 90% et 80% des souris traitées 7 jours après l'infection. Dans le cadre d'une immunisation passive, l'administration de 100 µg de mab166 1 heure avant l'inoculation montre une protection totale. Les auteurs ont également mis en évidence un effet protecteur du Fab du mab166 similaire à l'anticorps complet, ce qui suggérerait que la partie Fc et les fonctions effectrices ne sont pas requises pour la protection. Des expériences de cartographie d'épitope par Western-blot sur des fragments de PcrV et par la méthode de phage display ont montré que mab166 interagit avec la région 158-217 de PcrV. Le mab166 a également été testé dans un modèle de pneumopathie aiguë induite par *P.aeruginosa* chez le rat (FAURE et al, 2002).

L'utilisation du mab166 et du mab166 Fab en co-administration avec PA103 ou 1 heure après l'inoculation des bactéries montre une réduction des différents marqueurs de dommages pulmonaires (œdème pulmonaire, acidose métabolique, fuite d'albumine marquée des poumons vers la circulation sanguine) comparé aux rats traités avec des IgG contrôles.

Dans ce modèle, le mab 166 et le mab166 Fab semblaient avoir un effet protecteur équivalent montrant une tendance similaire à l'étude précédente.

Il pourrait y avoir un bénéfice ou un effet synergique de l'utilisation des anticorps en combinaison avec des antibiotiques. Une étude a donc étudié l'efficacité du traitement à la tobramycine, comparé au mab166 ainsi qu'à une combinaison des deux agents dans un modèle de souris infectées par PA103 (3 fois la dose létale) (SONG et al, 2012). Les différents agents ont été injectés 1h avant infection. Il a été montré que le traitement par la tobramycine a réduit la charge bactérienne dans le sang et les poumons à 8h et 12h post-infection (SONG et al, 2012). De plus, le traitement avec le mab166 permettait également une réduction significative des marqueurs de lésions pulmonaires (SONG et al, 2012). Un délai de mortalité entre les souris non traitées et les souris traitées avec le mab166 seul a été observé. Cependant, l'intégralité des souris du groupe traité avec le mab166 seul est décédée après 48h (SONG et al, 2012).

Cette différence d'efficacité de l'anticorps par rapport à l'étude précédente pourrait provenir de la voie d'administration et de la quantité d'anticorps injectés : 30 µg par souris dans la veine caudale pour cette étude et 100 µg administrés par voie intrapéritonéale dans le cas de l'étude de FRANK et collaborateurs (FRANK et al, 2002). Cependant, une protection de 60% et de 90% des souris après 7 jours a été observée pour le traitement par la tobramycine et le traitement tobramycine+mAb166 respectivement.

Ces données suggèrent qu'une action synergique entre les mécanismes d'action de l'antibiotique et de l'anticorps pourrait exister. Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que la combinaison de l'effet bactéricide de l'antibiotique avec l'effet inhibiteur de la toxicité du SSTIII permettrait une élimination efficace des bactéries tout en évitant leur dissémination dans l'organisme grâce à la préservation de l'intégrité pulmonaire.

Le mab166 a également montré un effet protecteur chez la souris contre l'isolat R4, une souche clinique multi-résistante de *P. aeruginosa* (WANG et al, 2014). Parmi les isolats cliniques testés, l'expression de PcrV était similaire entre le groupe susceptible et le groupe résistant aux antibiotiques (WANG et al, 2014).

Dans cette étude, le mab166 a procuré une forte protection et une réduction de tous les marqueurs de lésions pulmonaires contre la souche R4 jusqu'à 24h post-infection.

La dose de 10 µg de mab166 co-instillée avec les bactéries a protégé 100 % des souris lors des 7 jours de l'étude. De plus, une réduction significative du nombre de bactéries a été observée dans le sang et les poumons à 6h et 12h post-infection suggérant un effet bactéricide du traitement (WANG et al, 2014). Les auteurs ont avancé l'hypothèse que le mab166 permettait de restaurer la fonction normale des cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des bactéries en inhibant la sécrétion d'effecteurs toxiques pour ces cellules.

Les résultats obtenus par ces études ont fait du mab166 un candidat prometteur pour une approche d'immunothérapie passive contre *P. aeruginosa* multi-résistant. L'origine murine de cet anticorps monoclonal limitait cependant son utilisation de cet anticorps en clinique et une version humanisée a donc été générée comme décrit ci-dessous.

## 1.2 KB001-A

Afin d'humaniser le mab166, le Fab 1A8 a été isolé à partir du criblage d'une banque génomique combinant les gènes des parties variables avec les gènes des régions constantes kappa et CH1 des lignées germinales humaines (BAER et al, 2009). Le CDR3 des chaînes lourdes et légères du mab166 a été greffé dans les parties variables humaines.

Cette approche a permis le développement d'un Fab recombinant entièrement humain à l'exception du CDR3 d'origine murine. Le Fab 1A8 possède la même zone d'interaction sur PcrV que le mab166 comme montré par ELISA de compétition (BAER et al, 2009). L'affinité de ce Fab mesurée par « surface plasmon resonance » (SPR), de l'ordre de 0,6 nM, est même légèrement supérieure à celle du mab166 Fab qui est de 1,1 nM. Le Fab 1A8 a également été comparé au mab166 et au mab166 Fab dans un modèle de pneumopathie aiguë induite par PA103 chez la souris.

Le Fab 1A8 a démontré une efficacité légèrement supérieure à celle du mab166 Fab, particulièrement à faibles concentrations. Les auteurs ont proposé que l'affinité supérieure du Fab 1A8 serait la cause de cette différence d'efficacité (BAER et al, 2009).

Le traitement des souris avec 1A8 est accompagné de l'élimination des bactéries au site de l'infection comme montré plus tard par Wang et collègues (WANG et al, 2014). À la suite des résultats prometteurs obtenus dans le modèle souris, une version du Fab 1A8 conjuguée au polyéthylène glycol (PEG) nommé KB001-A a été développée par la société Kalobios (MILLA et al, 2014). La conjugaison avec le PEG a pour but d'augmenter la demi-vie de l'anticorps, le format Fab a en effet une demi-vie très réduite in vivo (CHAPMAN, 2002). Cet anticorps a été testé dans plusieurs essais cliniques portant sur l'évaluation de son innocuité et de son efficacité sur des patients en soins intensifs (FRANÇOIS et al, 2012) et sur des patients atteints de mucoviscidose (MILLA et al, 2014) (JAIN et al, 2018). L'essai clinique en phase 2a (NCT00691587) portant sur les patients en soins intensifs a inclus 39 patients sous ventilation mécanique et colonisés par *P. aeruginosa* (FRANÇOIS et al, 2012). Un groupe de patients a reçu un placebo et deux groupes ont reçu les doses de 3 mg/kg et 10 mg/kg de KB001 en intraveineuse. Le KB001-A a été bien toléré par les patients, aucune différence significative de développement d'effets indésirables n'a été observée entre les 3 groupes.

Lors des 28 jours d'observation de l'étude, respectivement 33% et 31% des patients ont développé une pneumopathie associée à *P. aeruginosa* dans les groupes traités à 3 mg/kg et 10 mg/kg contre 60 % dans le groupe placebo (FRANÇOIS et al, 2012). Cependant, le faible échantillon de patients n'a pas permis de considérer cette différence comme significative bien que ces résultats demeurent prometteurs pour une utilisation thérapeutique ultérieure.

Milla et collègues ont conduit une étude de phase 1-2 (NCT00638365) afin de mesurer l'effet du KB001-A sur 27 patients atteints de mucoviscidose (MILLA et al, 2014).

Le schéma d'administration, les doses d'anticorps et la durée d'observation ont été identiques à ceux de l'étude précédemment citée (FRANÇOIS et al, 2012).

Lors de l'étude, aucune différence dans les fonctions pulmonaires et respiratoires ou la charge bactérienne dans les poumons n'a été constatée entre les groupes bien que des souches de *P. aeruginosa* exprimant le SSTIII ont été détectées chez tous les patients.



Cependant, une diminution significative de marqueurs de l'inflammation tels que le nombre de neutrophiles et la quantité d'élastase a été notée chez les patients traités avec 3 mg/kg et 10 mg/kg suggérant un effet anti-inflammatoire du KB001-A sur les patients atteints de mucoviscidose (MILLA et al, 2014).

Selon les auteurs, l'administration d'une dose unique du KB001-A serait insuffisante pour un effet de protection significatif contre *P. aeruginosa* dans un contexte de mucoviscidose. Afin de confirmer ces résultats, une autre étude de phase 2 (NCT01695343) incluant 182 patients atteints de mucoviscidose et s'étalant sur 16 semaines a été menée (JAIN et al, 2018). Les auteurs ont émis l'hypothèse que le traitement au KB001-A pourrait permettre de rallonger le délai nécessaire avant un traitement antibiotique. Prenant en compte les résultats de la précédente étude (MILLA et al, 2014), 5 doses de 10 mg/kg de KB001-A ont été administrées aux patients au cours de l'étude. De façon similaire à l'étude de Milla et collègues, une diminution significative de marqueurs de l'inflammation tels que l'élastase des neutrophiles et l'interleukine 8 a été observée (JAIN et al, 2018). Cependant, aucune différence significative du délai avant traitement antibiotique n'a été mesurée entre le groupe traité et le groupe placebo. L'hypothèse de la faible expression du SSTIII par *P. aeruginosa* dans un contexte d'infection chronique a été avancée pour expliquer cette absence d'effet du KB001-A (JAIN et al, 2004) (JAIN et al, 2008).

### 1.3 V2L2MD

L'anticorps humain V2L2-MD a été isolé à partir d'hybridomes provenant de cellules de souris Veloclmmune immunisées avec PcrV recombinant (WARRENER et al, 2014). Ces souris possèdent une insertion de l'ordre de 6 Mpb contenant une partie du répertoire d'anticorps humain, permettant de produire des anticorps humains dans la souris (MURPHY et al, 2014). Dans cette étude, cet anticorps a été comparé au mab166 dans un modèle de pneumopathie aiguë chez la souris.

Le V2L2-MD a montré un effet supérieur au mab166 dans la protection des souris infectées par les souches cytotoxiques ExoU + 6077 et 6206 ainsi que les souches invasives ExoS + 6294 (WARRENER et al, 2014).

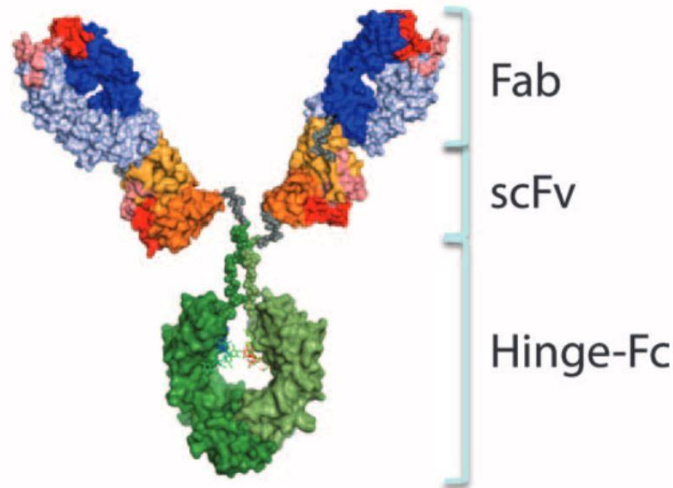
Cette tendance a été observée à la fois lorsque les anticorps ont été administrés en prophylaxie (24h avant l'infection) et en thérapie (1h après l'infection). Le V2L2-MD s'est montré également efficace à faible dose (0,2mg/kg) dans un modèle de bactériémie médié par l'isolat cytotoxique 6206 exprimant ExoU chez la souris. La réduction significative de la charge bactérienne dans les poumons, la rate et les reins observée supporte ces résultats. L'anticorps V2L2-MD a une affinité 50 fois plus haute pour PcrV que le mab166 ce qui peut expliquer les différences d'efficacité dans les différents modèles d'infection de cette étude. De plus, ces deux anticorps reconnaissent des épitopes différents sur PcrV, suggérant que la protéine dispose de plusieurs épitopes neutralisants dont certains pourraient être plus critiques que d'autres pour l'inhibition de l'injection d'effecteurs du SSTIII (WARRENER et al, 2014).

#### **1.4 MEDI3902**

Le MEDI3902 est un anticorps humain bi-spécifique antiPcrV et anti-Psl qui a été développé par la compagnie MedImmune (DIGIANDOMENICO et al, 2014). Initialement nommé BiS4 $\alpha$ Pa, cet anticorps a été conçu en insérant génétiquement les séquences codant pour le scfv d'un anticorps anti-Psl nommé Cam-003 et précédemment isolé par phage display, (DIGIANDOMENICO et al, 2012) entre la région hinge et le Fab de l'anticorps V2L2-MD décrit ci-dessus (WARRENER et al, 2012) (Figure 11).

Comme décrit au chapitre II, Psl est un exopolysaccharide impliqué dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules de l'hôte et dans la formation de biofilm (JACKSON et al, 2004) (BYRD et al, 2009) (MA et al, 2012). En ce sens, c'est une cible potentielle pour des approches thérapeutiques.

L'anticorps MEDI3902 a montré une efficacité similaire à celle des anticorps parentaux dans des tests d'adhérence cellulaire et d'opsonophagocytose pour la composante anti-Psl, et de cytotoxicité pour la composante anti-PcrV.



**Figure 11 : Assemblage des différentes sous-unités du MEDI3902.** Les fragments Fc et le domaine charnière sont présentés en vert et vert-foncé. La chaîne lourde du scFv anti-Psl est en orange foncé, la chaîne légère en orange clair. La chaîne lourde du Fab anti-PcrV est colorée en bleu foncé, la chaîne légère en bleu clair. La partie correspondant aux CDRs (complementarity determining regions) du Fab est indiquée en rouge foncé et rouge clair. Ces différents domaines ont été modélisés dans Pymol et assemblés sur PowerPoint par l’auteur. (DiGiandomenico et al, 2014).

Les auteurs ont également comparé le MEDI3902 avec une combinaison des deux anticorps parentaux en administration prophylactique (24h avant infection) dans un modèle de pneumopathie aiguë chez la souris (DIGIANDOMENICO et al, 2014). De façon surprenante, l’administration de faibles doses de MEDI3902 a permis de réduire significativement la mortalité des souris infectées par les isolats cytotoxiques 6206 et 6077 alors que la combinaison des anticorps anti-PcrV et anti-Psl a montré une protection faible ou nulle à ces concentrations. Ces résultats ont suggéré une synergie entre les mécanismes d’actions des composantes anti-PcrV et anti-Psl du MEDI3902. Cette synergie a été confirmée en testant plusieurs versions du MEDI3902 dont les composantes anti-PcrV ou anti-Psl ont été remplacées par des fragments contrôles. Selon les auteurs, l’efficacité accrue du MEDI3902 résulterait donc de son format bi-spécifique et de la synergie opérée entre sa composante anti-Psl et anti-PcrV. L’avidité de la composante anti-Psl pour cet exopolysaccharide fortement représenté à la surface de la bactérie pourrait permettre une forte concentration locale de MEDI3902 ainsi qu’une activité anti-PcrV renforcée, PcrV étant exprimé en faible quantité à la surface. De plus, l’activité d’inhibition de la cytotoxicité du SSTIII médiée par la composante anti-PcrV pourrait avoir une action synergique avec l’effet opsonisant de la partie anti-Psl du MEDI3902, permettant une élimination efficace des bactéries tout en protégeant les tissus et les cellules immunitaires de l’hôte.

Cette hypothèse est notamment supportée par la forte réduction de la charge bactérienne chez les souris traitées avec le MEDI3902.

De façon intéressante, l'administration à des doses infra-thérapeutiques d'une combinaison de tobramycine et de MEDI3902 a permis de réduire significativement la mortalité de souris infectées par l'isolat 6077 résistant à la tobramycine comparé à chaque composant administré de façon indépendante. Les auteurs ont suggéré un effet synergique entre le MEDI3902 et le traitement antibiotique qui pourrait s'avérer utile dans la lutte contre les infections causées par les bactéries multi-résistantes.

Afin de déterminer la prévalence des cibles du MEDI3902, les génomes de 913 isolats cliniques provenant de 45 pays différents et collectés entre 2003 et 2014 ont été séquencés (TABOR et al, 2018). PcrV et Psl ont respectivement été détectés dans 99% et 94% des souches. En alignant les séquences de PcrV des isolats étudiés avec le PcrV de PAO1, les auteurs ont mis en évidence la présence de substitutions d'acides aminés sur 35 positions menant à l'identification de 46 isotypes de PcrV. La résolution de la structure du complexe V2L2Fab-PcrV (fragment comprenant les acides aminés 1-17 fusionnés avec les acides aminés 149-236) a permis de déterminer les épitopes de PcrV reconnus par le MEDI3902. Aucun de ces épitopes n'est situé aux positions polymorphiques, l'interaction entre le MEDI3902 et les différents isotypes a été confirmée par Western-Blot (TABOR et al, 2018). À la suite des essais encourageants chez l'animal, un essai clinique en phase 1 (NCT02255760) a été conduit sur une cohorte de 56 sujets sains afin de s'assurer de l'innocuité du MEDI3902 et de mesurer ses propriétés pharmacocinétiques (ALI et al, 2019). Lors des 61 jours de l'étude, l'effet indésirable le plus commun a été l'apparition de démangeaisons chez certains sujets, cependant aucun effet indésirable sérieux n'a été détecté. Avec des doses croissantes de MEDI3902 administrées aux sujets, il a été montré une pharmacocinétique linéaire de l'anticorps. Au jour 28, le sérum des patients ayant reçu des doses supérieures à 750 mg renfermait encore une concentration détectable de MEDI3902 dans le sérum (>5,3 ug/mL) (TABOR et al, 2018). Ces résultats ont été suffisants pour la poursuite en phase 2 de l'essai clinique (NCT02696902) (CHASTRE et al, 2020). Cette étude a été menée sur 168 patients positifs pour *P. aeruginosa* dans le tractus respiratoire inférieur. Une dose de 1500mg de MEDI3902 a été administrée à 83 patients, les autres patients ont reçu un placebo.

Les valeurs pharmacocinétiques observées chez les patients traités se sont avérées bien supérieures à la valeur cible avec une concentration sérique moyenne de 9,46 ug/mL (cible 1,7 ug/mL). Cependant, la mortalité du groupe traité (28,2%) a été supérieure au groupe placebo (22,9%) bien que cette différence ne soit statistiquement pas significative. Une efficacité a néanmoins été observée chez les patients montrant un faible niveau de marqueurs de l'inflammation, suggérant que le MEDI3902 pourrait avoir une efficacité chez ce profil de patients.

À ce jour, aucun anticorps anti-PcrV est disponible sur le marché. Les essais chez les animaux avec les anticorps développés ont été encourageants mais peu transposables aux essais sur l'humain. En tout état de cause, en raison de son importance dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*, PcrV demeure une cible fortement intéressante pour le développement d'anticorps monoclonaux.

# Projet de thèse :

## 1) Contexte

Comme expliqué précédemment, la résistance aux antibiotiques est un problème croissant de santé publique mondiale faisant peser une charge croissante sur les hôpitaux. Les prévisions des organismes de surveillance sont alarmantes et l'urgence de développer des approches alternatives aux antibiotiques n'a jamais été aussi grande. Les anticorps présentent de nombreux avantages pour lutter contre les bactéries. En particulier, leur grande spécificité permet d'éviter le développement de résistances croisées et l'altération du microbiote. De plus, l'ingénierie des anticorps a fait d'énormes progrès au cours des dernières années, et permet notamment l'obtention de demi-vies longues, d'affinité très élevées, de molécules multi-spécifiques, ainsi qu'une diminution très significative des coûts de production. Par ailleurs, dans leur utilisation antibactérienne, les anticorps pourraient être utilisés seuls, mais aussi en synergie avec des traitements antibiotiques.

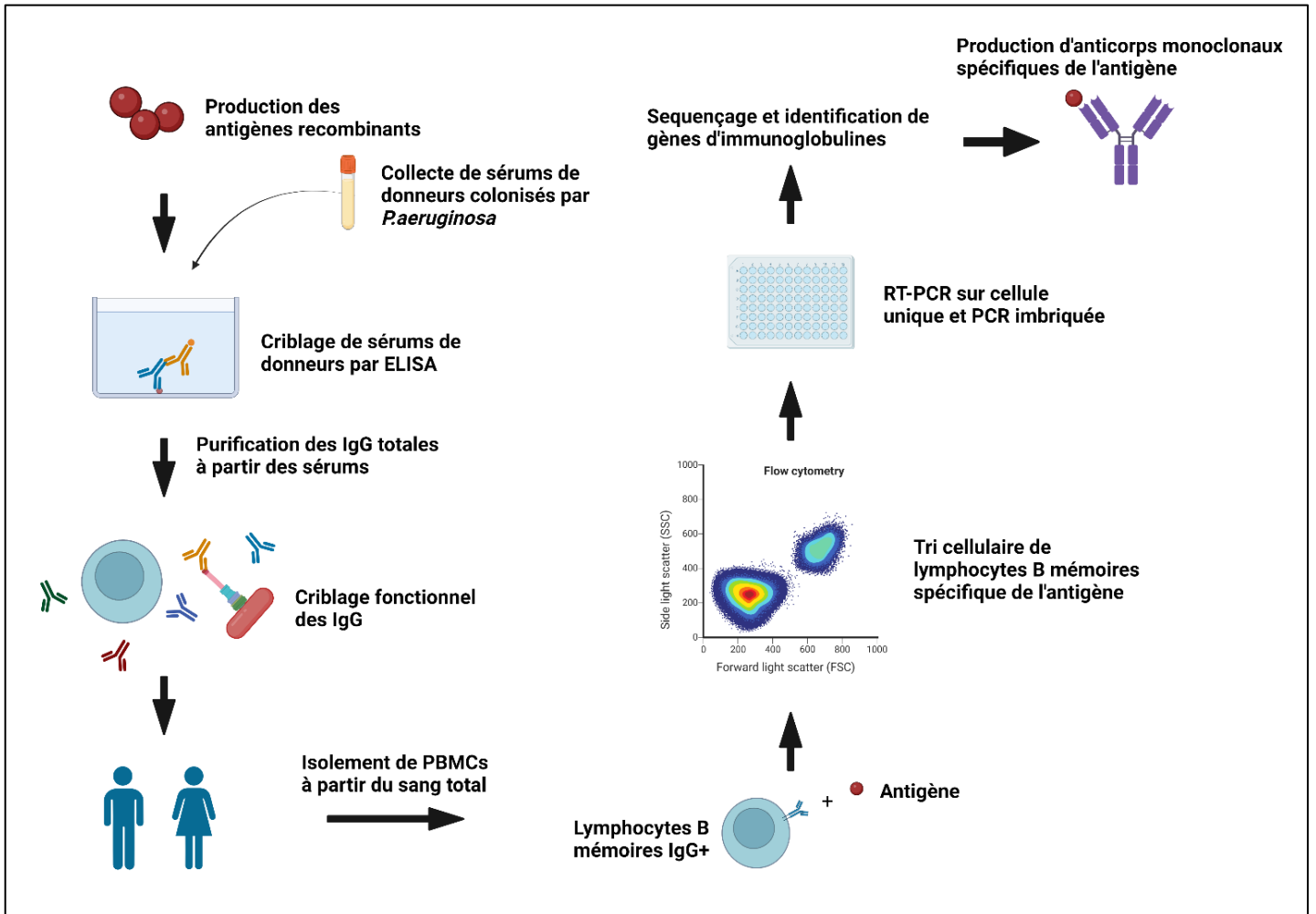
La génétique et les mécanismes de pathogenèse de *P.aeruginosa* ont été largement documentés dans la littérature ces dernières décennies. Le statut de pathogène prioritaire couplé à la grande quantité d'informations disponibles ainsi que l'expertise des équipes PBRC et PATBAC de l'IBS de Grenoble ont motivé le choix de *P.aeruginosa* comme cible pour l'isolement d'anticorps monoclonaux humains.

Cette thèse s'est déroulée en co-tutelle entre l'équipe anticorps et maladies infectieuses (AID) menée par Pascal Poignard et l'équipe pathogenèse bactérienne (PATBAC) dirigée par Andréa Dessen.

L'équipe AID dispose d'une forte expertise dans l'isolement d'anticorps monoclonaux humains, P.Poignard ayant été impliqué dans la découverte des premiers anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1 (WALKER et al, 2009) (WALKER et al, 2011). L'équipe PATBAC a grandement participé à la caractérisation des protéines PcrV (GOURE et al, 2004) (SCHOEN et al, 2003) et PscF (QUINAUD et al, 2005) (LOMBARDI et al, 2019) en collaboration avec l'équipe PBRC menée par Ina Attrée. L'équipe PBRC a notamment développé le test fonctionnel permettant de mesurer l'injection de l'effecteur ExoS dans des cellules A549 qui a été utilisé pour cribler les anticorps isolés lors de cette thèse.

## 2) Sujet de thèse :

À l'heure actuelle, il n'existe pas d'anticorps humains disponibles pour traiter les infections bactériennes. La majorité des anticorps antibactériens décrits sont directement dérivés de modèles animaux ou ont subi un processus d'humanisation. L'objet de cette thèse a été d'isoler des anticorps purement humains ciblant les protéines PcrV et PscF avec une finalité thérapeutique. Nous avons pour cela utilisé une approche consistant à isoler des lymphocytes B mémoire IgG+ de patients infectés par *P.aeruginosa* en utilisant les facteurs de virulence PcrV et PscF sous forme recombinante. La première étape de cette thèse a consisté à produire les protéines PcrV et PscF dans *E.Coli*. Ces dernières ont été utilisées pour cribler les sérums de patients atteints de mucoviscidose par ELISA afin de constituer une cohorte de patients présentant de forts titres en anticorps pour les cibles d'intérêt. Les anticorps de ces patients ont ensuite été testés pour leur capacité à inhiber l'injection de la toxine ExoS dans des cellules A549 *in vitro*. Afin d'isoler les anticorps monoclonaux chez les individus sélectionnés, les lymphocytes B mémoire IgG+ spécifiques des cibles d'intérêts ont été triés par cytométrie en flux en utilisant les protéines recombinantes conjuguées à la streptavidine marquée par fluorochrome. Les gènes d'immunoglobulines des cellules B spécifiques ont ensuite été amplifiés par PCR sur cellule unique et séquencés afin de permettre l'identification des couples chaîne lourde/chaîne légère d'intérêt. Les gènes d'immunoglobulines appropriés ont pu être clonés dans des vecteurs d'expression et produits dans un système d'expression de cellules mammifères (HEK293F). Après purification par chromatographie d'affinité à la protéine A, la spécificité des anticorps produits pour les cibles a été vérifiée par ELISA. Les anticorps démontrant une forte interaction avec PcrV ou PscF ont été sélectionnés et leur capacité à inhiber l'injection d'ExoS dans des cellules A549 a été testées *in vitro*. Les meilleurs candidats en tests fonctionnels de neutralisation ont été choisis pour une plus ample caractérisation de leur affinité et de leur épitope.



**Figure 12** : Représentation schématique de l'approche d'isolement d'anticorps monoclonaux humains utilisé lors de ce projet.



# Matériel et méthodes :

## **Obtention des plasmides pET15b(His-PcrV) et pET22B(PscF-His)**

Le plasmide pET15b codant pour le gène de PcrV (PAO1) générant une protéine avec une étiquette hexahistidine en N-terminal et le plasmide (pET22b) codant pour le gène de PscF (PAO1) générant une protéine avec une étiquette hexa-histidine en C-terminal ont été gracieusement fournis par Viviana Job de l'équipe PBRC de l'IBS de Grenoble.

## **Construction pESPRIT001-His-PcrV-Avitag**

La séquence codant PcrV (PAO1) a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pET15b (His-PcrV) en utilisant les amorces sens Forward-Infusion-pESPRIT-HisPcrVAvitag et antisens Reverse-Infusion-pESPRIT-HisPcrVAvitag (Annexe 1). La séquence codant PcrV a été insérée entre les sites AatII et NsiI du pESPRIT002 (YUMEREFENDI et al, 2010) par recombinaison homologue à l'aide du kit Infusion (Takara Bio #638952).

## **Construction pESPRIT002-His-PscF-Avitag**

La séquence codant PscF (PAO1) a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pET22b (PscF-His) en utilisant les amorces sens Forward-Infusion-pESPRIT-HisPscFAvitag et antisens Reverse-Infusion-pESPRIT-HisPscFAvitag (Annexe 1). La séquence codant PscF a été insérée entre les sites AatII et NsiI du pESPRIT002 (YUMEREFENDI et al, 2010) par recombinaison homologue à l'aide du kit Infusion (Takara Bio# 638952).

## **Expression et purification de pET15b(His-PcrV)**

Le plasmide pET15b-His-PcrV a été transféré dans la souche d'*E.coli* BL21 DE3 par transformation bactérienne. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une densité optique mesurée à 600 nm de 0,8 ( $DO_{600}=0,8$ ). L'expression de la protéine d'intérêt a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et les cellules ont ensuite été cultivées pendant 3h à 37°C sous agitation à 200 rpm.

Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 2900 rcf pendant 30 min et le culot a été repris dans 50 mL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole et 1 tablette de Cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete™, EDTA-free (ROCHE #5056489001)). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un microfluidiseur à 25 kPsi puis centrifugées pendant 1h à 30 000 rcf à 4°C. Le surnageant a été incubé avec 3 mL d'agarose NiNTA Superflow (Qiagen référence : 30410) pré-équilibrés avec le tampon A (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole) dans une colonne de gravité. La colonne a été lavée avec 60 mL de tampon A et la protéine a été éluée avec 30 mL de tampon B (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 100 mM imidazole). La fraction éluée a été concentrée jusqu'à 500 µL dans un concentrateur Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 10kDa MWCO (Merck-Millipore référence : UFC901024) et injectée sur colonne d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 increase (Cytiva #28990944) pré-équilibrée dans le tampon C (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 1 mM EDTA) puis éluée avec le tampon C (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 1 mM EDTA). La pureté de l'échantillon a été vérifiée par SDS-PAGE.

## **Expression et purification de pESPRIT(His-PcrV-Avitag)**

Le plasmide pESPRIT contenant le gène codant PcrV (PAO1) avec une étiquette hexahistidine en N-terminal et une étiquette Avitag en C-terminal a été transféré dans la souche d'*E.coli* BL21 DE3 par transformation bactérienne. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une  $DO_{600}=0,8$ .

L'expression de la protéine d'intérêt a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et les cellules ont ensuite été cultivées pendant 3h à 37°C sous agitation à 200 rpm.

Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 2900 rcf pendant 30 min et le culot a été repris dans 50 mL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole et 1 tablette de Cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete™, EDTA-free (ROCHE #5056489001)). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un microfluidiseur à 25 kPsi puis centrifugées pendant 1h à 30 000 rcf à 4°C. Le surnageant a été incubé avec 3 mL d'agarose NiNTA Superflow (Qiagen #30410) pré-équilibrés avec le tampon A (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole) dans une colonne de gravité. La colonne a été lavée avec 60 mL de tampon A et la protéine a été éluée avec 30 mL de tampon B (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 100 mM imidazole). La fraction éluée a été concentrée jusqu'à 500 µL dans un concentrateur Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 10kDa MWCO (Merck-Millipore #UFC901024) et injectée sur une colonne d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 increase (Cytiva #28990944) pré-équilibrée dans le tampon C (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 1 mM EDTA) puis éluée avec le tampon C (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 1 mM EDTA). La pureté de l'échantillon a été confirmée par SDS-PAGE.

### **Expression et purification de pET22b-PscF-His**

Le plasmide pET22b-PscF-His a été transféré dans la souche d'E.Coli BL21 DE3 par transformation bactérienne. Les bactéries ont été cultivées en milieu TB supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une  $DO_{600}=0,8$ . L'expression de la protéine d'intérêt a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et les cellules ont ensuite été cultivées pendant 3h à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 2900 rcf pendant 30 min et le culot a été repris dans 50 mL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole, 2% glycérol et 1 tablette de Cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete™, EDTA-free (ROCHE #5056489001)). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un microfluidiseur à 25 kPsi puis centrifugées pendant 1h à 30 000 rcf à 4°C. Le surnageant a été incubé avec 3 mL de d'agarose NiNTA Superflow (Qiagen #30410) pré-équilibrée avec le tampon A (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole, 2% glycérol) dans une colonne de gravité.

La colonne a été lavée dans 60 mL de tampon A et la protéine a été éluée avec 30 mL de tampon B (50 mM Tris pH 8, 0.2M NaCl, 100 mM imidazole). La pureté de l'échantillon a été confirmée par SDS-PAGE.

### **Expression et purification de pESPRIT(His-PscF-Avitag)**

Le plasmide (pESPRIT) contenant le gène de PscF (PAO1) avec une étiquette hexahistidine en N-terminal et une étiquette Avitag en C-terminal a été transféré dans la souche d'*E.Coli* BL21 DE3 par transformation bactérienne. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une DO600=0,8. L'expression de la protéine d'intérêt a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG et les cellules ont ensuite été cultivées pendant 3h à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 2900 rcf pendant 30 min et le culot a été repris dans 50 mL de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole, 2% glycérol et 1 tablette de Cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete™, EDTA-free (ROCHE #5056489001)). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un microfluidizer à 25 kPsi puis centrifugées pendant 1h à 30 000 rcf à 4°C. Le surnageant a été incubé avec 3 mL de d'agarose NiNTA Superflow (Qiagen #30410) pré-équilibrée avec le tampon A (50 mM Tris pH 8, 0,2M NaCl, 20 mM imidazole, 2% glycérol) dans une colonne de gravité. La colonne a été lavée dans 60 mL de tampon A et la protéine a été éluée avec 30 mL de tampon B (50 mM Tris pH 8, 0.2M NaCl, 100 mM imidazole). La pureté de l'échantillon a été confirmée par SDS-PAGE.

### **Protocole de recherche ABAC-IBS**

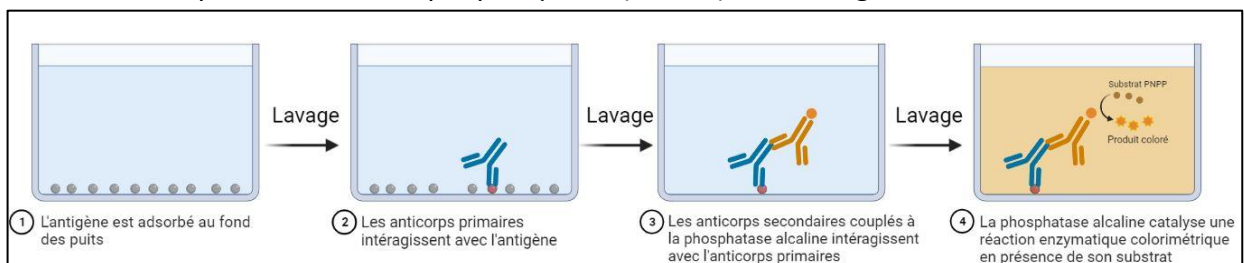
Le protocole ABAC-IBS (NCT04335383) est une étude rétrospective et prospective monocentrique RIPH III (recherche impliquant la personne humaine). Cette étude a été effectuée en collaboration avec les services de virologie, de bactériologie de l'IBP du CHU Grenoble Alpes et le service de pneumologie du CHU Grenoble Alpes.

Lors de la phase rétrospective, les sérums de 34 patients majeurs ayant un diagnostic positif de mucoviscidose et une sérologie positive à *P.aeruginosa* ont été criblés sur la base

de l'interaction avec PcrV et PscF recombinants ainsi que sur leur fonction d'inhibition du SSTIII. Les critères d'inclusion de la phase prospective regroupent des patients majeurs de plus de 32kg, sélectionnés lors de la phase prospective de l'étude ayant un suivi programmé au CHUGA avec prélèvement sanguin sanitaire et consentant à l'inclusion dans l'étude par leur non-opposition. Un prélèvement sanguin unique de 1 mL/kg (avec une limite de 50 mL) a été effectué au décours du soin dans des tubes de prélèvement EDTA.

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

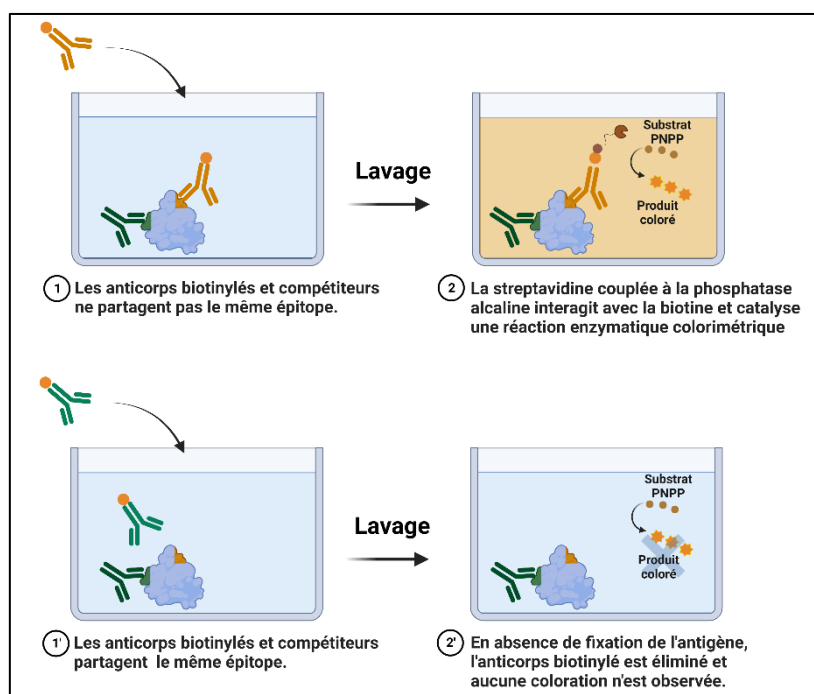
Les protéines à tester concentrées à 5 µg/mL ont été adsorbées par incubation à 4°C pendant une nuit dans les puits de microplaques 96 puits (Thermo Scientific™) à raison de 50µl par puits. Les plaques ont été lavées 3 fois avec un tampon de lavage (PBS 1X, Tween 20 0,05% pH 7.2) puis incubées avec une solution de blocage (PBS 1X pH 7.2, BSA 3%) pendant 1h à température ambiante. Après élimination du tampon de blocage, les sérums de patients atteints de mucoviscidose dilués dans du PBS 1X pH7,2 BSA 1% (50 µL/puits) ont été mis en contact avec les protéines pendant 1h à température ambiante. Les plaques ont été lavées 3 fois avec le tampon de lavage et les complexes protéines-anticorps ont été incubés avec la solution d'anticorps secondaires (PBS 1X, BSA 1%, anti-humain Fcγ conjugué à la phosphatase alcaline produit dans la chèvre 1 :5000) (Jackson Immuno référence : 109 056 098) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages, 50 µL de PNPP (Interchim référence : UP 664791) ont été ajoutés dans chacun des puits et les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée par un lecteur de plaque Spark® (TECAN) à une longueur d'onde de 405 nm.



**Figure 13 : Représentation schématique de la technique Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA).** Les antigènes sont adsorbés au fond des puits d'une plaque 96 puits pendant une nuit à 4°C (1). Les anticorps primaires à tester sont incubés avec les antigènes (2). Un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline spécifique de l'anticorps primaire est ensuite incubé avec le complexe antigène-anticorps primaire (3). L'ajout du substrat PNPP de la phosphatase alcaline produit une réaction enzymatique qui révèle la présence de l'anticorps primaire (4). Un lavage des plaques est effectué entre chaque étape. Créé avec BioRender.com

## ELISA de compétition contre His-PcrV

La solution de protéine His-PcrV concentrée à 5 µg/mL a été déposée (50µl) dans les puits de microplates 96 puits (Thermo Scientific™). Les protéines ont été adsorbées par incubation à 4°C pendant la nuit. Les plaques ont été lavées 3 fois avec un tampon de lavage (PBS 1X pH7.2, Tween 20 0,05%) puis incubées avec une solution de blocage (PBS 1X pH 7.2, BSA 3%) pendant 1h à température ambiante. Après élimination du tampon de blocage, les anticorps biotinylés dilués à l'EC70 dans du PBS 1X pH7,2 BSA 1% (50 µL/puits) ont été mis en contact avec les protéines pendant 30 min à température ambiante. Les anticorps compétiteurs dilués en cascade dans du PBS 1X pH7,2 BSA 1% ont ensuite été incubés avec le complexe anticorps-PcrV pendant 30 min à température ambiante. Les plaques ont été lavées 3 fois et incubées avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (ROCHE référence : 11089161001) pendant 30 min à température ambiante. Après 3 lavages, 50 µL de PNPP (Interchim #UP664791) ont été ajoutés dans chacun des puits et les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée par un lecteur de plaque Spark® (TECAN) à une longueur d'onde de 405 nm.

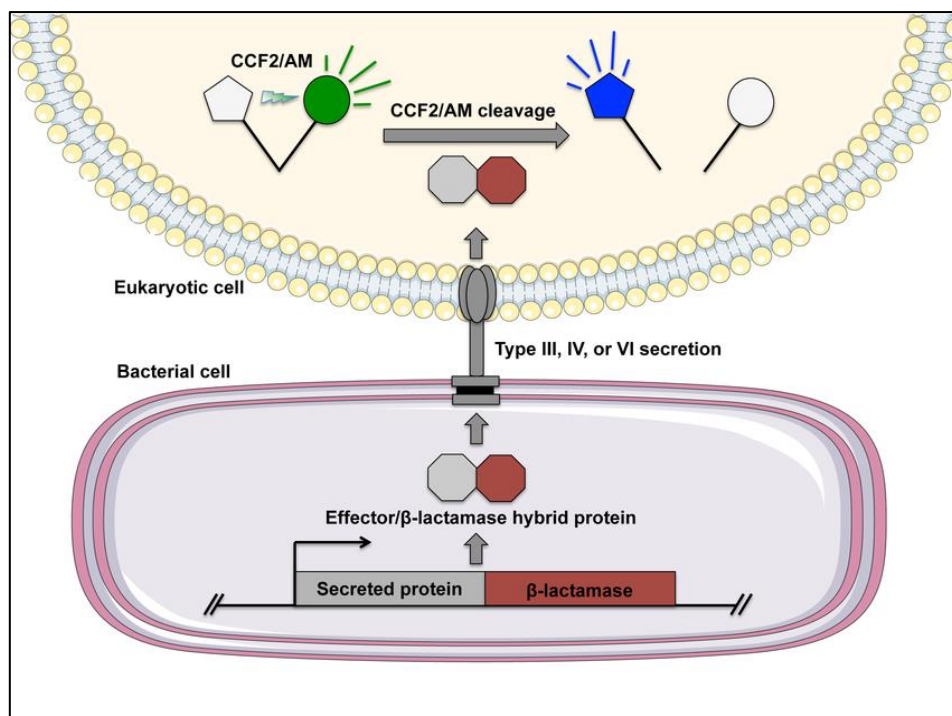


**Figure 14 : Représentation schématique de la technique d'ELISA de compétition.** Les antigènes sont co-incubés avec un anticorps compétiteur et un anticorps biotinylé. Après une étape de lavage, la streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline est ajoutée et la présence de l'anticorps biotinylé est révélée par ajout de PNPP. Dans le cas où les anticorps ne partagent pas le même épitope, l'anticorps biotinylé est présent et la réaction enzymatique peut se produire. Dans le cas d'une compétition entre les deux anticorps pour l'interaction avec un même épitope de l'antigène, l'anticorps biotinylé est éliminé et la réaction enzymatique ne peut pas se produire. Créé avec BioRender.com

**Test d'infection des A549 avec la souche CHAdeltaExoSattB : exoS-bla en présence de sérums humains de patients atteints de mucoviscidose et de solution d'IgG purifiées à partir de ces sérums.**

Ce test fonctionnel développé dans l'équipe PBRC d'Ina Atrée de l'IBS de Grenoble permet de mesurer l'injection d'un effecteur du SSTIII, la toxine ExoS dans un modèle cellulaire. Pour cela, des cellules A549 ont été infectées par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla déléetée du gène codant pour la toxine ExoS et compléetée par un gène codant pour ExoS fusionné à la  $\beta$ -lactamase. L'ajout de CCF2-AM, un substrat fluorescent clivable par la  $\beta$ -lactamase permet de mesurer l'injection de la toxine ExoS dans les cellules A549. En effet, en cas d'absence d'infection, le CCF2 diffuse dans les cellules et émet une fluorescence verte par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

En cas d'injection de la protéine de fusion ExoS-bla, le clivage du CCF2 rompt le FRET et il est possible d'observer un décalage de fluorescence du vert vers le bleu (Figure 15).



**Figure 15 : Représentation schématique de l'infection de CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla sur une cellule eucaryote. L'injection d'un effecteur fusionné à la  $\beta$ -lactamase induit le clivage du CCF2-AM induisant la rupture du FRET et un décalage de fluorescence. PECHOUS et al 2015**

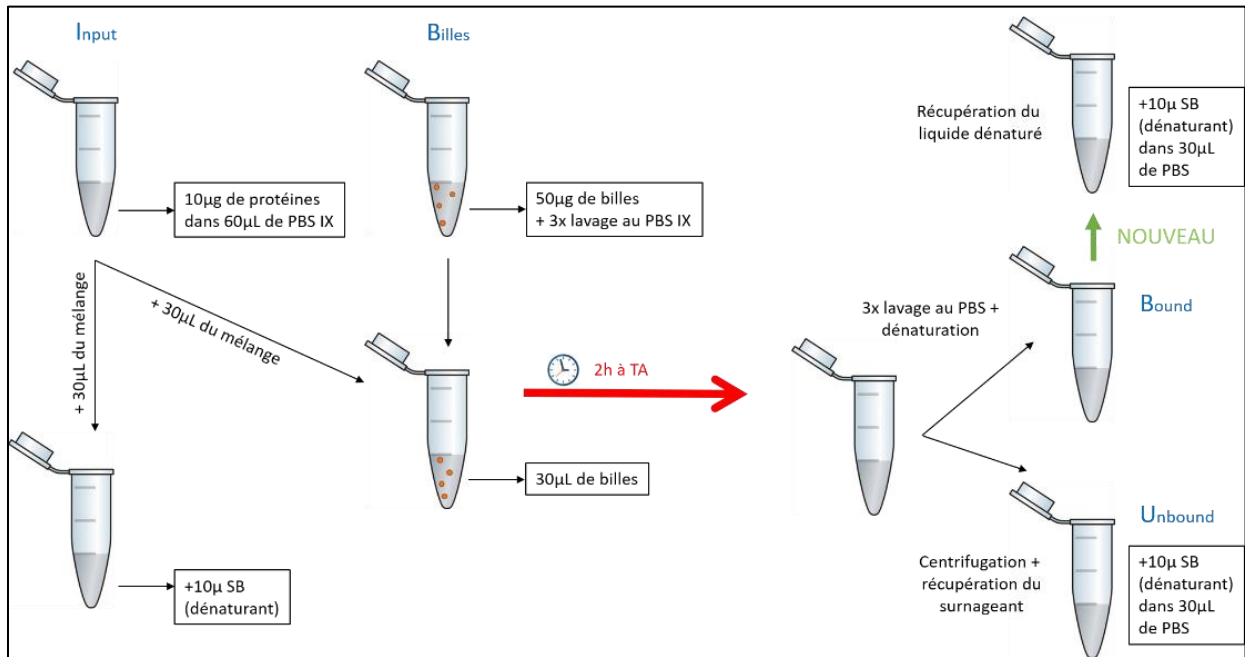
Les cellules A549 (cellules épithéliales pulmonaires adénocarcinomiques) ont étéensemencées dans une plaque 96 puits (20 000 cellules/puits) en présence de DMEM + 5% SVF. Parallèlement, 4 mL de LB ont étéensemencés avec la souche CHAdeltaExoSattB::exoS-bla et incubés pendant la nuit à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries ont été diluées afin d'obtenir un MOI (multiplicity of infection) de 5, soit 5 fois plus de bactérie que de cellules dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 5% SVF (sérum de veau Fœtal), puis incubées avec les cellules A549 en présence d'une dilution en cascade des sérums ou des solutions d'IgG testées pendant 3h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le contenu des puits a été éliminé et incubé en présence de CCF2-AM (Thermofischer scientifique #K1096) pendant 2h à température ambiante. La lecture de la fluorescence bleue (Ex :405 nm ; Em :460 nm) et verte (Ex : 405 nm Em: 538) a été effectuée à l'aide d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent FL pendant l'incubation (Thermo scientifique #5210450).

### **Biotinylation de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag**

Les protéines His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag ont été biotinylées à l'aide du kit Bulk-BirA (Adivity référence : NC 92 04 985) en suivant les instructions du fabricant. BirA est une biotine ligase catalysant la conjugaison d'une biotine sur la lysine de l'Avitag (GLNDIFEAQKIEWHE) (FAIRHEAD et al, 2015). Brièvement, 70,8 pmoles de la biotine ligase BirA ont été incubés avec 50 nmoles de protéine dans un tampon contenant 50 mM Bicine pH 8,3 ; 10 mM ATP ; 10 mM Mg<sup>2+</sup> acétate ; 50 µM d-biotine, pendant 2h à température ambiante. La D-biotine libre et l'enzyme BirA ont été éliminées par purification de His-PscF-Avitag par chromatographie d'affinité au Nickel comme détaillé précédemment. L'efficacité de biotinylation a été mesurée par incubation de 10 µg de protéines biotinylées avec 30 µL d'agarose conjugué à la Neutravidin™ (Thermo Scientific référence : 29200) pendant 2h à



température ambiante (Figure 16). L'agarose a été séparé du surnageant et les deux fractions ont été dénaturées dans du tampon de charge de protéine (10% SDS, 500mM DTT, 50% glycérol, 250mM Tris-HCL and 0.5% bromophénol blue dye, pH6.8) par chauffage à 98°C pendant 5 min. Le surnageant (Bound) a ensuite été récupéré et comparé avec le surnageant (Unbound) par SDS-PAGE gradient (4-20%).



**Figure 16 : Représentation schématique de la vérification de la présence de biotine sur les protéines porteuses d'Avitag.** À la suite de la biotinylation, les protéines porteuses d'Avitag ont été mises en contact avec de l'agarose conjugué à la Neutravidine. Après 2h d'incubation à température ambiante, les fractions liées à la résine et les fractions non liées ont été séparées par centrifugation. Ces deux fractions ont été comparées par SDS-PAGE.

### Déplétion des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag des solutions d'IgG totales des donneurs

Les protéines His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag ont été fixées de façon covalente sur des billes magnétiques MyOne activées au tosyle (Invitrogen référence : 655.01) pré-équilibrées dans le tampon d'adsorption (0,1M Na Borate pH 9,5, 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) par incubation à 37°C pendant 24h. Le surnageant a été éliminé et les billes ont été incubées par le tampon de blocage (PBS 1X pH 7.2, 0,5% BSA, 0,05% Tween 20) pendant 24h à 37°C.

Après lavage avec le tampon de lavage (PBS 1X pH 7.2, 0,1% BSA, 0,05% Tween20), les sérums ou les solutions d'IgG à dépletter ont été incubés 30 min à température ambiante. Après incubation, le surnageant (fraction déplétée) a été récupéré et les anticorps fixés sur les billes magnétiques ont été élués par une solution de glycine pH 2.5. Les éluats ont immédiatement été neutralisés par ajout d'une solution de Tris pH 9 puis lavés avec du tampon de lavage. Afin d'assurer une déplétion complète, trois cycles de déplétion ont été effectués successivement.

### **Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à partir du sang total**

Le sang total de patients atteints de mucoviscidose a été récolté dans des tubes anticoagulant EDTA par les cliniciens en charge des prélèvements selon le protocole ABAC-IBS soit 1mL/kg avec une limite à 50 mL par patient. L'ensemble des prélèvements de chaque patient a été séparé en fraction de 25 mL et lentement ajouté à 7 mL de milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio scientific #MSMSL01-01). Les cellules mononuclées du sang périphérique ont ensuite été séparées des autres fractions par centrifugation sur gradient de densité à 1100 rcf pendant 30 min. La fraction contenant les PBMC a été recueillie et lavée avec 50 mL de PBS 1X. Après centrifugation à 350 rcf pendant 5 min, le surnageant a été éliminé et le culot repris dans un tampon de lyse des hématies (Eurobio scientific #CMSLYS00-07) suivi d'une incubation de 5 min à température ambiante. Après un second lavage par 50 mL de PBS 1X, les cellules ont été centrifugées 5 min à 350 rcf et le culot a été repris dans 800 µL de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio #CVFSVF00 01), enfin les cellules ont été dénombrées dans une cellule de Kova (référence : SY5020). Les cellules ont été diluées à 10 millions/mL dans une solution de congélation (90% SVF, 10% DMSO) puis congelées dans l'azote liquide.

## **Isolement d'anticorps monoclonaux à partir de cellules mononuclées du sang périphérique**

### **1.1 Tri direct de lymphocytes B mémoire exprimant à leur surface des anticorps spécifiques des PcrV et PscF recombinants**

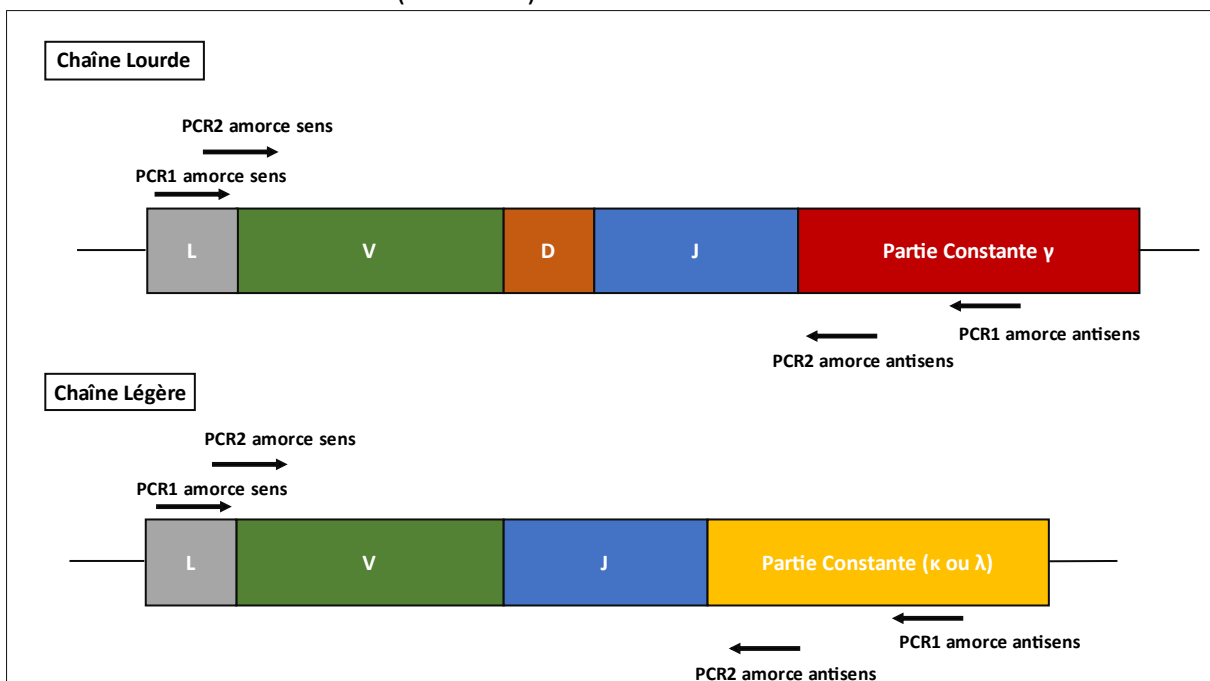
Les anticorps Miltenyi REA suivants ont été utilisés pour marquer les cellules mononuclées du sang périphérique (PMBC) avant le tri par cytométrie en flux : anti-CD3 (#130-114-519), anti-CD19 (#130-113-649), anti-CD20 (#130-113-649), anti-CD27 (#130 - 108 – 336), anti-IgM (#130-113-476), anti-IgD (#130-110-643) et anti-IgA (#130-113-476). Un marquage live/dead Thermofisher a également été utilisé (#L34957). L'antigène His-PcrV-Avitag a été marqué avec de la streptavidine conjuguée au fluorochrome BUV 737 (#AB\_2869560 BD Biosciences) et de la streptavidine conjuguée au fluorochrome FITC (#405201 Biolegend). L'antigène His-PscF-Avitag a été marqué avec de la streptavidine conjuguée au fluorochrome BUV 496 (#AB\_2869599 BD Biosciences) et au fluorochrome BV-605 (#405229 Biolegend). Chaque antigène a été indépendamment incubé avec de la streptavidine pendant 30 min à 4°C à l'obscurité. Les PBCMS ont ensuite été incubées avec les anticorps de marquage, le marquage Live/Dead et les complexes antigènes : streptavidine pendant 30 min à 4°C à l'obscurité avant une étape de lavage. Les cellules ont été incubées avec des anticorps marqués pendant 30 min avant une étape de lavage. Les cellules ont ensuite été passées à travers Tamis cellulaire Falcon® (Corning #352235) afin de dissocier d'éventuels amas cellulaires.

Les complexes de lymphocytes B mémoire et d'antigènes spécifiques ont été triés dans les plaques à 96 puits préparées (Biorad #HSP9641), en utilisant un FACSAria Fusion (BD Biosciences) avec le logiciel Diva (version 9.0).

## 1.2 Amplification des gènes d'immunoglobulines à partir de l'ARNm de cellule unique.

L'ARN messager (ARNm) obtenu par lyse de cellules uniques a été rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR en utilisant la transcriptase inverse SuperScript™ IV (Thermo Fischer Scientific référence : 18090010).

Les gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes et légères (Kappa ou Lambda) de chaque immunoglobuline ont été amplifiés par PCR imbriquée en utilisant la polymérase Hotstart Taq (Qiagen #203445) (Figure 17). Un mélange d'amorces sens et antisens, différents entre les 2 étapes de PCR imbriquées, respectivement spécifiques des différentes familles des segments V et J des régions variables d'immunoglobulines ont été utilisés. La liste des amorces est disponible dans les annexes 4 et 5. L'efficacité d'amplification a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 96 puits (ThermoFisher #G720802). Après séquençage et détermination des familles des parties variables via la base de données IMGT (<https://www.imgt.org/>), les gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères ont été amplifiés par PCR en utilisant la Phusion™ polymérase (Fisher Scientific #F532S). Des amorces sens et antisens spécifiques des régions V et J des familles ainsi identifiées ont été utilisées (Annexe 6).



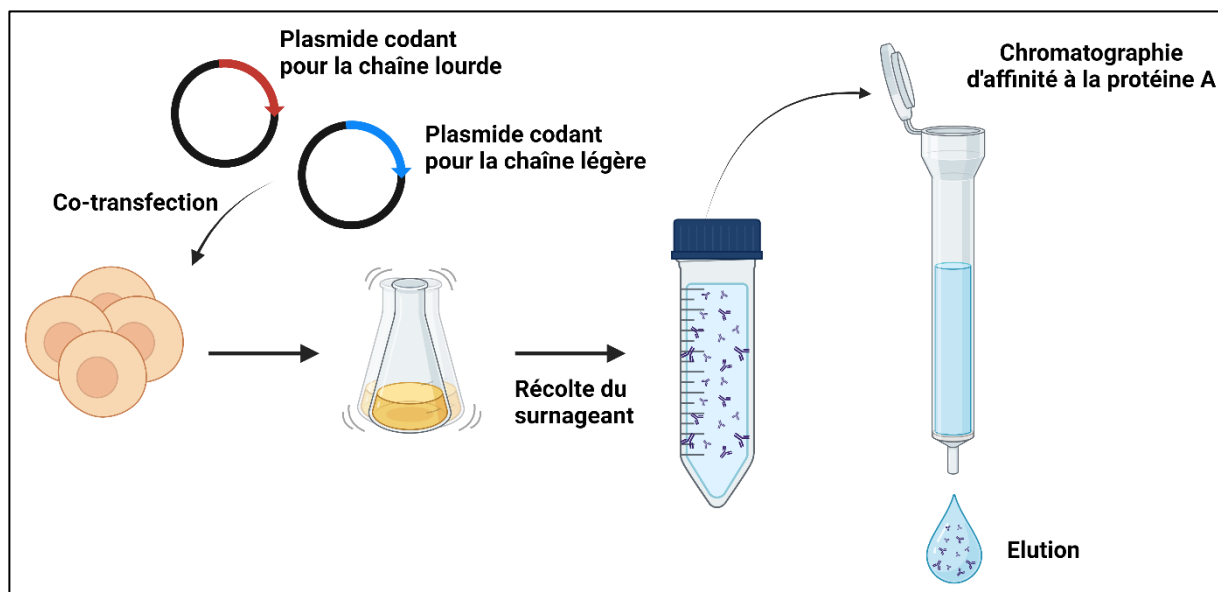
**Figure 17 : Représentation schématique de l'étape de PCR imbriquée.** La première PCR (PCR1) est effectuée avec des amorces sens spécifiques de la région Leader et des amorces antisens spécifiques de la partie constante. La seconde PCR (PCR2) est effectuée avec des amorces sens chevauchant la région Leader et la région V et des amorces antisens spécifiques d'une région plus en aval de la partie constante. L : Leader ; V : Variable segment ; D : Diversity segment ; J : Joining segment.

### 1.3 Clonage et production d'anticorps monoclonaux

Les inserts correspondant aux parties variables des chaînes lourdes ont été clonés entre les sites XhoI et NheI du vecteur Hc préalablement linéarisé, par recombinaison à l'aide du kit InFusion (Takara Bio #638952) en suivant les recommandations du fabricant. En suivant la même méthode, les inserts des parties variables des chaînes légères  $\kappa$  ont été clonés entre les sites BsiWI et AgeI du vecteur Kc et les inserts correspondant aux gènes de parties variables des chaînes  $\lambda$  ont été clonés entre les sites XhoI et AgeI du vecteur Lc. Les produits de clonages ont été transférés dans des cellules compétentes *E.coli* Stellar™ (TAKARA BIO #636766) par transformation bactérienne. Après purification de l'ADN plasmidique par le Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen #27106), la présence de l'insert a été vérifiée par séquençage.

Les anticorps monoclonaux ont été produits par transfection de cellules HEK293F avec le couple chaîne lourde et légère appropriée (ratio 1 :1) en utilisant la 293 Fectin (Fisher Scientific #12347500) (Figure 18). Les cellules ont été incubées 96h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> en agitation (100rpm). Le surnageant a été récolté et incubé avec la résine Protein A Sepharose® Fast Flow (Sigma #ge17-1279-03).

Après une étape de lavage au PBS, les anticorps monoclonaux ont été élués avec 0,1M de glycine pH 2,5 et l'éluat a immédiatement été neutralisé par 1M Tris pH 9. Le tampon des solutions a été échangé contre du PBS 1X et concentré dans des Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 50 kDa MWCO (Millipore #UFC905024).



**Figure 18** : Représentation schématique du protocole de production d'anticorps monoclonaux. Les plasmides contenant les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères sont co-transfectés dans des cellules HEK 293F. Les cellules sont incubées 48-96h à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Le surnageant de culture est ensuite récolté et mis en contact avec de la résine sépharose conjugué à la protéine A. Les anticorps sont élués à pH acide et la solution est neutralisée à pH neutre. Créé avec BioRender.com.

## Mutagenèse de chaînes lourdes de l'anticorps monoclonal S4P5B3Hc

Afin de produire une chaîne lourde dépourvue des régions CH2 et CH3 pour une production ultérieure de fragment Fab, un codon stop a été inséré entre les domaines CH2 et CH3 de la chaîne lourde par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange (Agilent #200523). Le plasmide parental codant pour la séquence S4P5B3Hc a été amplifié par PCR avec la PFU ADN polymérase fournie dans le kit QuickChange (amorces en Annexe 1). Les plasmides parentaux ont été digérés par l'enzyme de restriction DpnI également fournie dans le kit et le produit d'amplification a été inséré dans *E.coli* XL10 Gold par transformation.

Après extraction des plasmides par QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen #27106), la présence de la mutation a été vérifiée par séquençage (Eurofins genomics).

## **Production et purification du fragment Fab S4P5B3Fab**

Le protocole de production du fragment Fab est identique à celui de la production d'anticorps monoclonaux détaillés précédemment à la seule différence d'un ratio chaînes lourde : légère égal à 3 : 1 a été utilisé. Les fragments Fab ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne HiTrap LambdaFabSelect (Cytiva #1754821). Les fragments Fab ont été élués et préparés de la même façon que les anticorps monoclonaux.

## **Mesure d'affinité des anticorps monoclonaux par Bio Layer Interferometry (BLI)**

Les expériences BLI ont été réalisées sur un OctetRED96e de Sartorius/FortéBio (ancien Pall/FortéBio) et ont été enregistrées avec le logiciel du fabricant (Data Acquisition v11.1). Tous les échantillons de protéines ont été dilués dans 0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl à pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline, PBS) complété avec 0,02 % de Tween-20 (tampon d'analyse, PBS-T). Une solution de glycine 10 mM pH 2,0 a été utilisée comme tampon de régénération. Des biocapteurs commerciaux SA ou SAX (streptavidine) (Pall/FortéBio) ont été utilisés pour immobiliser la protéine PcrV biotinylée. Les analyses cinétiques ont été effectuées dans 0,2 mL d'échantillons ou de tampon par puits dans des plaques noires de 96 puits (Nunc F96 MicroWell, Thermo Fisher Scientific) à 25°C sous agitation à 1000 tr/min. Les biocapteurs ont été pré-humidifiés dans 0,2 mL de PBS-T pendant 10 min, suivi d'un équilibrage dans le tampon d'analyse pendant 120 s. Des échantillons de ligand PcrV ont été appliqués à une concentration de 2,5 µg/mL en plongeant des biocapteurs pendant 10 min et chargés jusqu'à atteindre un décalage de spectre entre 1,2 et 2 nm, suivi d'une étape d'équilibrage supplémentaire de 120 s dans un tampon d'analyse et de cycles de régénération pendant 30 s. Pour l'association, tous les échantillons d'analytes ont été dilués dans un tampon d'analyse à des concentrations comprises entre 3,12 et 200 nM pour les anticorps/IgG complets ou entre 50 et 3200 nM pour le fragment Fab. Les phases d'association ont été surveillées pendant le trempage des biocapteurs fonctionnalisés dans des solutions d'analyte pendant 5 min après l'enregistrement d'une ligne de base pendant 2 min, et les phases de dissociation ont été surveillées dans un tampon d'analyse pendant 20 min.

Pour évaluer et surveiller la liaison non spécifique des analytes, des mesures ont été effectuées avec des biocapteurs traités avec les mêmes protocoles, mais en remplaçant les solutions de ligand par un tampon d'analyse. Toutes les mesures ont été effectuées en duplicat en utilisant le même lot d'échantillons. Les données cinétiques ont été traitées avec le logiciel du fabricant (Data analysis HT v11.1). Les signaux des échantillons à concentration nulle ont été soustraits des signaux obtenus pour chaque biocapteur fonctionnalisé et chaque concentration d'analytes. Les signaux cinétiques spécifiques résultants ont ensuite été ajustés à l'aide d'une méthode d'ajustement global et d'un modèle d'analyte bivalent 1 :2 pour les anticorps/IgG complets et d'un modèle de Langmuir 1 : 1 pour Fab. Les valeurs des paramètres cinétiques rapportées ont été obtenues en faisant la moyenne des valeurs obtenues avec des dosages dupliqués et les erreurs rapportées comme écart-type.

### **Préparation et criblage de conditions de cristallisation du complexe S4P5B3Fab-HisPcrV**

Les protéines ont été purifiées indépendamment selon les protocoles déjà décrits. Les protéines His-PcrV et S4P5B3Fab ont été co-incubées pendant 1h à température ambiante selon un ratio molaire His-PcrV : S4P5B3Fab de 1 : 2. Les complexes ont été séparés des protéines libres par chromatographie d'exclusion de taille dans du PBS 1X pH 7,4. L'homogénéité et la pureté des complexes ont été vérifiées par SDS-PAGE gradient (4-20%). Les échantillons correspondant à des complexes 1 :1 ont été envoyés à la plateforme HTX de l'ISBG pour un criblage de conditions de cristallisation.



# Résultats

## Production et purification des antigènes recombinants

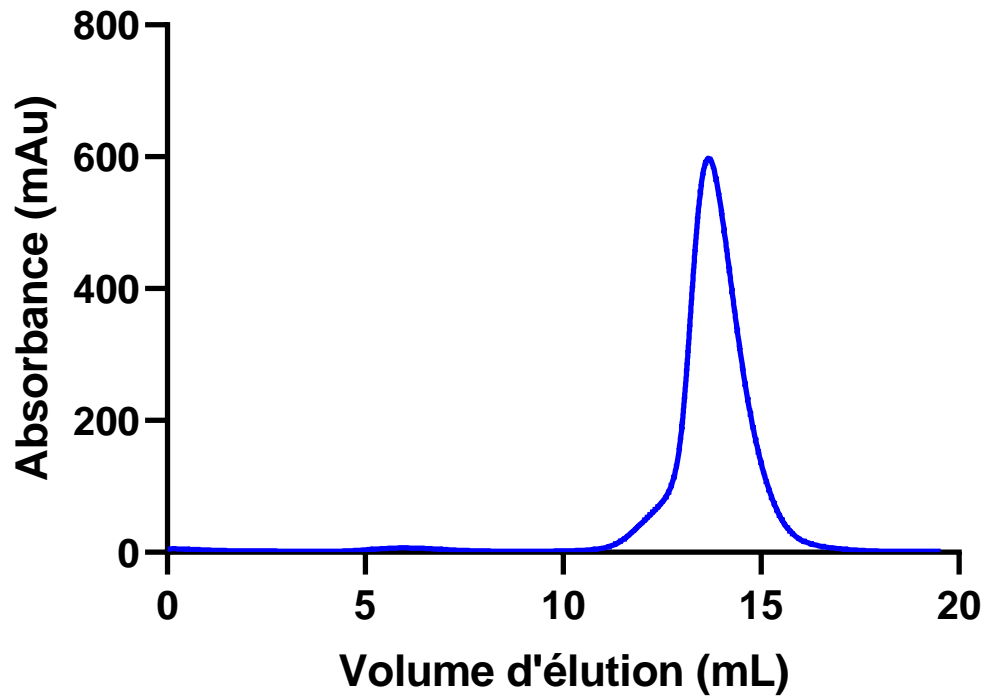
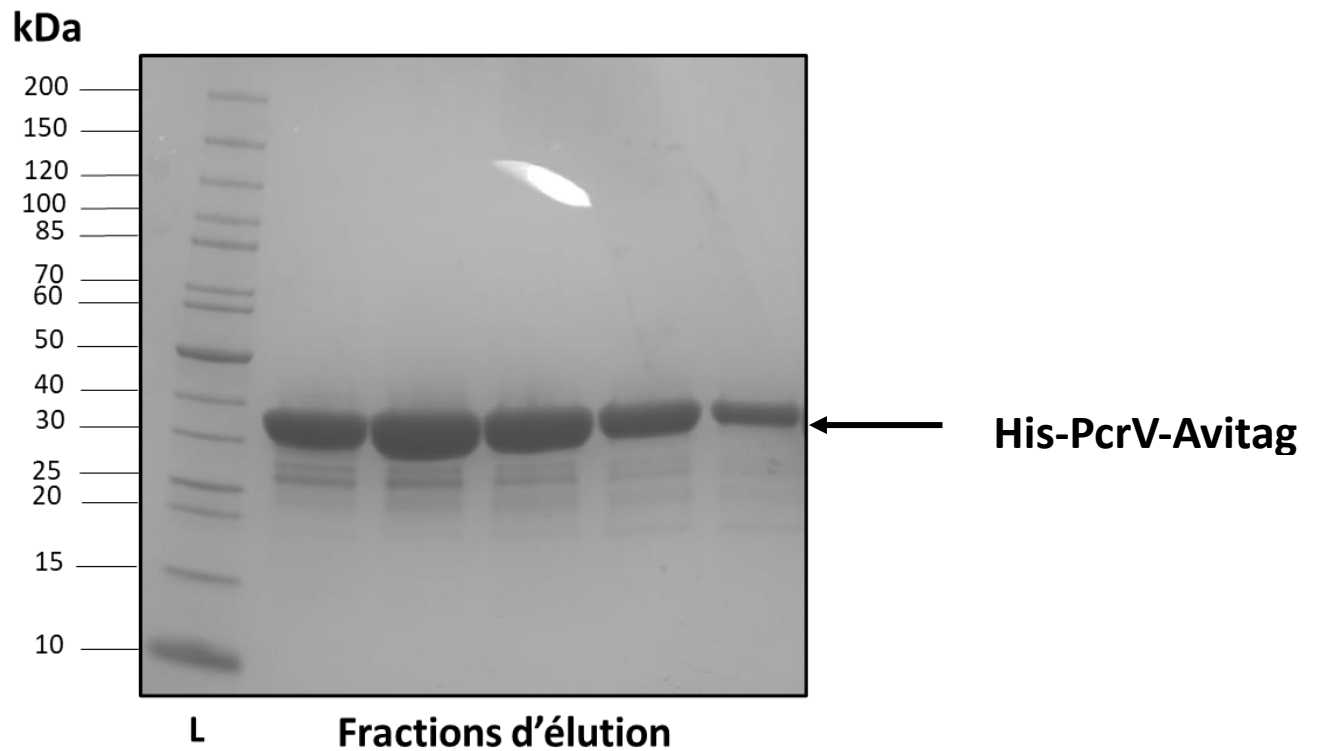
Afin de servir d'appât protéique pour le criblage des sérums en ELISA et le tri de lymphocytes B mémoire spécifiques de l'antigène, les protéines recombinantes ont été produites avec une étiquette hexahistidine en amino-terminal ainsi qu'une étiquette Avitag™ en carboxyterminal (GLNDIFEAQKIEWHE). L'étiquette Avitag™, un peptide accepteur de biotine (BAP), permet la biotinylation de la protéine par la biotine ligase BirA (FAIRHEAD et HOWARTH, 2015). La biotinylation des protéines permet le marquage de celles-ci avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome et sera ultérieurement nécessaire pour l'étape de tri cellulaire.

### 1.1 Purification de His-PcrV-Avitag

La protéine recombinante His-PcrV-Avitag a été successivement purifiée par chromatographie d'affinité au nickel via son étiquette hexa-histidine puis par chromatographie d'exclusion de taille (CET). L'élution de CET de His-PcrV présente un pic unique bien que légèrement asymétrique ce qui indique que l'échantillon est homogène (Figure 19A). La séparation des fractions correspondant au pic d'élution (B8 à C4) par SDS-PAGE (4-20%) montre la présence de bandes à 35 kDa correspondant à His-PcrV-Avitag (Figure 19B). On observe néanmoins des bandes multiples entre 20 et 30 kDa qui pourraient correspondre à une dégradation de la protéine ou à des contaminants. La protéine d'intérêt étant majoritaire, la présence de ces bandes n'a pas été jugée problématique pour une utilisation ultérieure de la protéine. La présence de l'Avitag à l'extrémité carboxy-terminale permet la conjugaison d'une biotine avec la protéine nécessaire à son utilisation ultérieure lors de l'étape de tri cellulaire.

**A**

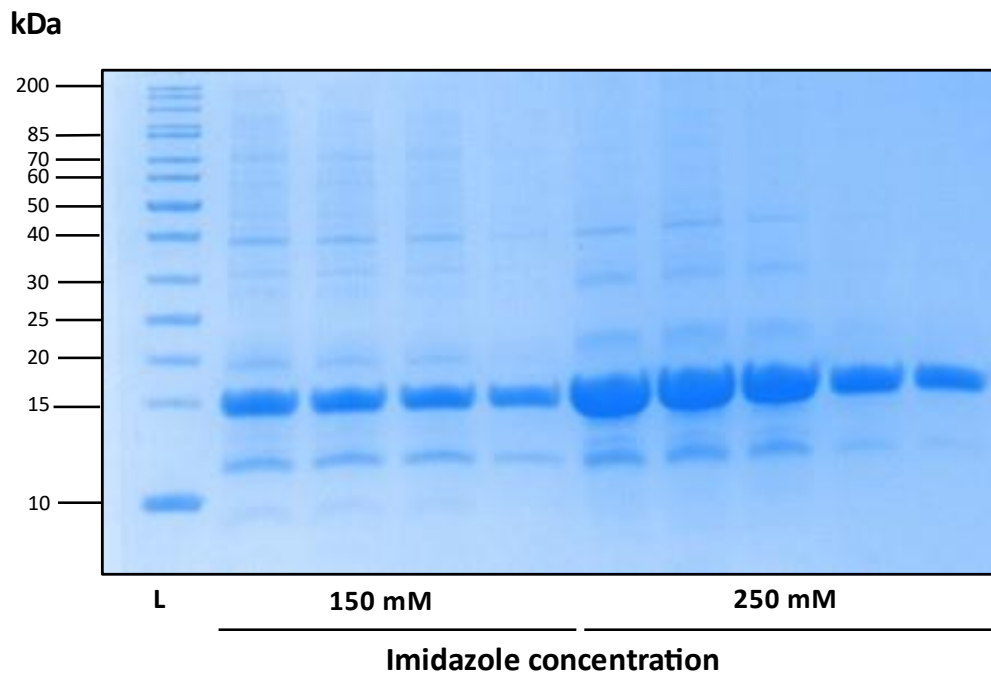
### Profil d'élution His-PcrV-Avitag

**B**

**Figure 19 : Purification de His-PcrV-Avitag.** **A** Profil d'élution de His-PcrV-Avitag par chromatographie d'exclusion de taille. **B** Séparation des fractions d'élution de chromatographie d'exclusion de taille de His-PcrV-Avitag par SDS-PAGE (4-20%). L : Ladder-marqueur de poids moléculaire

## 1.2 Purification de His-PscF-Avitag

La protéine recombinante His-PscF a été purifiée par deux chromatographies d'affinité au nickel successives, la nature fibrillaire de la protéine rendant délicat l'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille. La pureté de la protéine vérifiée sur SDS-PAGE (4-20%) a été jugée suffisante pour son utilisation en ELISA, la bande présente à 15 kDa correspondant à His-PscF-Avitag est, en effet, largement majoritaire en comparaison avec les contaminants (Figure 20). Une concentration de 150 et 250 mM d'imidazole a été nécessaire afin d'éluer la protéine. L'homogénéité de la protéine n'a pas pu être vérifiée en l'absence de CET.



**Figure 20 : Purification de His-PscF-Avitag.** Séparation des fractions d'élution de chromatographie d'affinité au nickel de His-PscF-Avitag. L : Ladder – marqueur de poids moléculaire

## Constitution de la cohorte de patients

Un criblage préliminaire à la constitution d'une cohorte a été effectué sur sérums anonymes du laboratoire de microbiologie du CHUGA (dits « fonds de tube ») de patients atteints d'infections aiguës à *P.aeruginosa*. Douze sérums ont été testés en ELISA contre PcrV et PscF. Aucun des sérums n'a montré de titres d'IgG significatifs contre ces deux antigènes (données non montrées). Une possible raison à ces faibles titres peut résider dans le fait que tous les patients avaient reçu un traitement antibiotique rapide et agressif ayant pu limiter la réplication bactérienne et par conséquent la mise en place d'une immunité humorale contre les cibles d'intérêt.

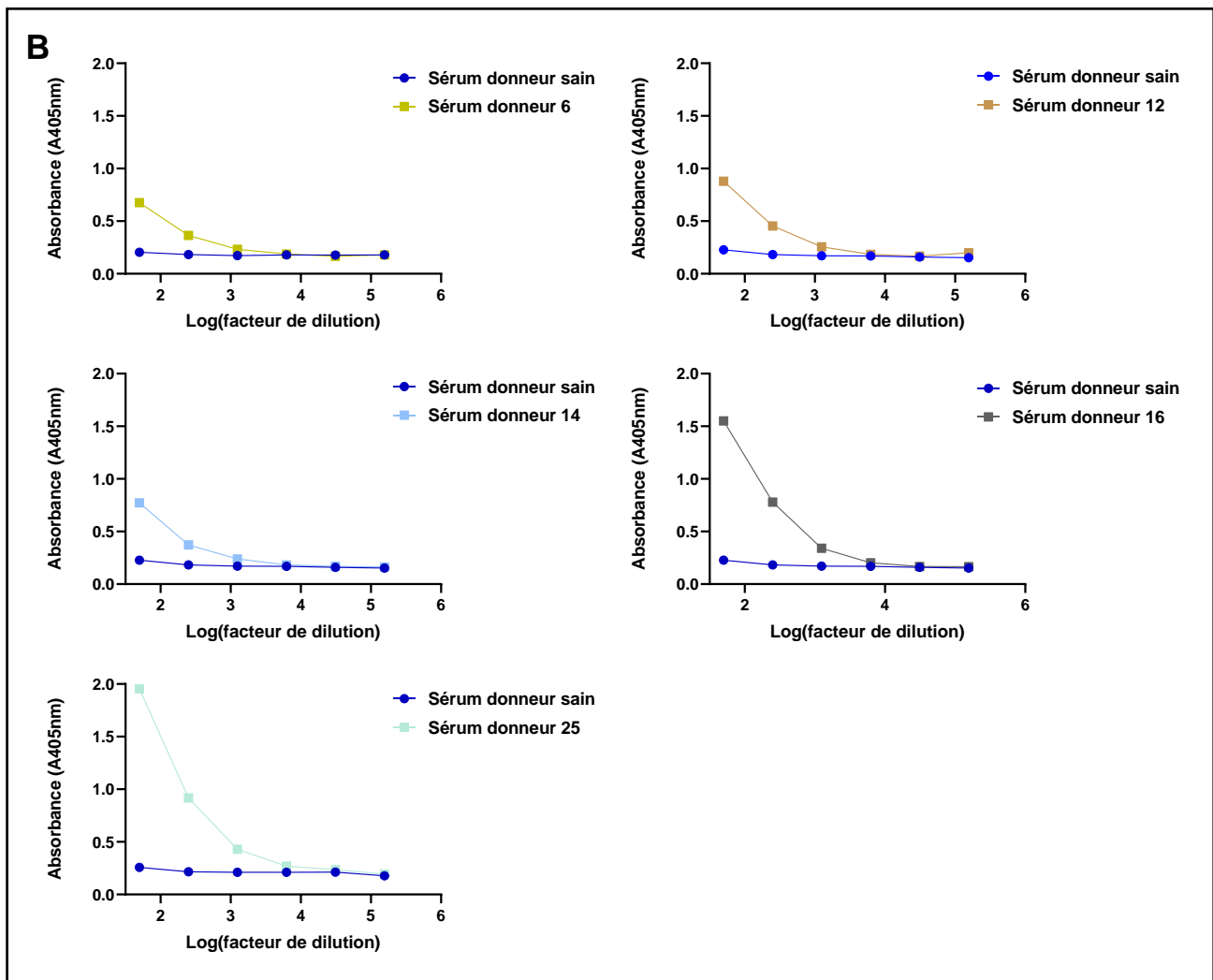
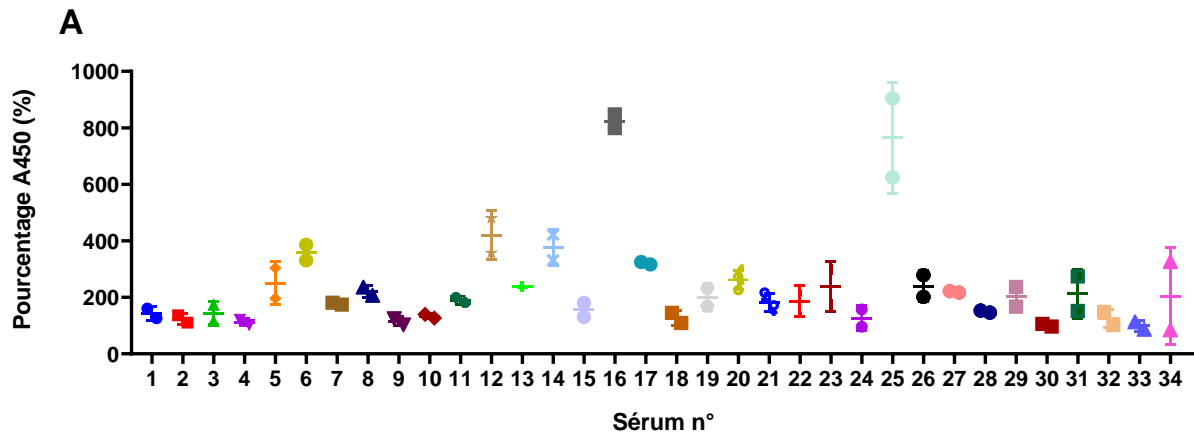
Nous avons donc ensuite porté notre choix sur des patients atteints de mucoviscidose. Ces patients étant atteints d'infections chroniques à *P.aeruginosa*, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait exister chez eux une réponse humorale robuste et mature contre *P.aeruginosa* et plus particulièrement nos cibles d'intérêts. Au total, 34 sérums de patients ayant donné leur consentement éclairé (voir Matériel et Méthodes pour la méthodologie concernant la constitution de la cohorte) et ayant un diagnostic positif de mucoviscidose ainsi qu'une sérologie positive à *P.aeruginosa* ont été collectés dans la sérothèque du service de virologie de l'IBP du CHU de Grenoble.

### 1.3 Criblage des sérums par ELISA

Afin de déterminer le titre en anticorps dirigés contre PcrV et PscF dans le sérum des patients de la cohorte, un criblage par ELISA a été réalisé. Les valeurs d'absorbance maximale observée en ELISA direct contre PscF et PcrV ont été comparées (Figure 21A et 22A). Pour pouvoir comparer ces données provenant de plaques 96 puits différentes, les valeurs d'absorbance maximale (correspondant à un facteur de dilution de 50) de chaque sérum ont été normalisées en fonction d'un contrôle négatif (sérum d'un donneur ayant une sérologie négative à *P.aeruginosa*) présent sur la plaque correspondante.

Les taux d'anticorps observés étant relativement bas pour la majorité des donneurs, le profil des courbes d'absorbance n'a pas permis, dans l'ensemble, le calcul d'une ED50 (Effective Dilution 50), qui correspond au facteur de dilution correspondant à la moitié de

l'absorbance maximale observée. Nous avons donc sélectionné les sérums avec les titres les plus élevés pour lesquelles une différence d'absorbance avec le témoin négatif était encore observée au facteur de dilution de 250.

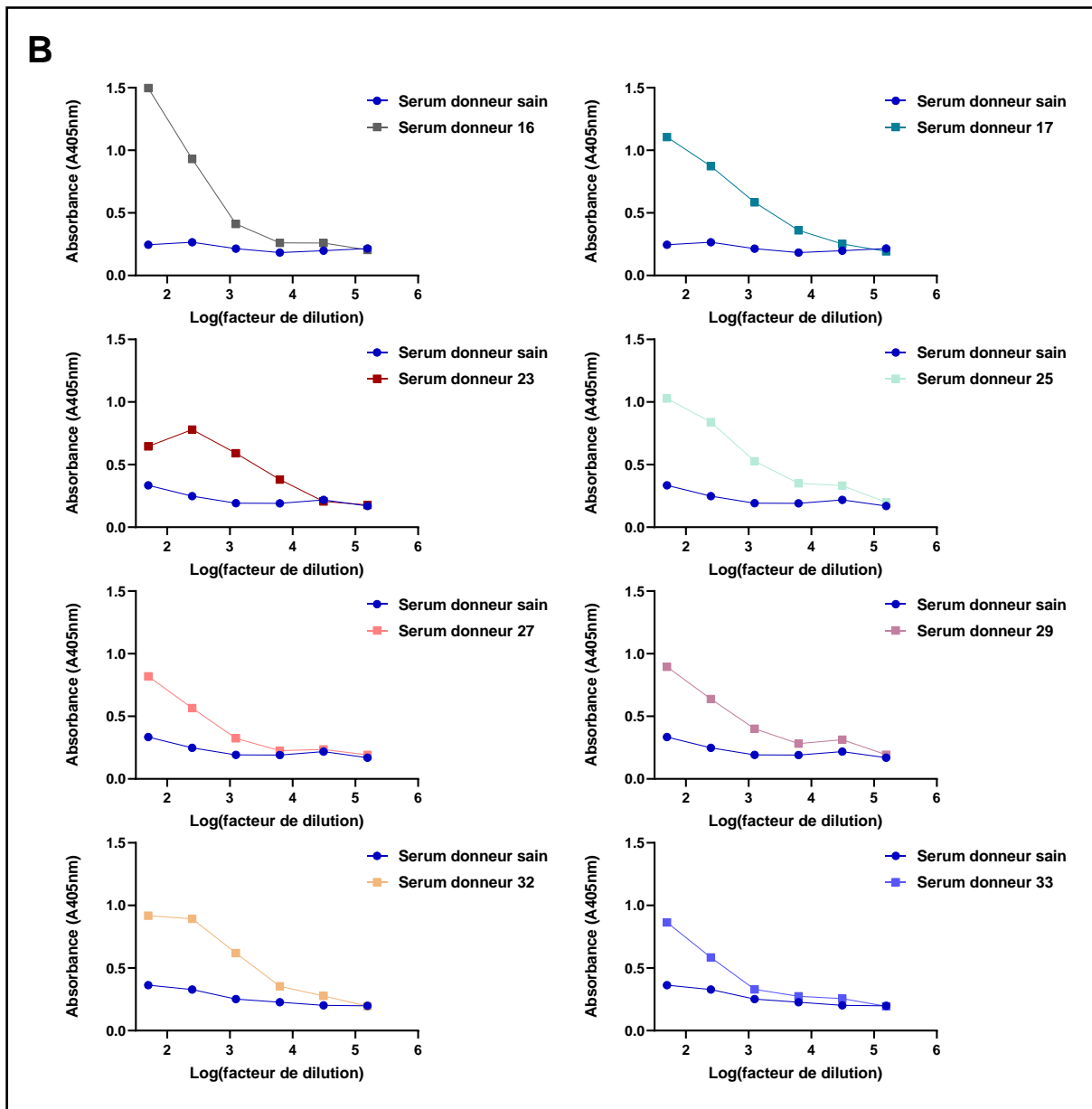
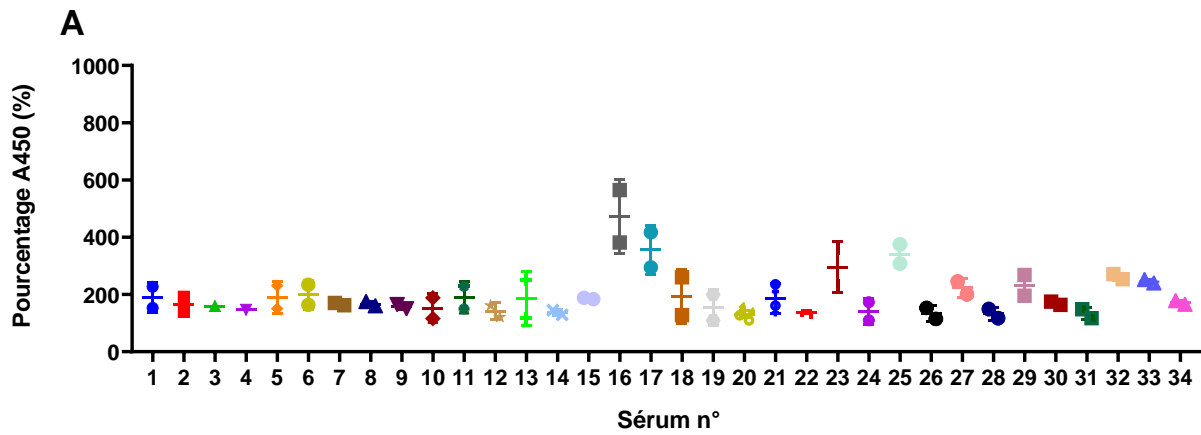


**Figure 21 : Criblage de sérums de patients atteints de mucoviscidose par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag A) Valeurs d'absorbance maximum normalisées obtenues en ELISA direct contre His-PcrV-Avitag. Les valeurs d'absorbances maximales ont été normalisées avec la valeur d'absorbance maximale du sérum d'un donneur sain. Ces données représentent deux expériences indépendantes (n=2). B) Courbes d'absorbance obtenues par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag des sérums sélectionnés. Les sérums testés ont été dilués en cascade correspondant à log 5 à partir d'une dilution au 1/50<sup>ème</sup>.**

Lors du criblage des sérums contre PcrV, les sérums des donneurs 6, 12, 14, 16 et 25 ont, à la fois, montré une absorbance maximale supérieure au seuil fixé ainsi qu'une absorbance supérieure au témoin négatif au second point de dilution (Figure 21A et 21B). En suivant ces mêmes critères, les sérums de 8 donneurs (16, 17, 23, 25, 27, 29, 32 et 33) ont également été sélectionnés comme étant réactifs contre PscF (Figure 22A et 22B). De façon intéressante, les sérums des donneurs 16 et 25 semblaient contenir des IgG spécifiques de PscF en plus de PcrV, ce qui les rendait particulièrement intéressants pour la suite de l'approche.

Les tests ELISA ont donc démontré la présence d'Ac spécifiques de PcrV et PscF chez certains donneurs. Ce type de mesure ne permet cependant pas d'évaluer précisément la nature et la quantité des anticorps spécifiques de PcrV et PscF recombinants présents dans le sérum. En effet, les titres observés peuvent être dus à une grande quantité d'anticorps de faible affinité ou une faible quantité d'anticorps de forte affinité.

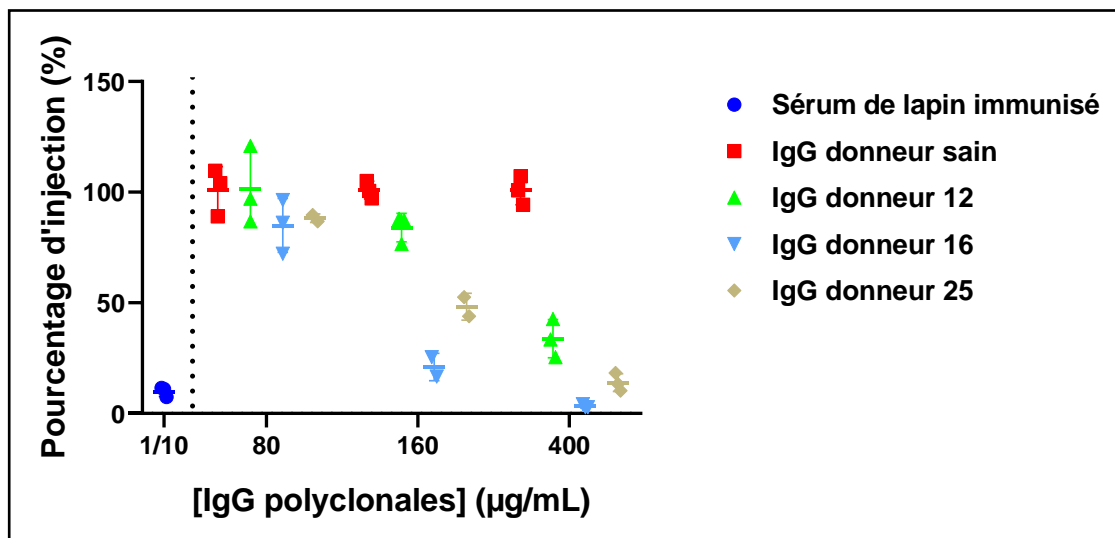
Enfin la présence d'anticorps capables de se fixer aux protéines recombinantes du SSTIII n'impliquait pas nécessairement la présence d'anticorps capables de bloquer le SSTIII. Nous avons donc ensuite testé les sérums sélectionnés pour leur réactivité contre PcrV et PscF dans un test fonctionnel d'inhibition du SSTIII.



**Figure 22 : Criblage de sérums de patients atteints de mucoviscidose par ELISA direct contre His-PscF-Avitag** A) Valeurs d'absorbance maximum normalisées obtenues en ELISA direct contre His-PscF-Avitag. Les valeurs d'absorbance maximales ont été normalisées avec la valeur d'absorbance maximale du sérum d'un donneur sain. Ces données représentent deux expériences indépendantes (n=2). B) Courbes d'absorbance obtenues par ELISA direct contre His-PscF-Avitag des sérums sélectionnés. Les sérums testés ont été dilués en cascade correspondant à log 5 à partir d'une dilution au 1/50<sup>ème</sup>.

#### 1.4 Criblage fonctionnel par test d'inhibition d'injection d'ExoS.

Les IgG contenues dans les sérums sélectionnés ont ensuite été criblées pour leur activité à inhiber l'injection de toxine par le SSTIII de *P.aeruginosa*, grâce à un test fonctionnel développé par l'équipe PBRC de l'IBS de Grenoble (VEROVE et al, 2012) et détaillée dans le chapitre Matériel et Méthodes. Afin d'éviter dans le test toute interférence par des protéines ou autres composants sériques, les IgG ont été purifiées des sérums sélectionnés. Les différentes solutions d'IgG purifiées ont été testées à différentes concentrations. Une solution d'IgG provenant du sérum d'un donneur sain a été utilisée comme contrôle négatif et du sérum de souris immunisées avec PcrV recombinant, fourni par l'équipe PBRC, a été utilisé comme contrôle positif. Les anticorps des donneurs 12, 16 et 25 ont montré dans ce test une efficacité inhibitrice dépendante de la dilution, de l'injection d'ExoS (figure 23). Pour les 3 donneurs, on a observé une forte réduction de l'injection d'ExoS en présence d'IgG à 400 µg/mL (Figure 23). Les IgG du donneur 16 ont montré une forte activité à 160 µg/mL alors qu'une réduction forte et modérée de l'effet inhibiteur était respectivement observée pour les IgG des donneurs 12 et 25 (Figure 23). A la concentration de 80 µg/mL, l'effet des IgG du donneur 12 était comparable à celui des IgG du donneur sain alors que les IgG des donneurs 12 et 25 gardaient une légère activité d'inhibition.



**Figure 23 :** Criblage fonctionnel des IgG des donneurs sélectionnés par test d'inhibition d'injection de ExoS par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla de *P.aeruginosa*. Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Le sérum d'un lapin immunisé avec PcrV recombinant a été utilisé comme contrôle positif. Les données présentées représentent les moyennes normalisées du rapport 460nm/538nm de triplicats provenant de 3 expériences indépendantes (n=3) excepté pour les IgG polyclonales des donneurs 25 à 160 et 80 µg/mL (n=2) et les IgG polyclonales du donneur 16 à 160 µg/mL (n=2).



Ces données ont montré que les sérums des patients sélectionnés sur la base de la présence d'anticorps contre PcrV et PscF possédaient bien une activité d'inhibition du SSTIII. Cependant, ces résultats ne permettaient pas d'affirmer que c'étaient effectivement les anticorps anti-PscF et/ou anti-PcrV qui étaient capables d'inhiber l'injection de la toxine ExoS, on ne pouvait qu'en faire l'hypothèse.

### **Déplétion des anticorps spécifiques de PcrV et PscF des IgG polyclonales**

Nous avons testé l'hypothèse émise ci-dessus en mesurant l'activité inhibitrice des sérums une fois dépourvus des anticorps anti-PscF et/ou anti-PcrV. Nous avons en effet raisonné qu'une perte ou une diminution de l'inhibition du SSTIII dans ces conditions serait le reflet de l'activité fonctionnelle anti-SSTIII des anticorps dirigés contre PcrV et PscF.

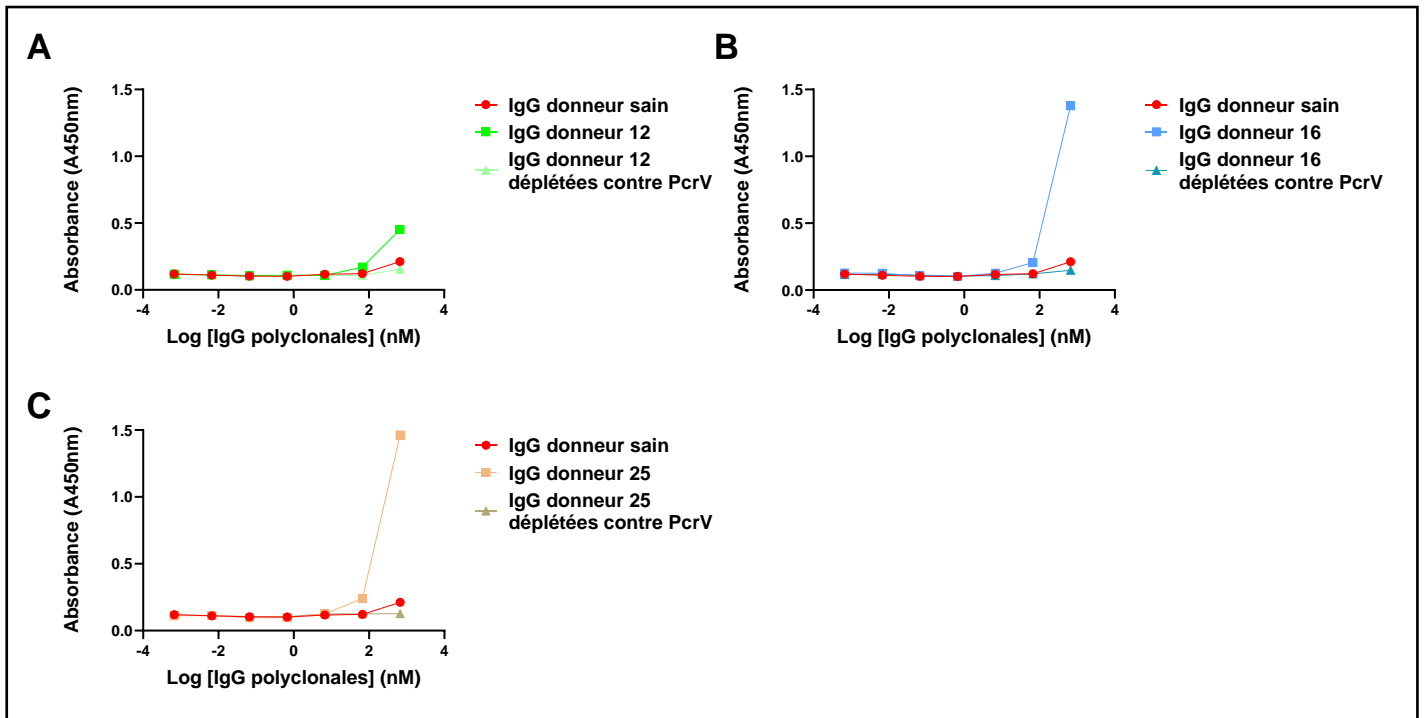
De plus, la réduction de l'efficacité d'inhibition du SSTIII par les IgG, déplétées des anticorps contre PcrV et/ou PscF, indiquerait aussi la capacité de ces formes recombinantes à être reconnues par les anticorps capables d'activité inhibitrice. En effet, il peut exister des différences de conformation et d'accessibilité d'épitopes entre les protéines recombinantes et leurs homologues natifs exprimés à la surface de la bactérie. Notre approche d'isolement d'anticorps inhibiteurs du SSTIII reposant sur l'utilisation des protéines recombinantes PcrV et PscF pour sélectionner des lymphocytes B mémoire spécifiques, il était crucial de confirmer que nos appâts protéiques étaient capables de capturer les anticorps fonctionnels inhibiteurs.

#### **1.5 Vérification de l'efficacité de déplétion par test ELISA direct**

Les sérums ont été déplétés en anticorps spécifiques de PcrV et PscF recombinants, par adsorption. L'efficacité de déplétion a été vérifiée par ELISA contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag respectivement (Figures 24, 25 et 26). Pour chacune des solutions d'IgG déplétées par adsorption sur His-PcrV-Avitag, une diminution significative de l'absorbance a été détectée en ELISA contre cette protéine, en comparaison avec la fraction non-déplétée (Figure 24 A, B et C).

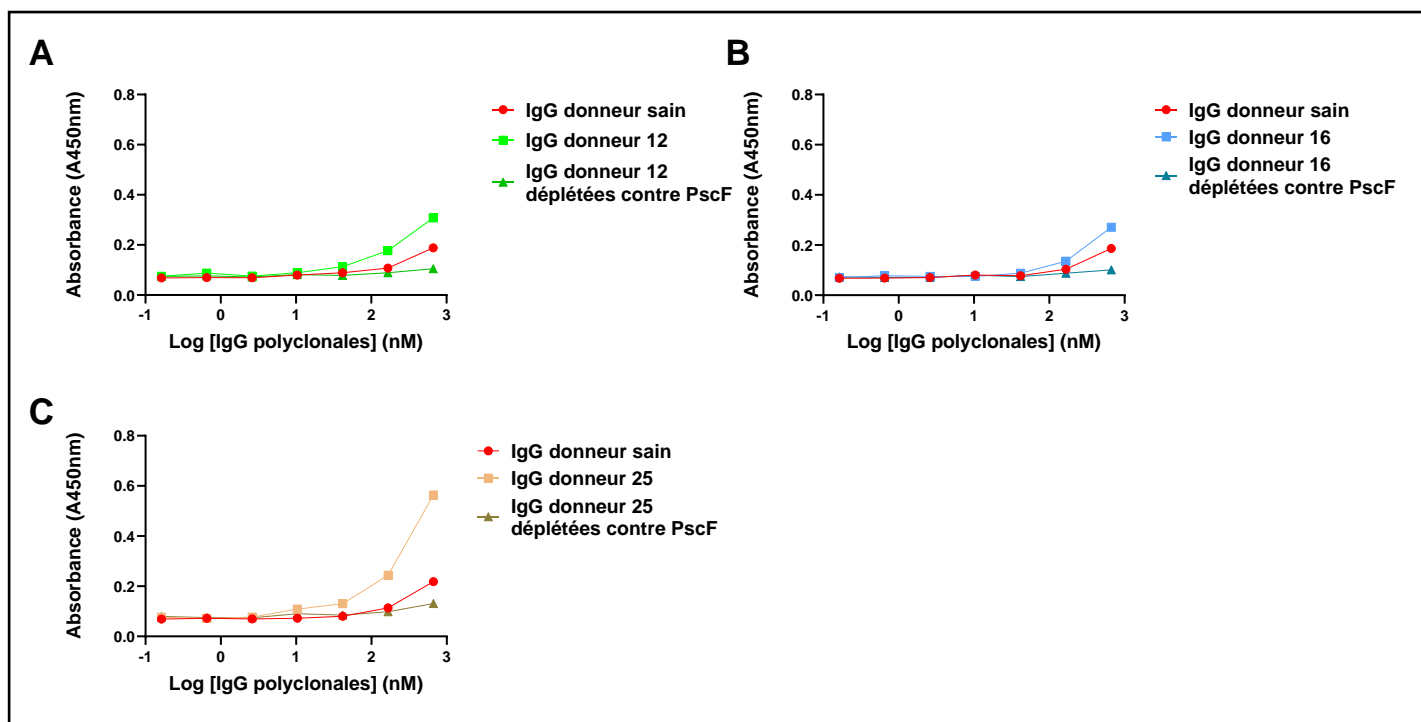
Les valeurs d'absorbance des fractions déplétées étaient égales ou inférieures à celles des anticorps polyclonaux purifiés du donneur sain.

Ces résultats ont indiqué que l'ensemble des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag ont été éliminés avec succès de la fraction d'IgG totales des donneurs.



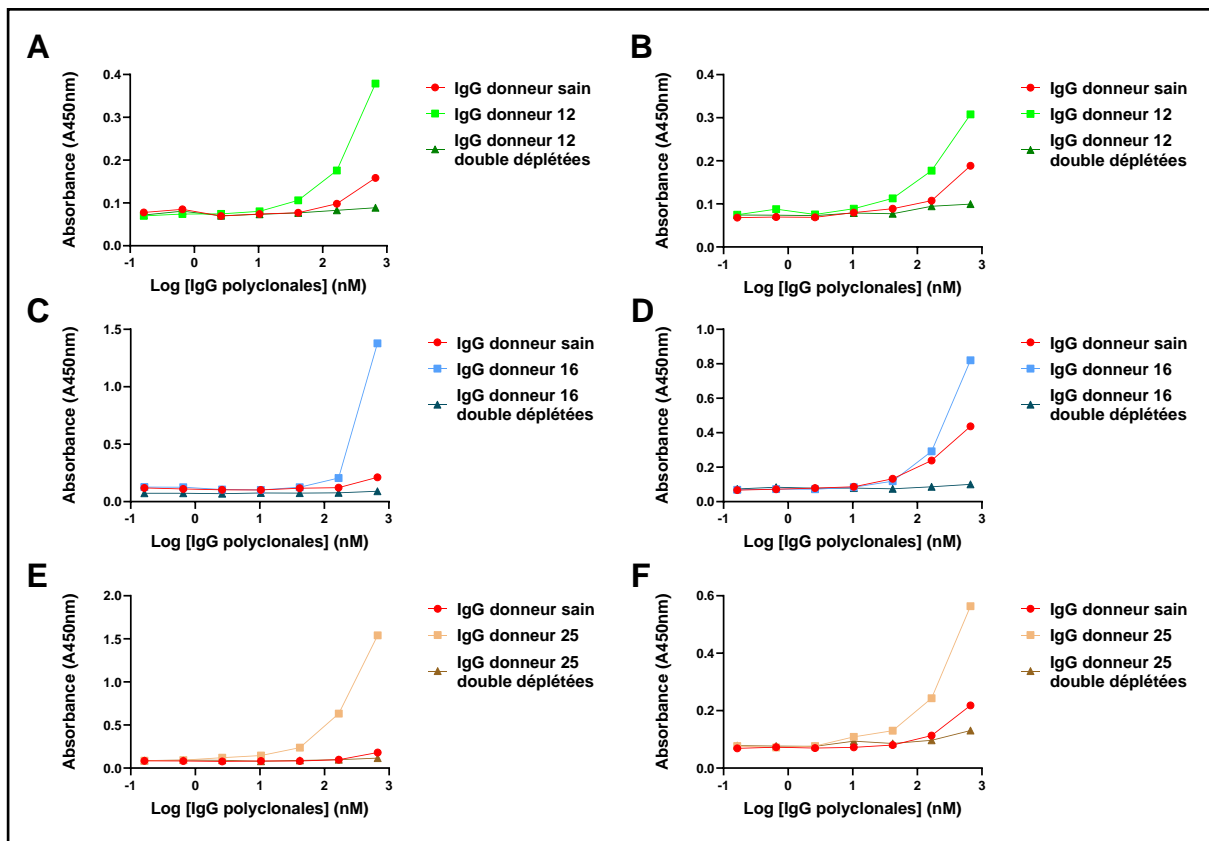
**Figure 24 : Titre des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées des IgG anti-His-PcrV-Avitag par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag.** **A)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag des IgG polyclonales du donneur 12. **B)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag des IgG polyclonales du donneur 16. **C)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PcrV-Avitag des IgG polyclonales du donneur 25.

De la même façon, les fractions d'IgG polyclonales déplétées par adsorption sur His-PscF-Avitag ont également montré en ELISA, contre His-PscF-Avitag, un signal similaire à celui des IgG polyclonales du donneur sain (Figure 25 A, B et C). Ces résultats indiquent que l'ensemble des anticorps spécifiques de His-PscF-Avitag ont été éliminés avec succès de la fraction d'IgG totales des donneurs.



**Figure 25 : Titre des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées des IgG anti-His-PscF-Avitag par ELISA direct contre His-PscF-Avitag. A) Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PscF-Avitag des IgG polyclonales du donneur 12. B) Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PscF-Avitag des IgG polyclonales du donneur 16. C) Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la déplétion des anticorps spécifiques de His-PscF-Avitag des IgG polyclonales du donneur 25.**

Au cas où une simple déplétion serait insuffisante pour observer une diminution significative de l'efficacité fonctionnelle des anticorps polyclonaux, ces derniers ont été aussi successivement déplétés contre His-PscF-Avitag puis contre His-PcrV-Avitag. L'efficacité de la déplétion a également été vérifiée par ELISA direct contre chacune des protéines. Aucune des fractions double-déplétées n'a montré de signal spécifique contre l'une ou l'autre des protéines recombinantes confirmant l'absence d'IgG spécifiques (Figure 26 A-F).



**Figure 26 : Titre des IgG polyclonales non-déplétées et doublement déplétées par ELISA direct contre His-PscF-Avitag et His-PcrV-Avitag. A)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 12. **B)** Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 12. **C)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 16. **D)** Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 16. **E)** Vérification par ELISA direct contre His-PcrV-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 25. **F)** Vérification par ELISA direct contre His-PscF-Avitag de la double déplétion des IgG polyclonales du donneur 25.

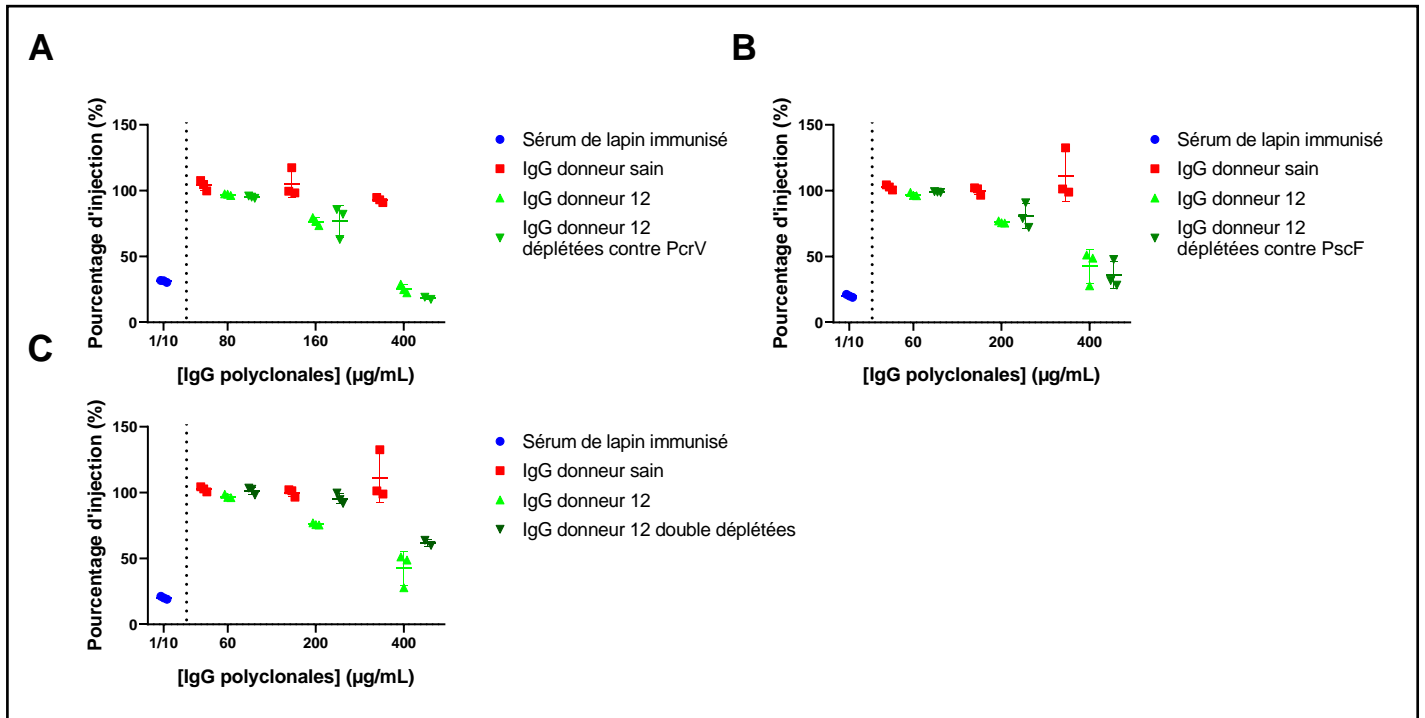
## Comparaison de l'activité fonctionnelle des IgG non-déplétées et des IgG déplétées par les protéines recombinantes

La capacité d'inhibition du SSTIII des différentes fractions déplétées a ensuite été comparée à celle des fractions non-déplétées.

Les IgG totales du donneur 12 déplétées par adsorption sur His-PcrV-Avitag, His-PscF-Avitag et doublement déplétées n'ont pas montré de différence significative avec les IgG non-déplétées du même donneur à toutes les concentrations testées (Figure 27 A, B et C).

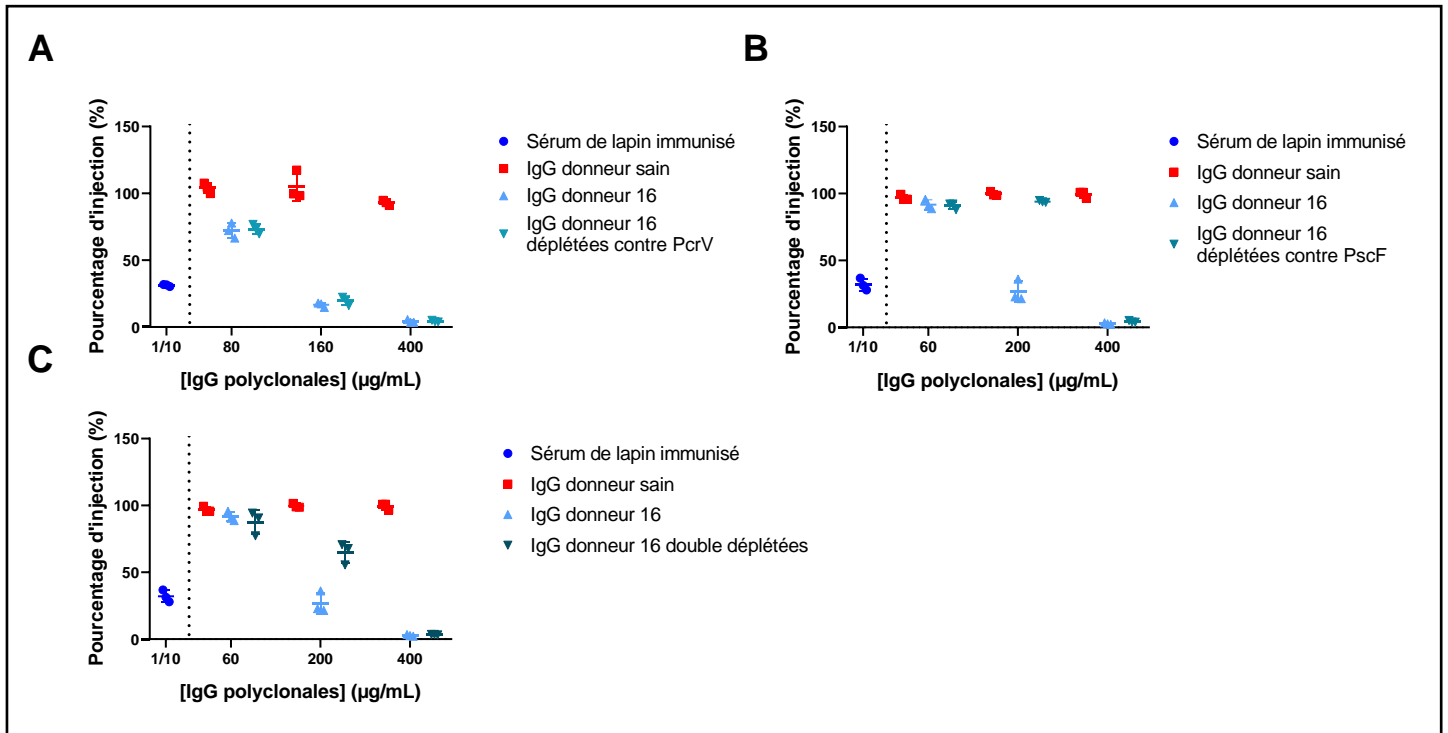
L'absence des anticorps anti-PcrV et anti-PscF recombinants n'a pas eu d'impact sur l'efficacité fonctionnelle des IgG polyclonales de ce patient.

Ces résultats suggèrent que, les protéines recombinantes utilisées ne sont pas capables de capturer les IgG anti-PcrV et anti-PscF fonctionnelles de ce patient, soit que que l'activité anti-SSTIII du sérum de ce donneur est liée à la présence d'anticorps dirigés contre d'autres composants du SSTIII, comme par exemple PopB ou PopD.



**Figure 27 : Activité des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées du donneur 12 par test d'inhibition d'injection de ExoS par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla de *P.aeruginosa*.** A) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 12 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag. B) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 12 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PscF-Avitag. C) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 12 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag. Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées représentent le rapport moyen de fluorescence 460nm/538nm normalisé de triplicat (n=1).

La déplétion des IgG spécifiques de His-PcrV-Avitag des IgG totales du donneur 16 n'a pas montré de différence d'efficacité avec les IgG non-déplétées (Figure 28A). Cependant, nous avons observé une diminution de l'efficacité fonctionnelle lorsque les IgG étaient déplétées contre His-PscF-Avitag ou double déplétées à la concentration de 200 µg/mL (Figure 28B et C). Ces résultats indiquent qu'une fraction des IgG polyclonales impliquées dans l'inhibition de l'injection de ExoS est dirigée contre (et capturable par) PscF recombinant.

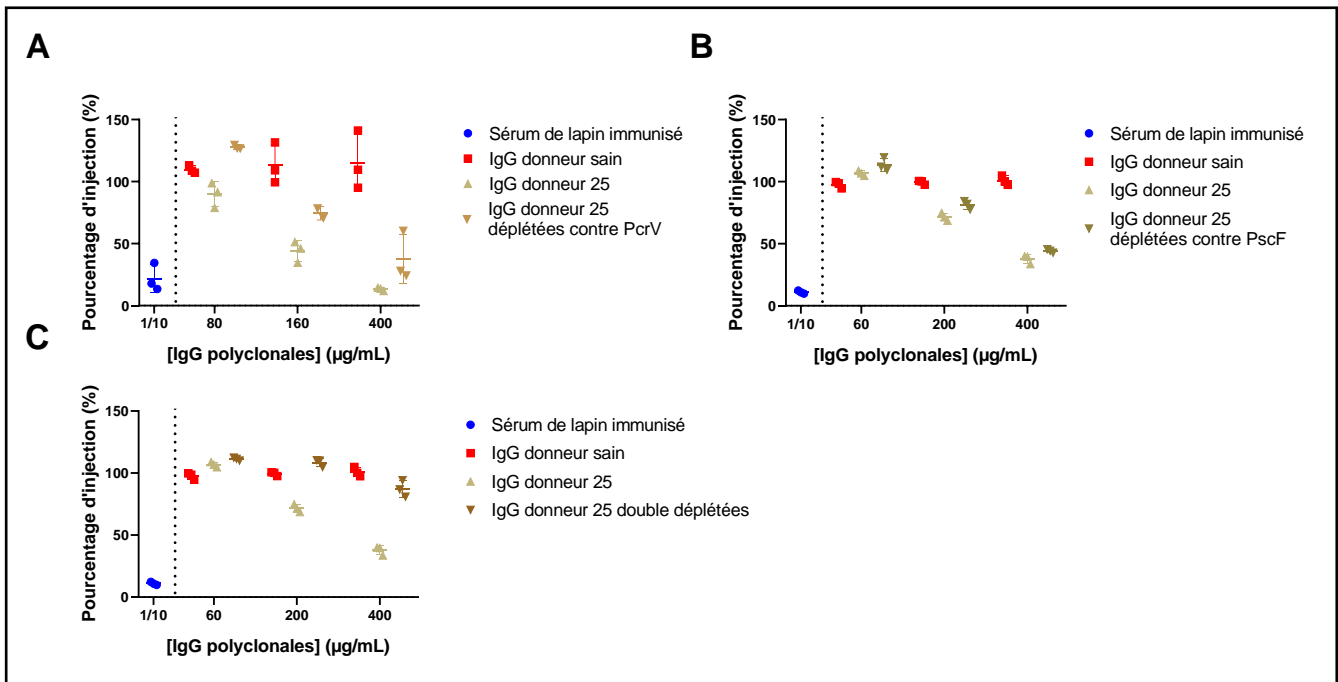


**Figure 28 : Activité des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées du donneur 16 par test d'inhibition d'injection de ExoS par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla de *P.aeruginosa*.** A) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 16 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag. B) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 16 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PscF-Avitag. C) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 16 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag. Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées représentent le rapport moyen de fluorescence 460nm/538nm normalisé de triplicat (n=1).

Dans le cas des IgG du donneur 25, la simple déplétion contre PcrV recombinant a montré une légère diminution de l'efficacité fonctionnelle (Figure 29 A). La simple déplétion contre PscF recombinant n'a, quant à elle, montré aucune différence d'efficacité (Figure 29 B). Cependant, la double déplétion a réduit considérablement l'inhibition de l'injection comparée aux IgG non-déplétées même à forte concentration (400 et 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figure 29 C). L'effet de la simple déplétion par PcrV a donc suggéré qu'une partie des anticorps fonctionnels reconnaissaient PcrV recombinant. L'efficacité similaire des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées contre PscF pourrait s'expliquer par une absence d'anticorps anti-PscF recombinant fonctionnels ou par l'activité d'IgG anti-PcrV recombinants et/ou natifs ainsi que les IgG anti-PscF natifs (Figure 29 B). La réduction de l'efficacité des IgG polyclonales plus marquée observée en double déplétion indique que les anticorps spécifiques de PscF recombinant jouent un rôle dans l'inhibition de l'injection (Figure 29 C).

Une fraction des IgG reconnaissait des épitopes neutralisants exposés à la fois sur la protéine native et sa forme recombinante.

En conclusion, les expériences de déplétion ont montré que deux des trois donneurs testés avaient des anticorps anti-PcrV et anti-PscF inhibiteurs du SSTIII. De plus, ces résultats ont validé l'utilisation de formes recombinantes de PcrV et PscF pour le tri cellulaire des lymphocytes B mémoire de ce donneur.

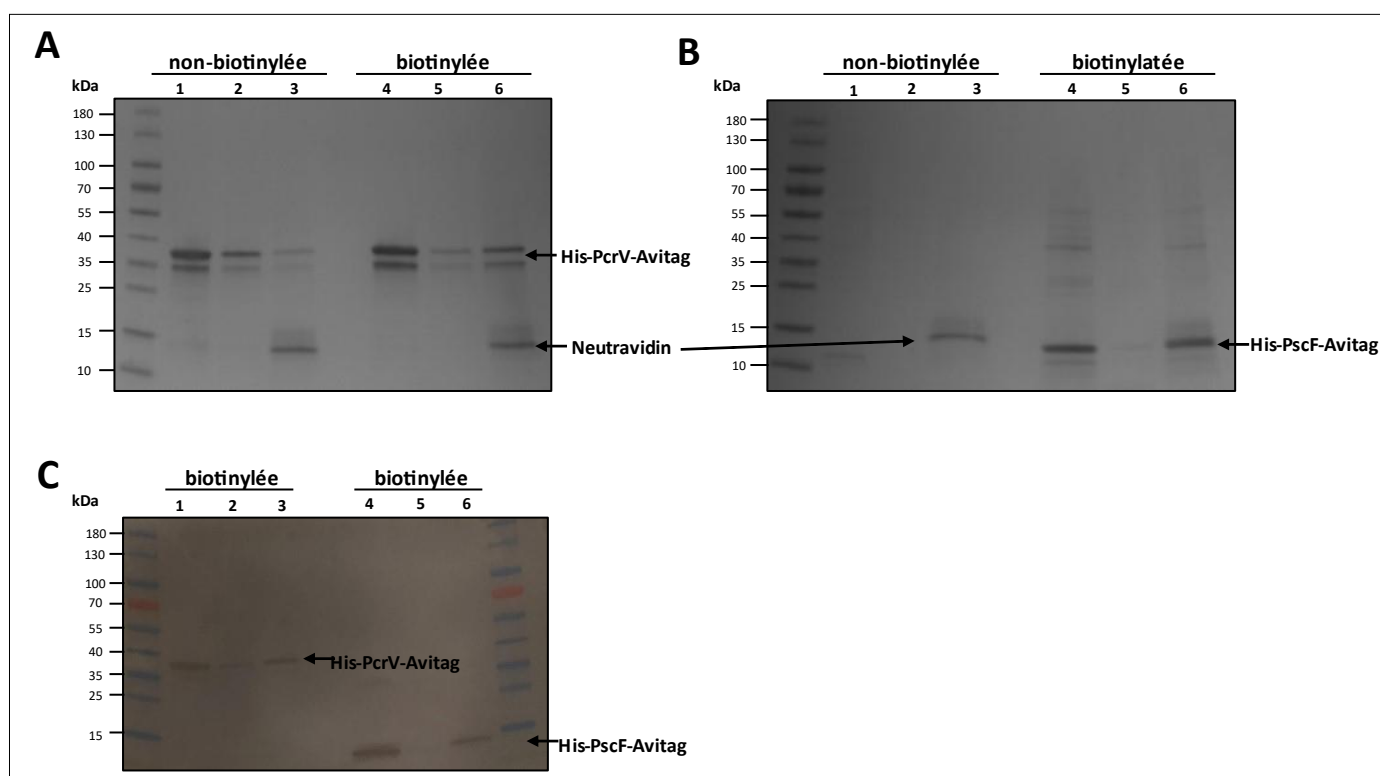


**Figure 29 : Activité des IgG polyclonales non-déplétées et déplétées du donneur 25 par test d'inhibition d'injection de ExoS par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla de *P.aeruginosa*.** A) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 25 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag. B) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 25 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PscF-Avitag. C) Comparaison des IgG polyclonales du donneur 25 non-déplétées avec les IgG déplétées contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag. Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées représentent le rapport moyen de fluorescence 460nm/538nm normalisé de triplicat (n=1).

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi de prioriser les donneurs 16 et 25 pour l'approche d'isolement d'anticorps. Cependant, les PBMC du donneur 12 ont été également collectées.

## Biotinylation de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag

Les appâts protéiques ont ensuite été biotinylés par l'enzyme BirA et l'efficacité de la biotinylation a été évaluée. Pour cela, les protéines ont été incubées avec de la résine couplée à la neutravidine, un dérivé de l'avidine dépourvue de glycosylation possédant une très forte affinité pour la biotine (JAIN et al, 2017).



**Figure 30 : Vérification de l'efficacité de biotinylation de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag par affinité à la neutravidine.**

**A)** Analyse par SDS-PAGE (4-20%) de His-PcrV-Avitag non-biotinylé et biotinylé mis en contact avec de la résine conjuguée à la neutravidine. Piste 1 : His-PcrV-Avitag non biotinylée avant mise en contact avec la résine (*input*) ; Piste 2 : échantillon non-retenu (*undound*) Piste 3 : Echantillon retenu par la neutravidine (*bound*) ; Piste 4 : His-PcrV-Avitag biotinylé avant mise en contact avec la résine (*input*) ; Piste 5 : échantillon non-retenu (*undound*) Piste 6 : Echantillon retenu par la neutravidine (*bound*). **B)** Analyse par SDS-PAGE (4-20%) de His-PscF-Avitag non-biotinylée et biotinylée mise en contact avec de la résine conjuguée à la neuravidine. Piste 1 : His-PscF-Avitag non biotinylée avant mise en contact avec la résine (*input*) ; Piste 2 : échantillon non-retenu (*undound*) Piste 3 : Echantillon retenu par la neutravidine (*bound*) ; Piste 4 : His-PscF-Avitag biotinylée avant mise en contact avec la résine (*input*) ; Piste 5 : échantillon non-retenu (*undound*) Piste 6 : Echantillon retenu par la neutravidine (*bound*). **C)** Vérification de la présence de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag dans les échantillons testés par Western-Blot.



Après incubation, les différentes fractions ont été analysées sur gel SDS-PAGE (4-20%) et par Western-Blot (Figures 30 A, B et C). La présence de His-PcrV-Avitag dans la fraction interagissant avec la neutravidine confirme qu'une grande partie des protéines a été biotinylée avec succès (Figure 30 A piste 6). On peut néanmoins noter une interaction non-spécifique entre His-PcrV-Avitag non-biotinylée et la neutravidine (Figure 30 A piste 3).

La bande située entre 10 et 15 kDa correspond à la neutravidine libre dont la liaison avec la résine a été rompue lors de la dénaturation (figure 30 A pistes 3 et 6 ; Figure 30 B pistes 3 et 6). La bande située à 35 kDa pourrait indiquer la présence de contaminants ou de produits de dégradation de PcrV (Figure 30 A pistes 1-6). L'hypothèse d'un produit de dégradation semble plus plausible du fait de la présence plus importante de cette bande dans la fraction liée à la neutravidine de His-PcrV-Avitag biotinylée comparé à cette même fraction de His-PcrV-Avitag non-biotinylé (Figure 30 A pistes 3 et 6).

La protéine His-PscF-Avitag semble avoir été biotinylée en quasi-totalité comme le montre la faible quantité de protéine dans la fraction n'interagissant pas avec neutravidine (Figure 30 B piste 5). La bande visible en piste 3 correspond également à de la neutravidine libre. L'information donnée par ce gel reste partielle, les bandes correspondant à la neutravidine et à His-PscF-Avitag se superposant (Figure 30 B piste 6). Une analyse par Western-Blot utilisant des anticorps anti-hexahistidine a permis de confirmer la présence de chacun des protéines biotinylées dans la fraction interagissant avec la neutravidine en plus de lever le doute sur la biotinylation de His-PscF-Avitag (Figure 30 pistes 3 et 6). De plus, l'absence de la bande située à 35 kDa indique qu'il pourrait s'agir d'un contaminant ou d'une dégradation en amino-terminal de His-PcrV-Avitag (Figure 30 C pistes 1-3).

## **Tri cellulaire de cellules B mémoire spécifiques de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag par cytométrie en flux.**

### **1.6 Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique**

Les cellules mononuclées du sang périphérique des donneurs 12, 16 et 25 inclus dans l'étude ABAC-IBS (NCT04335383) ont été isolées par centrifugation en gradient de densité. Ces échantillons ont été aliquotés à raison de 10 millions de cellules par tube et stockés dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure en tri cellulaire.

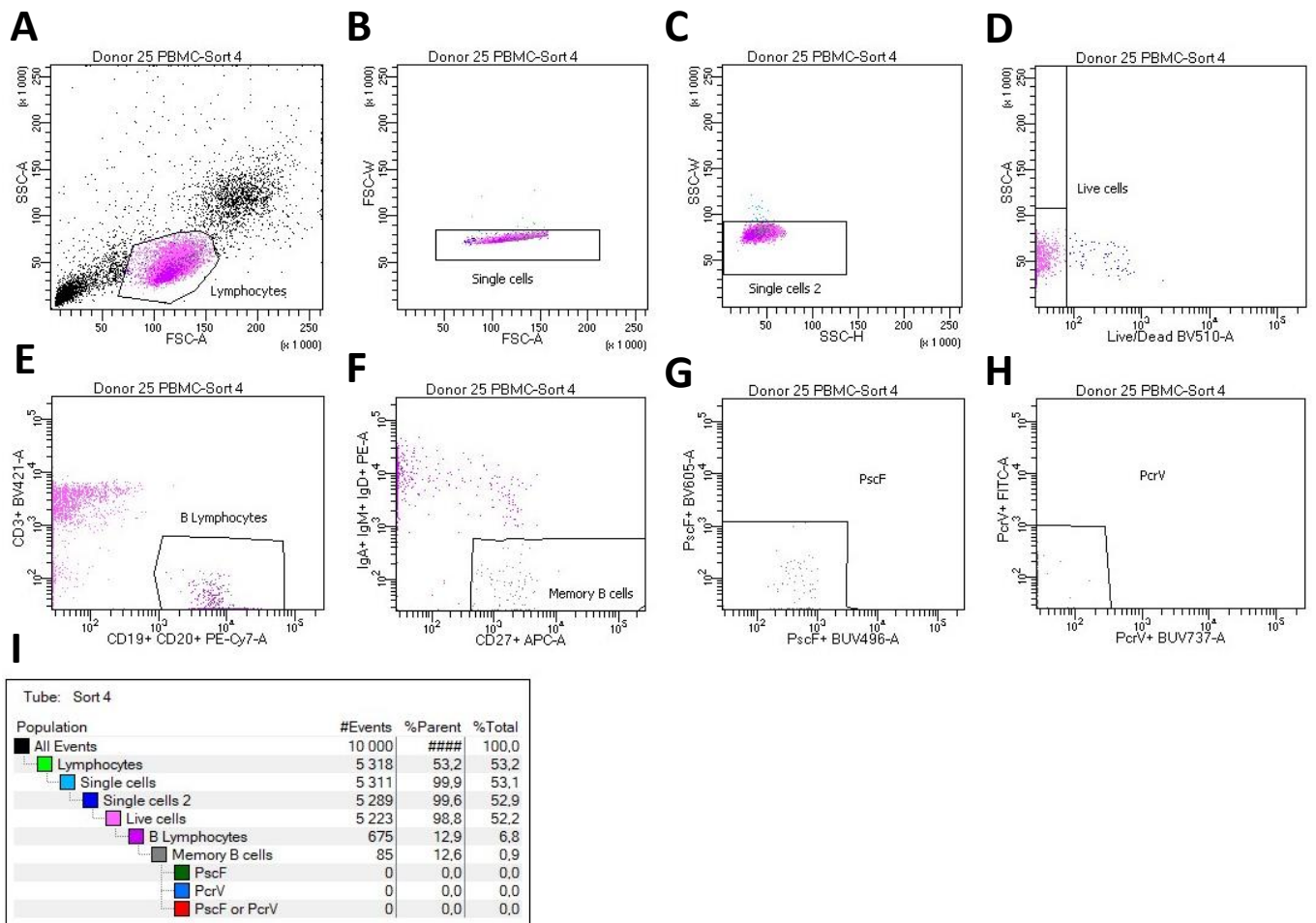
#### **Stratégie de fenêtrage (*Gating*)**

L'identification des cellules B mémoire a été effectuée par immunophénotypage. Pour cela, des anticorps anti-CD (cluster of differentiation) couplés à différents fluorochromes ont été utilisés (Annexe 7).

Tout d'abord, les lymphocytes ont été sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques de diffraction de la lumière vers l'avant (Forward Scatter FSC), donnant les caractéristiques de granulosité des cellules, et la diffraction sur les côtés (Side Scatter SSC), donnant la taille de la cellule. Ces mêmes paramètres ont été utilisés afin d'identifier les cellules uniques non complexées. Les cellules vivantes ont été ensuite sélectionnées pour leur négativité au Live/Dead BV510, un colorant fluorescent incapable de pénétrer dans les cellules dont l'intégrité membranaire est intacte. Une sélection négative pour le marqueur CD3 spécifique des lymphocytes T couplée à une sélection positive pour les marqueurs CD19 et CD20 spécifiques des lymphocytes B a permis d'isoler ces derniers. Les lymphocytes B IgA, IgM et IgD négatifs et CD27 positifs ont été sélectionnés. Cette population correspond aux lymphocytes B mémoire IgG+. La sélection négative pour les IgA, IgM et IgD permet d'éviter le marquage direct des IgG et ainsi un potentiel encombrement stérique qui empêcherait les BCR d'interagir avec leurs antigènes d'intérêt.

Chaque antigène d'intérêt a été marqué séparément par deux streptavidines couplées à deux fluorochromes différents pour éviter la sélection des cellules B non spécifiques.

Les cellules ont donc été incubées avec du His-PscF-Avitag couplé à BV-605 et du His-PscF-Avitag couplé à BUV496, ainsi qu'avec du His-PcrV-Avitag couplé à FITC et du His-PcrV-Avitag couplé à BUV737. Les cellules mémoire positives à un des deux couples de fluorochrome BV-605/BUV496 et FITC/BUV737 marquant respectivement les antigènes His-PscF-Avitag et His-PcrV-Avitag ont été triées à la fréquence d'une cellule par puits dans des plaques de 96 puits.



**Figure 31 : Cytoprogramme bi-paramétrique du tri de lymphocytes B mémoire spécifiques de His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag** **A)** Sélection des lymphocytes parmi l'ensemble des PBMC avec le paramètre de diffraction de la lumière (FSC et SSC). **B)** et **C)** Sélection de cellules uniques par deux gating successifs selon les paramètres de diffraction de la lumière vers l'avant et sur le côté. **D)** Sélection des cellules vivantes négatives au marquage Live/Dead. **E)** Sélection des lymphocytes B positifs au marquage Anti CD19-CD20 et négatifs au marquage anti-CD3. **F)** Sélection des lymphocytes B mémoire IgG+ positifs au marquage anti-CD27 et négatifs aux marquages anti-IgA, anti-IgM et IgD. **G)** et **H)** Sélection de lymphocytes B mémoires IgG+ positifs aux marquages streptavidine BV605 et BUV496 (PscF) et aux marquages streptavidine FITC et BUV737 (PcrV). **I)** Table de statistiques de la proportion de chaque sous-population cellulaire parmi l'échantillon. Un total de 10 000 cellules a été analysé. L'ensemble des réglages du cytomètre trieur de cellules ainsi que les compensations ont été effectués par le Dr Axelle Amen et le Dr Sebastian Dergan Dylon du groupe CAID.

Pour chaque cellule B, les intensités de fluorescence moyennes (MFI - Mean Fluorescence Intensity) des couples de streptavidine marquée par les fluorochromes ont donc été utilisées pour déterminer la positivité des lymphocytes B mémoire en termes de reconnaissance de PcrV ou PscF. Pour chaque fluorochrome, un seuil a été placé à une valeur de MFI correspondant à l'intensité de fluorescence observée en présence de cellules d'un donneur sain.

Les tris n°1 et 2 respectivement effectués sur les PBMC des donneurs 16 et 25 ont servi à l'optimisation des conditions expérimentales en permettant le tri d'un total de 600 cellules (données non montrées). Les tris n°3 et n°4, effectués sur les PBMC du donneur 25, ont permis l'isolement de 330 lymphocytes B mémoire spécifiques d'au moins un des deux antigènes d'après les valeurs de MFI, à partir d'un total de 30 millions de PBMC. Ces cellules constituent donc une population rare représentant 0,00011% des cellules totales ainsi que 0,00099% des cellules B mémoire de l'échantillon (Figure 32). De façon intéressante, 96% des cellules triées étaient spécifiques de PscF pour seulement 3,1% et 8,6% de cellules spécifiques de PcrV pour le tri n°3 et n°4 respectivement (Figure 32), suggérant que la réponse anti-PscF était dominante chez ce donneur. Alternativement, il se pourrait que le seuil de positivité choisi ait été trop bas pour PscF et/ou trop haut pour PcrV. Dans le tri n°4, 5% des cellules ont montré une valeur de MFI supérieure au seuil pour les deux protéines, suggérant aussi que le seuil utilisé était insuffisant pour discriminer efficacement l'intensité des fluorochromes correspondants à PcrV de ceux de PscF (Figure 32). Ces données peuvent également s'expliquer par une interaction non-spécifique entre les BCR des LB mémoires et les deux protéines ou les fluorochromes.

	Cellules triées	Pourcentage (%)		
		Cellules PscF+	cellules PcrV +	Double positive
<b>Tri n°3</b>	<b>51</b>	<b>96,07843137</b>	<b>3,12244898</b>	<b>0</b>
<b>Tri n°4</b>	<b>279</b>	<b>96,05734767</b>	<b>8,602150538</b>	<b>5,017921147</b>

**Figure 32 : Pourcentage de lymphocytes B mémoire spécifique de PcrV et/ou de PscF parmi les cellules isolées lors des tris n°3 et n°4.**

## Production d'anticorps monoclonaux humains

### 1.7 Amplification des gènes d'immunoglobulines par PCR imbriquées

Un tri a été réalisé avec les PBMCs du donneur 16, et 3 tris avec celles du donneur 25. Comme indiqué précédemment, les tris n°1 et n°2 n'ont pas permis un isolement optimal de lymphocytes B mémoire spécifiques de PcrV et PscF. Cependant, des anticorps ont tout de même pu être produits grâce à ces tris et ils seront donc également traités dans l'analyse qui suit. Au total 16 plaques de 96 puits de cellules B ont été obtenues (60 puits/cellules par plaque ont été utilisés). Après extraction des ARN et transcription inverse en ADNc, les gènes d'immunoglobulines ont été amplifiés par PCR imbriquée. Une portion des échantillons obtenus suite à la 2<sup>ème</sup> PCR a été utilisée pour vérifier la présence d'amplicons dans chacun des puits par électrophorèse sur un gel d'agarose. Le pourcentage d'amplification correspondant au nombre de bande présentes sur gel par rapport au nombre de cellules par plaque a été compilé (Figure 33). Les pourcentages moyens d'amplification pour les gènes de chaînes lourdes de 56,77% et légère d'immunoglobulines (50% pour les chaînes légère Kappa et 38,5% pour les chaînes légères lambda) correspond aux taux d'amplification décrits dans la littérature (Tiller et al, 2008) et généralement obtenus dans le laboratoire (Figure 33).

Les taux d'amplification de la plaque 3 du tri n°2 ont été exclus pour raison de mauvaise sélection de population cellulaire lors du tri (Figure 33).

		Pourcentage d'amplification (%)			
		N° de plaque	Hc	Kc	λc
Donneur 16	Tri n°1	Plaque 2	57	62	28
		Plaque 3	68	52	35
		Plaque 4	45	55	24
Donneur 25	Tri n°2	Plaque 4	64	47	38
	Tri n°3	Plaque 1	62	53	55
	Tri n°4	Plaque 3	48,3	46,6	43,3
		Plaque 4	48,3	36,6	40
		Plaque 5	61,6	48,3	45
		Moyenne (%)	56,8	50,1	38,5

**Figure 33 : Tableau récapitulatif des taux d'amplification par PCR des gènes d'immunoglobulines.** Le taux d'amplification a été obtenu en calculant le rapport du nombre de puits positifs en PCR2 (présence d'une bande en gel d'agarose) sur le nombre de puits total. Les données indiquées en rouge ont été exclues de la moyenne globale.

## 1.8 Clonage et production des anticorps monoclonaux

Les gènes des chaînes amplifiées ont ensuite été séquencées (GENEWIZ) et les séquences obtenues ont été alignées sur la base de données IMGT (IMGT.org) afin d'identifier les familles de gènes d'immunoglobulines correspondantes. Pour les échantillons dans lesquels la présence de gène d'Ig a été confirmée, une troisième étape de PCR a été effectuée pour obtenir des amplicons dotés de séquence « seamless » en 5' et 3' permettant le clonage des gènes d'intérêt par recombinaison. Cette « PCR de clonage » a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques des familles identifiées par IMGT. Les inserts obtenus ont été clonés dans des plasmides d'expression et les couples chaînes lourde/légère appropriées ont été transfectés dans des cellules HEK 293F afin de permettre la production des anticorps correspondants. Le tableau ci-dessous présente le rendement correspondant au nombre d'anticorps produits par rapport au nombre de paires de chaînes lourdes/légères d'intérêt, c'est-à-dire amplifiées avec succès lors de la PCR imbriquée à partir d'une cellule montrant un signal de MFI supérieur à un seuil défini pour chaque fluorochrome. Une analyse a posteriori (index sort) nous a permis d'affiner les valeurs de seuil de positivité pour chaque fluorochrome.

Cette différence est due au fait que lors du tri, un seuil bas a été choisi pour isoler le maximum de cellules. Le rendement moyen des 9 plaques traitées s'élève à 60,5% (Figure 34). Les principaux facteurs limitants de cette production d'anticorps comprennent i) l'absence d'amplification de paires d'intérêt lors de la PCR imbriquée ii) l'absence d'amplification lors de la PCR de clonage iii) l'échec du clonage iv) l'absence d'expression des anticorps par les cellules HEK293F.

Donneur	Tri	N°Plaque	Paires	Paires d'intérêt	Paires clonées	Anticorps	Rendement (%)
16	1	2	32	2	2	2	100,0
		3	38	6	5	2	33,3
		4	23	7	5	4	57,1
25	2	4	42	5	2	2	40,0
		3	1	40	20	18	18
	4	2	27	16	8	8	50,0
		3	30	20	17	14	70,0
		4	28	9	5	4	44,4
5	41	20	14	12	60,0		
<b>Total</b>			<b>301</b>	<b>105</b>	<b>76</b>	<b>66</b>	<b>60,5</b>

**Figure 34 : Tableau récapitulatif du rendement d'obtention des anticorps monoclonaux lors des différentes étapes de l'approche.**

## Criblage par ELISA des anticorps monoclonaux dirigés contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag

Les 66 anticorps produits ont été criblés par ELISA contre les protéines utilisées lors du tri. Notre stratégie a permis l'isolement de 66 anticorps, dont 4 positifs en ELISA pour His-PcrV-Avitag et 14 positifs pour His-PscF-Avitag (Figure 35). Ces résultats sont cohérents avec le nombre plus élevé de cellules B mémoire ayant un signal positif pour His-PscF-Avitag lors du tri cellulaire comparé à celles ayant un signal positif pour His-PcrV-Avitag.

Donneur 16	Tri n°1	IgG Anti-PcrV	IgG Anti-PscF	IgG Non-Spécifique	Total
	Plaque 2	0	0	2	2
	Plaque 3	1	0	1	2
	Plaque 4	0	0	4	4
Donneur 25	Tri n°2				
	Plaque 4	0	0	2	2
	Tri n°3				
	Plaque 1	0	7	11	18
	Tri n°4				
	Plaque 2	0	0	8	8
	Plaque 3	1	4	9	14
	Plaque 4	0	0	4	4
	Plaque 5	2	3	7	12
	<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>48</b>	<b>66</b>

**Figure 35 :** Tableau récapitulatif de la spécificité des anticorps monoclonaux humains observée en ELISA contre His-PcrV-Avitag et His-PscF-Avitag.

Douze anticorps donnant en ELISA un signal positif pour les deux protéines ont été considérés comme poly-réactifs et exclus de la suite de la caractérisation (les 2 protéines n'ayant pas d'homologie de séquence). Pour les 4 anticorps monoclonaux anti-PcrV, les EC50 étaient relativement similaires avec des valeurs allant de 0,02 µg/mL à 0,13 µg/mL (Figure 36). Les EC50 des 14 IgG anti-PscF formaient une gamme plus large avec des valeurs allant de 0,07 à 10,89 µg/mL (Figure 36).

Ces données indiquent que la majorité des anticorps isolés possède une forte affinité apparente pour les protéines d'intérêt.

IgG Anti-PcrV	EC50 PcrV ( $\mu\text{g/mL}$ )
S4P5B3	0,02
S4P3D6	0,05
S1P3G9	0,13
S4P5E10	0,03

IgG anti-PscF	EC50 PscF ( $\mu\text{g/mL}$ )
S3P1D5	0,18
S3P1B7	0,07
S3P1B4	0,24
S3P1F5	4,65
S4P3B9	4,22
S4P3G6	1,28
S4P3G7	10,61
S3P1D7	1,63
S4P5G10	0,02
S4P3G2	2,08
S4P5D5	0,39
S3P1D6	0,51
S3P1D8	0,03
S4P5C4	10,89

**Figure 36 : Tableau récapitulatif de l'EC50 des anticorps monoclonaux humains recombinants isolés.** Les « effective dilution 50 » (ED50) ont été calculées à partir des données brutes d'ELISA direct sélectionnées (Absorbance) après normalisation en utilisant la fonction de régression non-linéaire « log inhibitor versus normalised response » de GraphPad Prism (version 9).

### Alignement des séquences de chaînes d'immunoglobulines sur IMGT

Les familles des gènes d'immunoglobulines des régions V et J ainsi que les pourcentages d'identité de ces gènes avec la lignée germinale correspondante ont été récapitulés (Figure 37). La diversité des familles des gènes de chaînes lourdes et légères ne semble pas montrer d'enrichissement particulier vis-à-vis d'une famille de gène de chaînes d'immunoglobulines, que ce soit pour les anticorps anti-PcrV ou anti-PscF.



De façon intéressante, on observe un pourcentage d'identité des régions V supérieur à 90% pour la majorité des anticorps anti-PcrV excepté pour S4P5E10 (88% et de régions J de 74%) (Figure 37).

De même, les anticorps anti-PscF montrent un pourcentage d'identité des régions V et J des chaînes lourdes supérieur à 90% excepté les anticorps S3P1D5, S3P1F5, S4P3G7 et S4P5G10 (Figure 37). Les chaînes légères des anticorps anti-PscF sont quant à elles relativement peu mutées comme le montrent les pourcentages d'identité des régions V et J supérieurs à 90% (Figure 37).

Ces données suggèrent que dans l'ensemble les anticorps spécifiques de PscF et PcrV isolés possèdent un assez faible niveau de mutations par rapport à la lignée germinale.

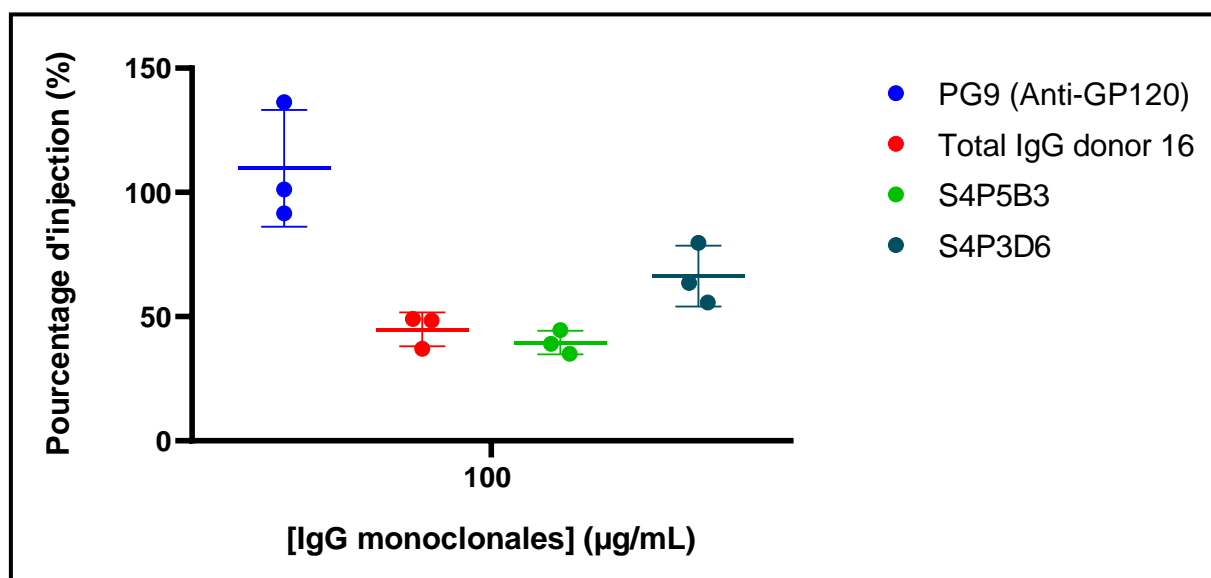
Anti-PcrV	Chaîne Lourde	Gène et allèle V	Gène et allèle J	Identité Région V (%)	Identité Région J (%)
	S1P3G9Hc	IGHV4-61*08	IGHJ6*02	92,44	91,94
	S4P3D6Hc	IGHV3-23*01	IGHJ4*02	92,7	89,58
	S4P5B3Hc	IGHV3-74*01	IGHJ3*02	96,88	94
	S4P5E10Hc	IGHV3-21*01	IGHJ6*02	88,42	74,2
	Chaîne légère	Gène et allèle V	Gène et allèle J	Identité Région V (%)	Identité Région J (%)
	S1P3G9kc	IGKV3-20*01	IGKJ3*01	94,68	100
	S4P3D6kc	IGKV1-8*01	IGKJ4*01	96,41	97,37
	S4P5B3kc	IGLV3-25*03	IGLJ2*01	96,1	100
S4P5E10kc	IGKV4-1*01	IGKJ4*01	95	100	

Anti-PscF	Chaîne Lourde	Gène et allèle V	Gène et allèle J	Identité Région V (%)	Identité Région J (%)
	S3P1B7Hc	IGHV3-23*01	IGHJ4*02	97,22	91,67
	S3P1D5Hc	IGHV4-61*02	IGHJ6*02	83,85	80,65
	S3P1B4Hc	IGHV3-23*01	IGHJ6*02	95,14	83,87
	S3P1F5Hc	IGHV3-23*01	IGHJ6*02	77,86	83,87
	S3P1D7Hc	IGHV3-23*01	IGHJ4*02	96,87	93,75
	S4P3B9Hc	IGHV3-66*01	IGHJ4*02	92,63	91,67
	S4P3G2Hc	IGHV4-61*02	IGHJ4*02	91,4	93,75
	S4P3G6Hc	IGHV3-23*01	IGHJ6*02	98,61	85,48
	S4P3G7Hc	IGHV3-72*01	IGHJ3*01	86,39	88
	S4P5C4Hc	IGHV3-48*04	IGHJ6*02	90,87	83,61
	S4P5D5Hc	IGHV3-23*01	IGHJ4*02	96,52	93,75
	S4P5G10Hc	IGHV4-34*01	IGHJ6*02	91,22	77,42
	S3P1D6Hc	IGHV3-23*04	IGHJ3*02	94,68	94,87
	S3P1D8Hc	IGHV3-30*02	IGHJ4*02	90,62	81,25
	Chaîne légère	Gène et allèle V	Gène et allèle J	Identité Région V (%)	Identité Région J (%)
	S3P1B7kc	IGKV1-16*02	IGKJ2*01	97,13	97,14
	S3P1D5kc	IGKV2-28*01	IGKJ3*01	94,22	100
	S3P1B4kc	IGKV3-20*01	IGKJ1*01	95,04	97,14
	S3P1F5kc	IGKV2-28*01	IGKJ2*01	95,58	89,47
	S3P1D7kc	IGLV3-21*02	IGLJ2*01	98,56	97,37
	S4P3B9kc	IGKV3-20*01	IGKJ1*01	94,32	94,44
	S4P3G2kc	IGLV2-8*01	IGLJ2*01	94,79	88,57
	S4P3G6kc	IGKV3-20*01	IGKJ2*01	99,6	89,74
	S4P3G7kc	IGLV1-51*01	IGLJ2*01	88	91,67
	S4P5C4kc	IGKV4-1*01	IGKJ3*01	95,95	94,74
	S4P5D5kc	IGKV1-16*01	IGKJ2*01	98,2	94,29
S4P5G10kc	IGLV1-47*01	IGLJ2*01	94,73	91,67	
S3P1D6kc	IGKV3-20*01	IGKJ2*01	94,68	94,87	
S3P1D8kc	IGKV1-39*01	IGKJ1*01	93,9	94,74	

**Figure 37** : Tableau récapitulatif des familles des chaînes lourde et légère des anticorps monoclonaux anti-PcrV et anti-PscF putatifs. Le pourcentage d'homologie est calculé en nucléotides.

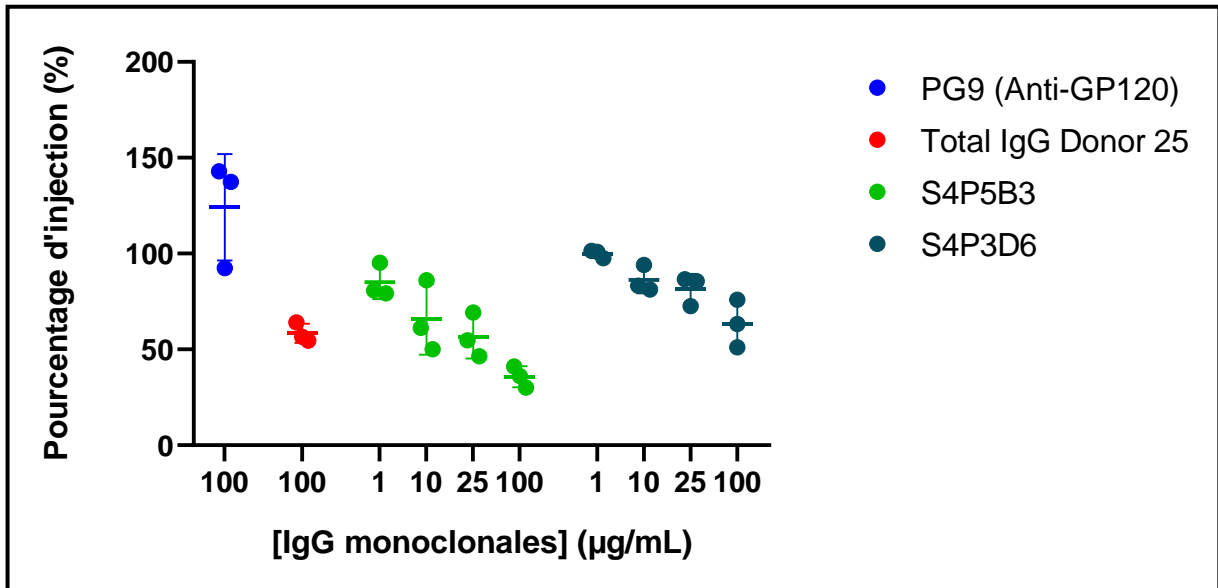
## Criblage fonctionnel des anticorps monoclonaux

Les anticorps positifs en ELISA pour PscF ou PcrV a ensuite été criblés à la concentration unique de 100 µg/mL pour tester la capacité d'inhibition de l'injection d'ExoS. Lors du criblage préliminaire, les anticorps anti-PcrV putatifs S4P5B3 et S4P3D6 ont montré une activité inhibitrice de l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules A549. L'anticorps S4P5B3 neutralisait environ 60% de l'injection de la toxine alors que l'anticorps S4P3D6 semblait avoir une activité légèrement inférieure avec une neutralisation d'environ 40% (Figure 38). De façon surprenante, les anticorps anti-PscF, bien qu'en plus grand nombre, n'ont pas montré d'efficacité fonctionnelle significative dans nos expériences (**données non-montrées**).



**Figure 38 :** Criblage fonctionnel préliminaire d'anticorps monoclonaux anti-PcrV par test d'inhibition de l'injection de ExoS-Bla par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla . Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées représentent le rapport moyen de fluorescence 460nm/538nm normalisé de triplicat (n=1).

Afin de vérifier la présence d'un effet-dose des anticorps anti-PcrV dans le test d'inhibition de l'injection de ExoS-Bla par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla, l'expérience a été reconduite en utilisant des concentrations croissantes d'anticorps jusqu'à 100 µg/mL (Figure 39).



**Figure 39 : Criblage fonctionnel d'anticorps monoclonaux anti-PcrV par test d'inhibition de l'injection de ExoS-Bla par la souche CHAdeltaExoSattB :: exoS-bla.** Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées représentent le rapport de fluorescence 460nm/538nm normalisé de triplicat (n=1).

Les deux anticorps ont montré un effet dépendant de la dose, l'anticorps S4P5B3 a montré une efficacité fonctionnelle allant de 60% d'inhibition à 100 µg/mL jusqu'à environ 15% à 1 µg/mL (Figure 39). L'efficacité du S4P3D6 était légèrement plus faible avec environ 40% d'inhibition à 100 µg/mL ce qui est cohérent avec les précédentes observations (Figure 38) et l'effet était perdu à 1 µg/mL. Ces expériences seront reproduites afin d'obtenir des résultats plus robustes et de calculer des valeurs statistiques.

Les tests d'inhibition suggèrent donc que les deux anticorps anti-PcrV S4P5B3 et S4P3D6 reconnaissent un épitope neutralisant sur PcrV et sont capables d'inhiber la translocation d'ExoS-Bla dépendante du SSTIII.

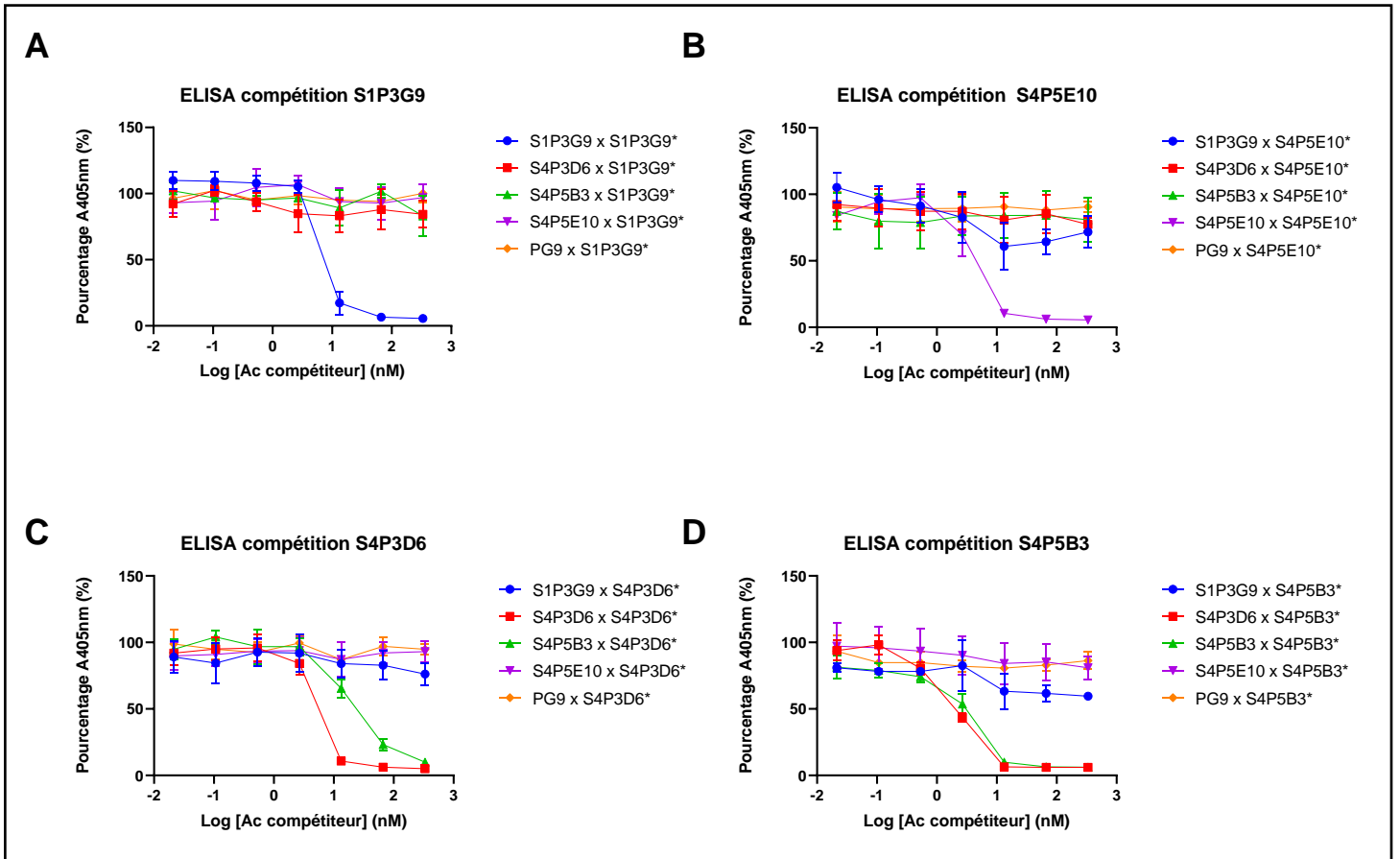
## Caractérisation des anticorps monoclonaux fonctionnels anti-PcrV isolés

### 1.9 Cartographie des épitopes par ELISA de compétition

Dans le but d'obtenir des informations préliminaires sur les épitopes reconnus en particulier par les 2 anticorps inhibiteurs du SSTIII, des ELISA par compétitions ont été réalisés. Chacun des 4 anticorps anti-PcrV a été mis en compétition avec chacun des trois autres pour l'interaction avec His-PcrV. Différentes concentrations d'anticorps compétiteurs ont été d'abord incubées avec His-PcrV, puis l'anticorps biotinylé a été rajouté à une concentration correspondant à son ED70. L'absorbance observée correspond au signal de l'anticorps biotinylé. En cas de compétition, une diminution de l'absorbance de l'anticorps biotinylé est attendue. L'anticorps monoclonal anti-G120 PG9 a été utilisé comme compétiteur pour fournir un contrôle négatif de compétition (Figure 40A, B, C et D). Le signal observé avec les anticorps S1P3G9\* et S4P5E10\* n'a pas montré de diminution avec aucun des anticorps compétiteurs testés excepté eux-mêmes (Figures 40A et 40B). De même, ces anticorps lorsqu'utilisés comme compétiteurs n'ont diminué le signal donné par aucun des autres anticorps qu'eux-mêmes (Figure 40 A, B, C, et D). Ces résultats indiquent que S1P3G9 et S4P5E10 n'entrent en compétition avec aucun des autres anticorps testés et reconnaissent des épitopes différents de ceux de tous les autres anticorps. En revanche, une compétition a été mise en évidence entre les anticorps S4P5B3 et S4P3D6. Ainsi, lorsque l'anticorps S4P5B3 a été utilisé comme compétiteur contre S4P3D6\*, une diminution du signal dépendante de la concentration a été observée indiquant une compétition entre les deux anticorps pour l'interaction avec PcrV (Figure 40 D). De même, lorsque le S4P3D6 est utilisé comme compétiteur contre S4P5B3\*, une diminution, bien qu'inférieure au cas précédent, est observée (Figure 40C). Ces résultats indiquent que les anticorps S4P3D6 et le S4P5B3 interagissent avec la même région de PcrV. A noter, la compétition est plus importante pour la combinaison S4P3D6-S4P5B3\* comparée au couple S4P5B3-S4P3D6\*. Un  $k_{off}$ , soit la constante de dissociation d'un complexe formé par deux protéines, plus long de S4P5B3 pourrait éventuellement expliquer cette différence, en effet la durée de dissociation du

complexe S4P5B3-PcrV plus longue réduirait les possibilités d'interaction entre S4P3D6 et PcrV.

Au total, 3 régions différentes sont reconnues par les 4 anticorps. Les 2 anticorps avec une activité d'inhibition du SSTIII semblent reconnaître une même région.



**Figure 40** : ELISA par compétition entre les anticorps monoclonaux humains anti-PcrV. **A)** ELISA par compétition entre S1P3G9 biotinylé et les autres anticorps anti-PcrV compétiteurs. **B)** ELISA par compétition entre S4P5E10 biotinylé et les autres anticorps anti-PcrV compétiteurs. **C)** ELISA par compétition entre S4P3D6 biotinylé et les autres anticorps anti-PcrV compétiteurs. **D)** ELISA par compétition entre S4P5B3 biotinylé et les autres anticorps anti-PcrV compétiteurs. Les valeurs d'absorbance ont été normalisées avec la moyenne de valeur d'absorbance de l'anticorps biotinylé à l'ED70. Les données représentent les données de 3 expériences indépendantes (n=3).

### 1.10 Reconnaissance par S4P5B3 et S4P3D6 de variants de PcrV.

Afin de déterminer si les épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux fonctionnels S4P5B3 et S4P3D6 sont conservés parmi les variants de *P. aeruginosa*, l'efficacité fonctionnelle de ces derniers contre des variants de PcrV exprimés par différentes souches

a été évaluée. Pour cela, différentes souches CHAΔpcrV :: miniCTXexoS-bla porteuses d'un plasmide codant pour différents variants (V1, V2, V3, V4 et V5) ont été utilisées en test d'injection d'ExoS.

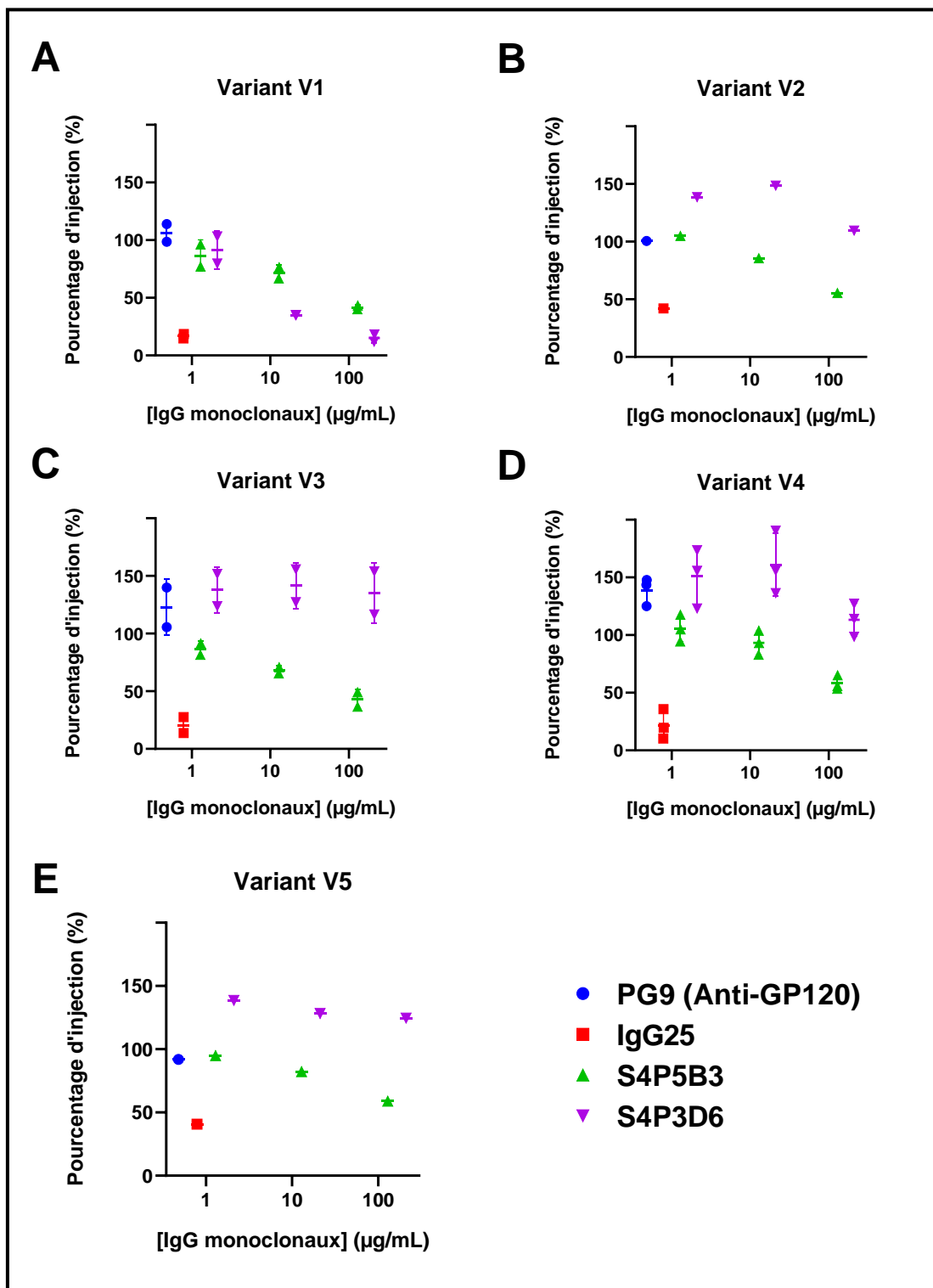
Les différents variants de PcrV ont été sélectionnés pour leur prévalence parmi 913 isolats cliniques de *P. aeruginosa* séquencés par Tabor et collègues (TABOR et al, 2018). En effet, les 5 variants sélectionnés sont présents dans 82,3% des isolats étudiés (Tabor et al, 2018). La séquence de PcrV de PAO1 (V1) a été utilisée comme référence. Les mutations définissant les différents variants ainsi que leur prévalence parmi les isolats cliniques selon les données de Tabor et al sont présentés en Figure 41.

Variant	Variation d'acides aminés	Prévalence des isolats cliniques (%)
V1	/	47,8
V2	L6F, A9G, S21P, 225R	15,6
V3	L6F, S21P, S225K	6,9
V4	S225R	6,5
V5	L6F, A9G, S21P, 225K	5,5

**Figure 41 : Tableau comparatif des variants de PcrV utilisés.** Les pourcentages présentés sont issus de l'analyse de séquences de 913 isolats cliniques (Tabor et al, 2018).

Le variant V4 correspond au variant de PcrV exprimé par la souche CHA qui a été utilisée pour le criblage fonctionnel initial des anticorps. Cette souche a été considérée comme la souche de référence dans ces expériences. Pour chacun des variants testés, l'anticorps monoclonal S4P5B3 neutralise l'injection d'ExoS (Figures 42 A-E) avec une efficacité variant de 40 à 60% d'inhibition à la concentration de 100 µg/mL. De façon cohérente avec les précédentes observations, une efficacité dépendante de la dose est observée (Figure 42 D). De façon surprenante, l'anticorps monoclonal S4P3D6 n'a pas d'effet sur l'injection aux concentrations testées sur les variants V2, V3, V4 et V5 (Figures 42 B-E).

Cependant, cet anticorps montre un fort effet dose-réponse sur le variant V1 avec une inhibition allant jusqu'à 90% à 100 µg/mL ce qui est cohérent avec le fait que le PcrV recombinant de V1 ait été utilisé pour son isolement.



**Figure 42 : Criblage fonctionnel d'anticorps monoclonaux anti-PcrV contre différents variants de PcrV.**

**A)** Test d'inhibition d'injection de la souche CHA exprimant le variant V1 de PcrV. **B)** Test d'inhibition d'injection de la souche CHA exprimant le variant V2 de PcrV **C)** Test d'inhibition d'injection de la souche CHA exprimant le variant V3 de PcrV **D)** Test d'inhibition d'injection de la souche CHA exprimant le variant V4 de PcrV **E)** Test d'inhibition d'injection de la souche CHA exprimant le variant V5 de PcrV. Les données ont été normalisées sur la base des rapports de fluorescence 460nm/538nm des conditions des cellules A549 en présence (100% d'infection) et en l'absence (0% d'infection) de bactéries au multiple d'infection de 5. Les données présentées pour le variant V4 représentent les moyennes de rapport de fluorescence 460nm/538nm normalisé réalisé en triplicat (n=3). Les données présentées pour le variant V1 et V3 sont les moyennes de rapport de fluorescence 460nm/538nm normalisé réalisé en triplicat (n=2). Les données présentées pour le variant V2 et V5 sont les moyennes de rapport de fluorescence 460nm/538nm normalisé réalisé en triplicat (n=1). Ces expériences ont été réalisées par François Cretin de l'équipe PBRC de l'IBS de Grenoble.

La forte neutralisation de l'activité d'injection de la souche exprimant le variant V1 par S4P3D6 suggère que la présence d'une sérine en position 225 de la protéine favorise la fixation de cet anticorps. De façon surprenante, cet anticorps n'a montré aucun effet sur le variant V4 (CHA) dans ces dernières expériences contrairement au faible effet observé lors du criblage initial de cet anticorps (Figure 38 et 39). Des réplicats de ces expériences seront effectués afin d'éclaircir ce point.

L'anticorps S4P5B3 ne semble pas affecté par les variations testées de résidus aux positions 6, 9, 21 et 225 de PcrV, suggérant que celles-ci ne modifient pas sa reconnaissance. Ces expériences seront également répliquées afin de s'assurer que les résultats sont robustes et statistiquement significatifs.

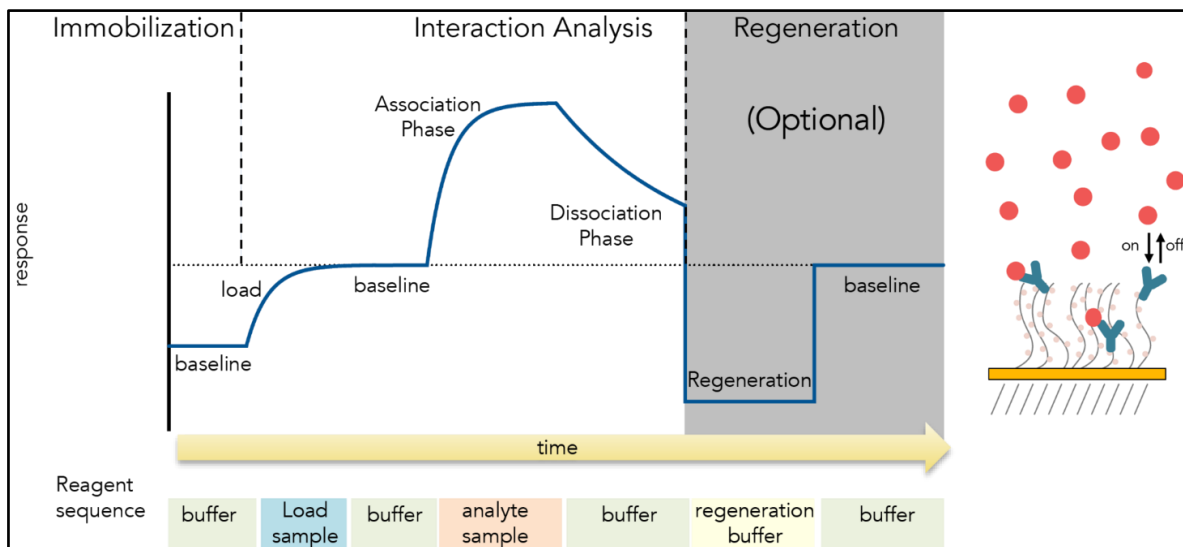
### **1.11 Mesure de l'affinité par Bio-layer interferometry (BLI)**

La technique bio-layer interferometry (BLI) est une technique optique permettant de mesurer la cinétique et l'affinité de l'interaction entre deux macromolécules (CONCEPCION et al, 2009). Pour cela, une des deux molécules partenaires est préalablement immobilisée sur un biocapteur qui est mis en contact avec l'analyte en solution. L'interaction entre les deux molécules va produire une couche optique formée de deux surfaces distinctes, celle de la molécule immobilisée et celle du complexe formé par la molécule immobilisée en interaction avec l'analyte. Les différences de réflexion de la lumière blanche sur ces deux surfaces vont produire des décalages de longueur d'ondes qui sont directement associés à l'épaisseur de la couche formée par les deux surfaces précédemment décrites. Cela permet de mesurer en temps réel les changements d'épaisseur et donc l'interaction entre les deux molécules. Une expérience de BLI se compose de plusieurs étapes : la capture sur le biocapteur de l'échantillon à immobiliser suivi d'un lavage afin d'obtenir une ligne de base, une phase d'association entre l'échantillon immobilisé et l'analyte, et enfin une phase de dissociation (Figure 43). Les phases d'association et de dissociation permettent de mesurer la constante cinétique d'association ( $k_{on}$  ou  $k_a$ ) et la constante cinétique de dissociation ( $k_{off}$  ou  $k_d$ ). Le rapport de la constante cinétique de dissociation sur la constante cinétique d'association permet d'obtenir la constante de dissociation ( $K_D$ ).



Ces données sont ensuite analysées selon un modèle d'interaction bivalent dans le cas d'un anticorps, cette molécule possédant 2 parties Fab capables de se lier à la protéine ou monovalent dans le cas de l'étude d'une interaction Fab-Protéine.

Pour notre étude, la protéine His-PcrV-Avitag biotinylée a été immobilisée sur des biocapteurs conjugués avec de la streptavidine. Chaque biocapteur ainsi fonctionnalisé a été incubé avec différentes concentrations des anticorps S4P5B3 et S4P3D6 (0-200 nM) et de fragment Fab S4P5B3fab (0-3200 nM).



**Figure 43 : Représentation schématique d'une cinétique d'interaction entre une protéine immobilisée et un analyte.** Une cinétique d'interaction mesurée en BLI comprend l'immobilisation de l'échantillon suivi d'un lavage permettant l'acquisition d'une ligne de base. Ensuite la protéine immobilisée est mise en contact avec l'analyte résultant en une phase d'association puis de dissociation. Il est possible de procéder à une étape de régénération où les analytes sont dissociés de la protéine immobilisée pour procéder à une seconde mesure.

Chaque mesure cinétique a été effectuée en duplicats. Pour l'interaction anticorps-PcrV, les données ont été traitées en appliquant un modèle bivalent 1-2. L'anticorps S4P5B3 a un  $k_d$  extrêmement lent se situant à la limite de détection de l'instrument ( $1.0E-7$ ) (Figure 44). Ceci pourrait expliquer l'erreur importante observée dans sa détermination et donc celle du  $K_D$ . Le  $K_D$  estimé est inférieur au nM, indiquant une interaction S4P5B3-PcrV de très forte affinité.

Le  $K_D$  de l'anticorps S4P3D6 est plus élevé que celui de S4P5B3 et a pu être mesuré avec une plus grande précision. L'affinité de cet anticorps est de l'ordre de 0,75 nM (S.D.= $1,9E-2$  nM) (Figure 44).

Le modèle monovalent 1 :1 a été appliqué pour analyser les données, une interaction Fab : antigène étant attendue.

Le S4P5B3fab possède une affinité plus faible que l'anticorps complet avec un  $K_D$  mesuré de 91 nM (Figure 44). Cette différence est due à une plus forte avidité de l'interaction divalente de l'anticorps avec l'antigène.

Ces expériences ont été menées avec l'aide et la participation de Jean-Baptiste Reiser du groupe CAID de l'IBS de Grenoble.

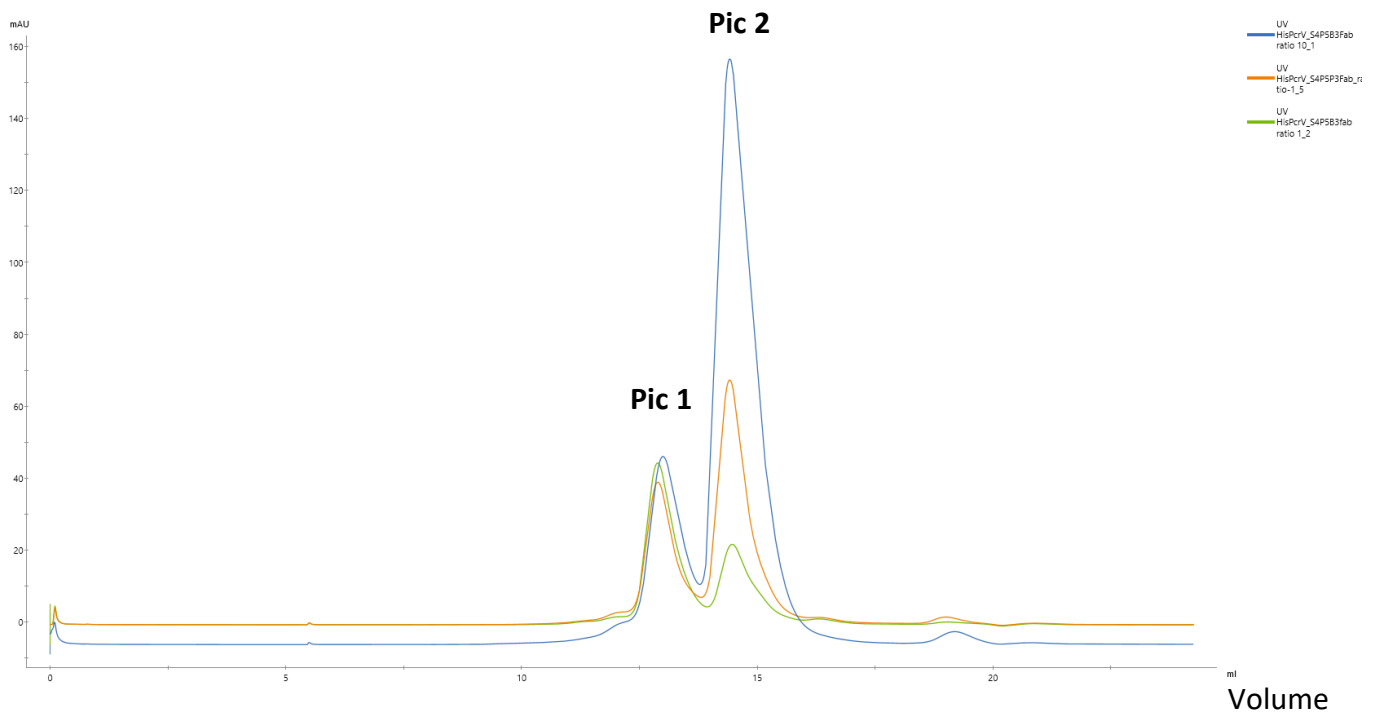
Sensor	Ligand	Analyte	Conc.	Replicate	$KD (M)$	$ka (1/Ms)$	$ka2$	$kdis (1/s)$	$kdis2$	$Rmax$	$Full X^2$	$Full R^2$
SAX	His-PcrV-AviTag	S4P5B3	0-200 nM	Mean	2,4E-11	3,6E+04	1,2E+00	9,3E-07	3,2E-01	4,75	1,0765	0,9998
				SD	n.d.	3,8E+03	2,0E-01	n.d.	5,0E-02			
		S4P5D6	0-200 nM	Mean	7,5E-10	6,2E+04	4,1E-01	4,6E-05	1,2E-02	7,91	4,6091	0,9997
				SD	1,9E-11	1,6E+02	2,4E-01	1,3E-06	6,0E-03			
		S4P5B3-Fab	0-3200 nM	Mean	9,1E-08	2,0E+03		1,9E-04		1,26	2,6003	0,9995
				SD	3,0E-09	2,4E+01		3,8E-06				

**Figure 44 : Calcul de l'affinité des anticorps et fragment Fab.** Les expériences ont été menées en duplicats. Le  $K_D$  communiqué correspond à la moyenne des  $KD$  mesurés sur deux expériences indépendantes.

### 1.12 Purification du complexe His-PcrV/S4P5B3Fab

Dans le but d'obtenir des complexes PcrV/Fab homogènes visant à être cristallisés, les protéines S4P5B3Fab et His-PcrV ont été incubées selon plusieurs ratios molaires Fab : protéine (1 :2, 1 :5 et 1 :10) et les échantillons ont été séparés par chromatographie d'exclusion de taille. Les tailles de la protéine et du Fab étant proches (34,4 kDa et 50 kDa, respectivement), la protéine PcrV a été mise en excès. Ainsi, la différence plus marquée entre 84,4 kDa correspondant au complexe et 50 kDa correspondant à His-PcrV attendue serait plus aisée à séparer par chromatographie d'exclusion de taille. Les profils d'élutions correspondant aux ratios testés montrent la présence de deux pics distincts. L'intensité relative du premier pic ne semble pas varier entre les ratios contrairement au second (Figure 45).

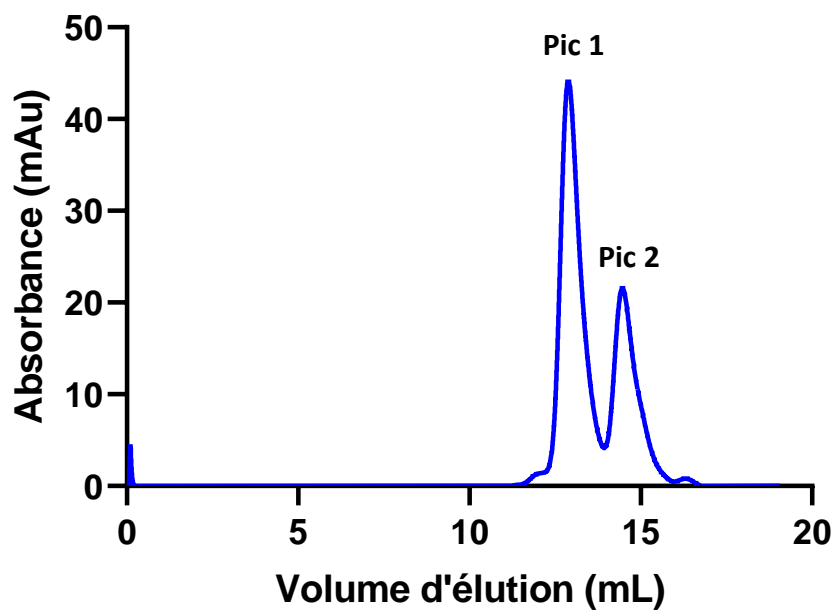
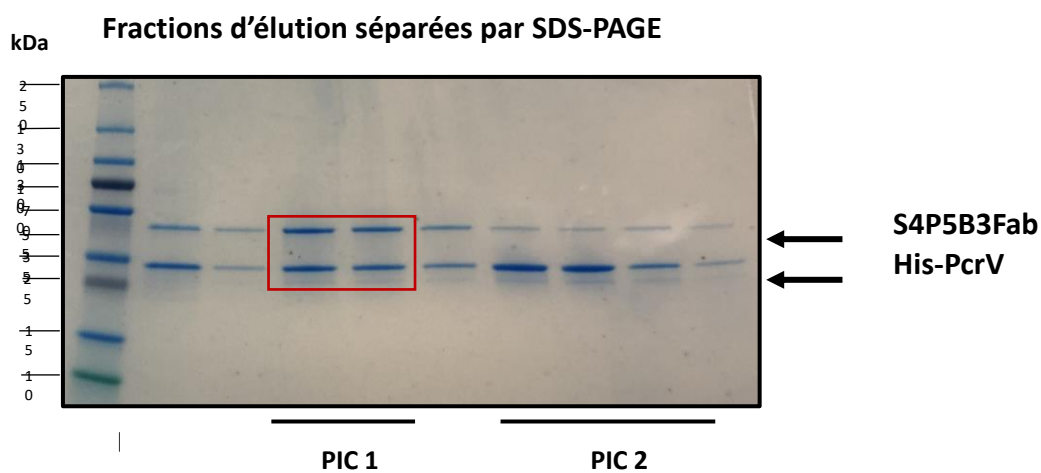
## Absorbance



**Figure 45 : Comparaison des profils d'éluion du complexe S4P5B3Fab\_His-PcrV selon différents ratios molaires.** Le ratio molaire Fab :PcrV de 1 :2 est indiqué en vert, celui de 1 :5 en orange et celui de 1 :10 en bleu.

L'analyse par SDS-PAGE a mis en évidence la présence des deux protéines dans chacun des pics.

Cependant, la stœchiométrie du premier semble s'approcher du 1 :1 alors que PcrV est retrouvée en excès dans le second (Figure 46B). L'absence de différence d'intensité du pic 1 entre les différents ratios a mené au choix du ratio 1 :2. Ces résultats suggèrent que ce ratio est suffisant pour atteindre un équilibre où tous les complexes possibles sont formés.

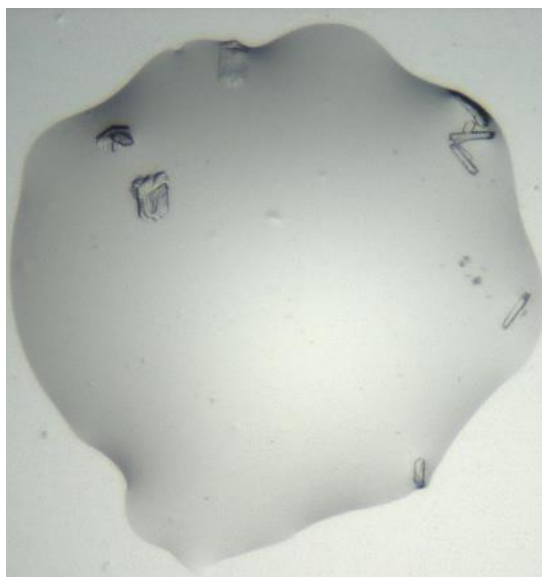
**A****Profil d'élution du complexe His-PcrV\_S4P5B3fab****B**

**Figure 46 : Purification du complexe S4P5B3fab\_His-PcrV par chromatographie d'exclusion de taille. A) Profil d'élution de chromatographie d'exclusion de taille du complexe S4P5B3fab\_His-PcrV. B) Analyse par SDS-PAGE (4-20%) des fractions d'élutions de la chromatographie d'exclusion de taille.**

## Essai de cristallisation du complexe S4P5B3 His-PcrV

Dans le but d'obtenir la structure du complexe S4P5B3fab\_His-PcrV pour identifier les épitopes de la protéine reconnus par l'anticorps et d'élucider le mécanisme d'inhibition du SSTIII, des essais de cristallisation ont été entrepris avec la technique de diffusion de vapeur. Un échantillon correspondant au pic 1 obtenu en CET (Figure 46B) comportant des complexes 1 :1 aux concentrations de 7 mg/mL, 4 mg/mL et 1 mg/mL a été envoyé à la plateforme HTX.

Le criblage de conditions de cristallisation par la plateforme HTX de l'ISBG a permis l'obtention de cristaux pour l'échantillon à 7 mg/mL avec la condition suivante : 0,14 M chlorure de calcium dihydrate, 0,1 M acétate de sodium pH 4,6, 14% 2-propanol et 30% glycérol à 20°C avec un ratio protéine : précipitant de 1 (Figure 47). Les cristaux ont ensuite été récoltés par le robot de récolte CrystalDirect disponible à la plateforme et testés pour leur diffraction aux rayons X. Cependant, aucune diffraction n'a été détectée. Des essais plus poussés seront prochainement effectués au laboratoire afin de tester de nouvelles conditions de cristallisation.



**Figure 47 : Photographie des cristaux obtenus à la suite du criblage par la plateforme HTX.** Les cristaux ont été obtenus dans 0,14M chlorure de calcium dihydrate, 0,1M acétate de sodium pH 4,6, 14% 2-propanol et 30% glycérol. Le ratio protéine : précipitant utilisé est de 1.

## Discussion et perspectives

### Réponses anticorps anti-PcrV et anti-PscF chez les sujets infectés par *P.aeruginosa*.

Dans cette étude, nous avons étudié la réponse d'anticorps contre le SSTIII de *P.aeruginosa* chez des patients atteints d'infections aiguës et chroniques. Le consensus actuel concernant la dynamique d'expression du SSTIII chez *P.aeruginosa* suggère que ce système est exprimé lors de la phase aiguë de l'infection et que son expression est réprimée lors d'établissement de l'infection chronique (ROY-BURMAN et al, 2001) (JAIN et al, 2004) (LEE et al, 2005). Des études ont cependant montré la présence d'anticorps anti-PcrV chez des patients atteints d'infections aiguës et chroniques du tractus respiratoire (NAGAOKA et al, 2019) et des patients atteints de mucoviscidose infectés chroniquement par *P.aeruginosa* (MOSS et al, 2001) (MILAGRES et al, 2006). La détection de ces anticorps anti-PcrV chez les patients atteints d'infections chroniques suggère tout de même une expression de la protéine à un niveau et pendant une durée suffisante pour le développement d'une réponse humorale (MILAGRES et al, 2006) (MOSS et al, 2001). Une réponse humorale contre PscF chez des patients atteints d'infections aiguës ou chroniques à *P.aeruginosa* n'a quant à elle pas été documentée à ce jour à notre connaissance.

Dans notre étude, les sérums de patients atteints d'infections aiguës que nous avons criblés n'ont pas révélé de titre significatif contre aucune des protéines testées, contrairement à l'étude de NAGAOKA et collègues évoquée ci-dessus. Notre observation est néanmoins à nuancer en raison du faible nombre de sérums étudiés. Par ailleurs, il est possible que le traitement antibiotique reçu par les patients de notre cohorte ait eu un impact sur la charge bactérienne et, par conséquent, sur la mise en place de la réponse humorale. Le temps restreint entre l'infection supposée et le prélèvement des sérums était peut-être aussi insuffisant pour le développement de titres importants contre ces protéines.

Néanmoins, nous avons pu montrer qu'une fraction significative des patients atteints de mucoviscidose inclus dans notre étude possédait bien dans leur sérum des anticorps anti-PcrV, mais aussi anti-PscF.

La réponse anticorps anti-PscF s'est d'ailleurs montrée prépondérante chez les patients étudiés comme l'indiquent à la fois le plus grand nombre de donneurs possédant des anticorps anti-PscF et le fait que les titres en anti-PscF semblaient plus élevés que ceux mesurés contre PcrV. Nos résultats suggèrent donc qu'une réponse anti-PscF est commune chez les patients atteints de mucoviscidose et infectés chroniquement par *P.aeruginosa*. Ces résultats indiquent qu'une expression du SSTIII chez ces patients existe, au moins à un niveau et pendant un temps suffisant pour stimuler une réponse anticorps.

Notre étude a ensuite montré que parmi les huit sérums testés en test fonctionnel, seuls trois (donneurs 12, 16 et 25) possédaient des anticorps capables de neutraliser l'activité du SSTIII dans un modèle cellulaire, suggérant que le développement d'anticorps capables de bloquer le SSTIII est relativement rare chez les sujets atteints de mucoviscidose. Cependant, les criblages fonctionnels ont été effectués en utilisant la souche CHA de *P.aeruginosa* qui n'était pas la même souche que celle qui a infecté les patients. Des différences de séquence entre les protéines PcrV et PscF de CHA et de la souche du patient pourraient donc également expliquer une absence d'efficacité fonctionnelle des anticorps de certains sujets. À noter également, concernant les donneurs dont les sérums n'ont pas été testés en test fonctionnel, il est difficile de conclure de façon définitive sur la capacité de leurs anticorps à inhiber le SSTIII. En effet, nous avons sélectionné pour les tests fonctionnels uniquement les donneurs démontrant une réactivité contre PcrV ou PscF en ELISA. Nous ne pouvons pas exclure que le sérum des donneurs non sélectionnés pouvait inhiber le SSTIII via des anticorps dirigés contre d'autres protéines du SSTIII (comme par exemple PopB/D).

### **Isolement d'anticorps monoclonaux spécifiques de PcrV et PscF.**

Notre but a été ensuite de sélectionner des sujets pour notre approche d'isolement d'anticorps monoclonaux dirigés contre PcrV et PscF. Des expériences de déplétion en anticorps anti-PcrV et/ou anti-PscF ont permis de déterminer quels donneurs possédaient des anticorps fonctionnels spécifiques de ces protéines.

Concernant le donneur 12, les résultats n'ont pas permis de conclure sur la présence ou l'absence d'anticorps dirigés contre ces protéines et capables d'inhibition.

Nos résultats ont en revanche montré que la déplétion des anticorps spécifiques de PscF recombinant diminuait l'efficacité des IgG polyclonales du donneur 16. Cela a indiqué que ce donneur possède des anticorps anti-PscF fonctionnels qui reconnaissent la protéine recombinante, mais aussi (de façon importante pour notre approche) son équivalent natif, confirmant ainsi la perspective d'isolement de ces anticorps via des stratégies de tri cellulaire avec cette protéine comme appât. De même, la réduction de l'efficacité des IgG polyclonales du donneur 25 après double déplétion par PcrV et PscF suggère les mêmes implications, mais cette fois pour les deux protéines.

Il faut noter que les formes recombinantes des protéines PcrV et PscF ne récapitulent pas nécessairement la conformation physiologique des protéines exprimées à la surface des bactéries et leur seule utilisation constitue un biais pour la sélection des donneurs et l'isolement d'anticorps spécifiques. En prenant en compte ce biais, on peut faire l'hypothèse que les expériences de déplétion basées sur l'emploi des protéines recombinantes n'aient pas parfois (comme dans le cas du donneur 12) affecté l'activité fonctionnelle des IgG malgré la présence d'anticorps fonctionnels spécifiques de PcrV ou PscF. Ces anticorps fonctionnels putatifs seraient hors d'atteinte de notre approche car non-capturable par nos appâts recombinants.

Les donneurs 16 et 25 ont donc été sélectionnés pour l'isolement d'anticorps anti-PscF et anti-PcrV via le tri de cellules B mémoire IgG+ spécifiques. Nos travaux ont donc permis la production d'un panel de 18 anticorps monoclonaux humains, dont 14 spécifiques de PscF et 3 spécifiques de PcrV provenant du donneur 25 et 1 spécifique de PcrV provenant du donneur 16. Le faible nombre d'anticorps isolés à partir du donneur 16 est en partie lié aux difficultés techniques et au manque d'optimisation du 1<sup>er</sup> tri qui avait été effectué avec les cellules de ce donneur. Dans le cas du donneur 25, la fréquence de lymphocytes B mémoire spécifiques de PscF recombinant a été supérieure à celle des lymphocytes B mémoire spécifiques de PcrV recombinant.



## **Les anticorps monoclonaux anti-PscF.**

Bien que nous ayons pu isoler un nombre relativement élevé d'anticorps anti-PscF recombinants à partir de ces cellules, aucune efficacité fonctionnelle n'a été observée pour ces derniers. Cependant, les expériences de déplétion sur les IgG du donneur 25 suggèrent bien que des anticorps fonctionnels sont capturables par PscF recombinant. Alors pourquoi n'avons-nous pas isolé ces anticorps ?

Deux hypothèses peuvent être avancées : i) ce pourrait être une question de nombre et de probabilité : un très faible nombre d'anticorps fonctionnels anti-PscF seraient présents dans le répertoire anticorps des patients, obligeant à isoler une grande quantité d'anticorps monoclonaux pour avoir la chance d'en trouver un aux capacités d'inhibition du SSTIII ; ii) les anticorps dans le sérum ne sont pas le reflet du répertoire des cellules B mémoire présentes en périphérie et si des anticorps anti-PscF fonctionnels sont bien retrouvés dans le sérum, on ne les retrouve pas dans le compartiment mémoire, en tout cas chez les sujets utilisés pour notre approche. Concernant la première hypothèse, la totalité des plaques de RT-PCR obtenues lors des différents tris n'a pas encore été traitée et il persiste donc une possibilité de pouvoir isoler d'autres anticorps anti-PscF ayant une activité de blocage du SSTIII.

Pour mieux caractériser nos anticorps anti-PscF, il serait intéressant d'avoir recours à des expériences d'immunofluorescence pour obtenir des informations sur la reconnaissance de la protéine lorsqu'elle est exprimée à la surface de la bactérie. Ceci permettrait de confirmer que les anticorps se fixent sur PscF à la surface bactérienne sans en inhiber la fonction. Ces expériences sont actuellement en phase de mise au point dans le laboratoire de nos collaborateurs PBRC à l'IBS de Grenoble. De même, la caractérisation des épitopes reconnus par ces anticorps anti-PscF non-neutralisants pourrait aider à mieux comprendre, par exclusion, la nature des anticorps qui pourraient inactiver PscF. À cet égard, il serait également intéressant de comprendre si les anti-PscF isolés reconnaissent des épitopes différents. Des expériences de compétition, comme décrites pour les anticorps anti-PcrV pourront être envisagées.

Concernant les épitopes reconnus, la conformation de la protéine recombinante utilisée pour le tri pourrait aussi avoir entraîné un biais de sélection des anticorps. Il a été montré que la surexpression de PscF-His dans *E.coli* entraînait la formation de fibres d'une longueur (>1µm), bien plus grandes que celle de la structure d'origine de l'aiguille (LOMBARDI et al, 2019). Des images obtenues en microscopie électronique au laboratoire suggèrent que la position de l'étiquette 6xHis joue un rôle dans la conformation de PscF recombinant. En effet, une position de cette étiquette en carboxy-terminal mène à la formation de la fibre décrite plus haut alors que la position en amino-terminal de cette même étiquette (comme utilisé dans cette étude) forme des structures globulaires (données non montrées). La conformation fibrillaire de PscF pourrait donc éventuellement présenter des épitopes peu accessibles par notre construction actuelle, épitopes qui pourraient être impliqués dans l'inhibition de l'injection. Il serait intéressant de comparer les interactions des anticorps anti-PscF isolés avec les deux constructions afin de déterminer si ces protéines partagent ou non les épitopes de nos anticorps.

Toutes ces études pourraient ainsi mener à l'élaboration d'une construction optimisée de PscF recombinant dépourvue des épitopes non impliqués dans l'inhibition du SSTIII et permettre possiblement un isolement plus efficace d'anticorps fonctionnels anti-PscF par l'approche de tri cellulaire.

## **Les anticorps monoclonaux anti-PcrV**

### **S1P3G9 et S4P5E10 : des anticorps sans activité d'inhibition du SSTIII ?**

L'absence d'efficacité fonctionnelle des anticorps S1P3G9 et S4P5E10, qui ont une affinité forte pour PcrV, pourrait s'expliquer par i) la reconnaissance d'un épitope non-fonctionnel sur la protéine cible ; ii) la reconnaissance d'un épitope accessible sur la protéine recombinante, mais qui est non-accessible par les anticorps sur la protéine telle qu'exprimée à la surface de la bactérie. À cet égard les 2 anticorps reconnaissent des épitopes différents comme montré par les expériences de compétition.

Une cartographie de ces épitopes pourra être utile pour mieux définir par exclusion les épitopes de PcrV potentiellement intéressants d'un point de vue fonctionnel d'inhibition du SSTIII par les anticorps et pour comprendre le mécanisme.

Enfin, il faut noter que ces anticorps ont été testés en test d'injection sur la souche CHA (variant V4 de PcrV), alors que la sélection et les ELISA ont utilisé le variant PcrV V1 recombinant. Nous ne pouvons pas exclure que ces 2 anticorps soient spécifiques de V1 et incapables de se fixer à V4 et par conséquent de neutraliser la souche PAO1.

Ces anticorps seront donc prochainement testés contre la souche PAO1 porteuse du gène de fusion ExoS-Bla afin de vérifier cette hypothèse.

### **S4P5B3 et S4P3D6 : anticorps monoclonaux humains inhibiteurs du SSTIII.**

Parmi les 4 anticorps anti-PcrV isolés, S4P5B3 et S4P3D6, ont montré une capacité d'inhibition du SSTIII. Nous avons donc pu fournir une preuve de concept sur la faisabilité d'isoler des anticorps monoclonaux humains neutralisant l'injection de ExoS du SSTIII de *P.aeruginosa* à partir de sujets infectés chroniquement. A notre connaissance, il s'agit de la première description d'anticorps monoclonaux humains anti-PcrV inhibiteurs du SSTIII.

La caractérisation de ces anticorps monoclonaux a donc été priorisée dans ces travaux. Ces anticorps ont une forte affinité pour PcrV recombinant qui est de l'ordre du nM comme mesuré en BLI.

Les expériences d'ELISA en compétition ont également montré que ces anticorps interagissent avec la même région de PcrV recombinant. De façon intéressante, les résultats des tests fonctionnels avec les différents variants de PcrV ont montré que les différentes mutations de ces variants n'affectaient pas l'efficacité de l'anticorps S4P5B3. Ces variants représentent plus de 80% des isolats cliniques (TABOR et al, 2018) ce qui rend cet anticorps particulièrement intéressant dans un contexte thérapeutique. Par contre, la présence d'une sérine en position 225 de PcrV semble cruciale pour l'efficacité fonctionnelle de S4P3D6, indiquant que ce résidu fait très probablement partie de l'épitope de cet anticorps. Ces résultats couplés à ceux des ELISA en compétition montrant un probable chevauchement des épitopes de S4P5B3 et S4P3D6 suggèrent donc que ces 2 anticorps interagissent avec la région de PcrV comprenant le résidu 225.

Cependant, le fait que l'anticorps S4P3D6 ne soit pas sensible aux changements en position 225 suggère que les 2 anticorps ne partagent pas les mêmes résidus de contact, et que l'épitope de l'anticorps est plus conservé parmi les souches des *P. aeruginosa*.

La zone d'interaction du S4P5B3 et du S4P3D6 se situerait donc au niveau de la région C-terminale de PcrV. Cette région a été décrite comme requise pour l'oligomérisation de PcrV (GEBUS et al, 2008), elle-même impliquée dans le mécanisme d'injection. On pourrait supposer que le mécanisme d'action des anticorps S4P5B3 et S4P3D6 serait d'empêcher la formation d'oligomères. Cette hypothèse sera prochainement testée en étudiant la capacité de ces anticorps à empêcher la formation d'oligomères de PcrV en mesurant la taille des complexes PcrV : anticorps par SEC-MALS.

Une plus ample caractérisation des épitopes de PcrV reconnus par les anticorps monoclonaux fonctionnels par des approches de biologie structurale pourrait apporter des informations cruciales sur le mécanisme de neutralisation de l'injection de toxine par le SSTIII. Par exemple en montrant que les anticorps interagissent avec des résidus de PcrV impliqués dans l'oligomérisation (GEBUS et al, 2008). Comme décrit, des tentatives de détermination de structure des complexes PcrV-anticorps par cristallographie ont été réalisés, mais sans succès à ce jour. De nouvelles conditions sont à l'essai. Il faut noter que la taille de la protéine ne favorise pas une détermination de structure par microscopie électronique. Enfin, une meilleure connaissance des épitopes neutralisants de PcrV ouvrirait de plus la voie à des stratégies de tri plus ciblées par l'utilisation de constructions optimisées pour le tri de cellules B spécifiques.

Les 2 anticorps anti-PcrV inhibiteurs du SSTIII que nous avons isolés ont démontré leur activité *in vitro*, mais qu'en est-il de leur capacité à bloquer ce système *in vivo* et à avoir un impact sur la pathogénèse de l'infection à *P. aeruginosa* ? La prochaine étape clé de ce projet est le test de la capacité des anticorps fonctionnels à protéger de l'infection de *P.aeruginosa* dans des modèles animaux. Dans un premier temps, il est envisagé de mener ces expériences dans des modèles d'infections aiguës par *P.aeruginosa* comme par exemple la souris pour évaluer le potentiel protecteur de nos anticorps contre des doses létales de bactéries.

Le succès de ces expériences pourrait conduire à leur poursuite dans des modèles de macaques en collaboration avec Roger Legrand de l'IDMIT à Saclay. Il faudra, bien sûr prendre en compte le fait que nos anticorps monoclonaux sont humains, ce qui est un grand avantage en termes de développement comme molécules thérapeutiques, mais nécessitera des adaptations pour faire et interpréter les expériences chez l'animal.

### **Activité des anticorps monoclonaux isolés, en dehors de l'inhibition du SSTIII.**

Si uniquement deux anticorps ont démontré une activité de blocage de l'injection de toxine par le SSTIII, il est possible que certains des anticorps monoclonaux que nous avons isolés soient capables d'une activité antibactérienne via leurs fonctions effectrices. En effet les anticorps monoclonaux ont été tous produits sous la forme d'IgG1, un isotype particulièrement apte à activer le complément et à l'opsonophagocytose (ADCP). De plus, les protéines cibles PcrV et PscF sont exprimées à la surface de la bactérie et pourraient constituer des cibles idéales pour ces activités. En conséquence, il est envisagé dans le futur d'étudier notre panel d'anticorps dans des tests correspondants. Des expériences d'opsonophagocytose, consistant à mesurer la viabilité de *P.aeruginosa* en présence des phagocytes avec ou sans anticorps, pourraient fournir des informations sur la capacité de nos anticorps monoclonaux à recruter ces cellules effectrices via leur partie Fc (PASCHALL et al, 2019). De même, il serait intéressant d'étudier la capacité de nos anticorps à recruter la voie classique du complément. Pour cela, *P.aeruginosa* serait mise en contact avec les protéines du complément avec ou sans nos anticorps et la lyse des bactéries serait mesurée (DUENSING et WATSON, 2018). Montrer en particulier que nos anti-PcrV inhibiteurs du SSTIII peuvent également activer le complément ou faire de l'ADCP serait un argument supplémentaire à leur intérêt comme molécules thérapeutiques potentielles.

## **Amélioration des approches d'isolement d'anticorps inhibiteurs du SSTIII.**

Même si notre approche a été un succès par l'isolement de deux anticorps inhibiteurs du SSTIII, les résultats permettent de suggérer des améliorations possibles. Nous avons vu que l'un de nos deux anticorps actifs sur le SSTIII est sensible aux variations de séquence de PcrV entre souches. En terme clinique, un traitement devrait être préférentiellement multi-bactérien ou pan-bactérien, et il y a donc nécessité de cibler un antigène conservé entre différentes souches de bactéries pathogènes, comme semble le faire l'anticorps S4P5B3. Pour obtenir plus d'anticorps similaires à ce dernier, l'utilisation des 5 variants de PcrV pour le tri de lymphocytes B mémoire est envisageable pour des tris futurs.

Ceci optimiserait l'isolement d'anticorps fonctionnels contre un large panel de souches de *P. aeruginosa* à l'image du S4P5B3.

Comme expliqué ci-dessus, des constructions des protéines PcrV et PscF pourraient être faites dans l'avenir après caractérisation des épitopes de neutralisation, afin d'aller plus spécifiquement sélectionner les cellules B d'intérêt. Des approches permettant de masquer les épitopes non-neutralisants pourraient aussi être envisagées.

Enfin, une possibilité finale à la vue du faible nombre d'anticorps fonctionnels isolés serait de s'affranchir des limites imposées par l'utilisation d'antigènes recombinants, qui peuvent être à l'origine de ce rendement relativement médiocre. Une stratégie de tri de lymphocytes B mémoires couplée à leur activation pourrait être envisagée. Les cellules B mémoires seraient triées de façon agnostique à la fréquence d'une cellule par puits en présence d'un cocktail de cytokines et de cellules « feeder » pour induire la sécrétion d'anticorps. Les surnageants de culture contenant ces anticorps seraient ensuite directement criblés pour leurs activités fonctionnelles. Cette approche, bien que difficile à mettre en place techniquement, longue et coûteuse, offre une méthode beaucoup plus directe pour l'isolement d'anticorps fonctionnels. La quantité importante de cellules triées demande cependant la disponibilité de tests fonctionnels permettant le criblage à haut débit de très faible volume de surnageants de culture en plaques 384 puits.

## Conclusion

Cette étude a démontré la possibilité d'isoler des anticorps monoclonaux humains contre des facteurs de virulence bactériens par une stratégie de tri de lymphocytes B mémoire spécifiques d'un antigène recombinant. Un anticorps ciblant PcrV et inhibant le SSTIII a été isolé, son activité in vitro s'étend aux variants de PcrV représentés dans 80% des isolats cliniques. Les études devront maintenant dire si cet anticorps a un avenir en termes de développement vers des applications thérapeutiques. Dans le futur, l'approche que nous avons utilisée pourra permettre l'isolement d'anticorps monoclonaux humains contre un large panel de facteurs de virulences bactériens, de *P. aeruginosa*, mais aussi des autres bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Le développement et l'utilisation thérapeutique de tels anticorps, potentiellement en combinaison, pourraient être un atout de poids dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

# Annexes

Amorce	Séquence 5' => 3'	Référence
Primer Forward mutagenesis Fab Hc	CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC	Genewiz
Primer Reverse mutagenesis Fab Hc	GGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCACAAGATTTGG	Genewiz
F-Inf-pESPRIT-PscF-Avitag	TAT TTTCAGGGACGTGCGAATGGCGCAGATATTCAACCCC	Genewiz
R-Inf-pESPRIT-PscF-Avitag	ACTCCCATTTCCGGAGATCTTCTGCAGGATGCCTTGC	Genewiz
F-Inf-pESPRIT-PcrVAvitag	TATTTTCAGGGACGTGCGAATGGAAGTCAGAAACCTTAATGCCG	Genewiz
R-Inf-pESPRIT-PcrVAvitag	ACTCCCATTTCCGGAGATCGCGCTGAGAATGTCGC	Genewiz
FpET22b-PscF-Avitag-His	AGAAGGAGATATACATATGGCGCAGATATTCAACCCCAAC	Genewiz
RpET22b-PscF-Avitag-His	GGTGGTGGTGTCTCGAGTTATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGA	Genewiz

**Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour la production de protéines recombinantes et la mutagenèse lors de cette étude**

Plasmide	Expression de protéines recombinantes dans <i>E.coli</i>	Référence
pESPRIT	Expression d'une protéine avec une étiquette avitag en C-terminal	YUMEREFEND et al, 2010
pET15b	Expression d'une protéine avec une étiquette 6xHis en N-terminal	NOVAGEN
pET22b	Expression d'une protéine avec une étiquette 6xHis en C-terminal	NOVAGEN

Plasmide	Expression de protéines recombinantes dans <i>E.coli</i>	Référence
pET15b-His-PcrV	Expression inductible de PcrV avec une étiquette 6xHis en amino-terminal	PATBAC
Pet22b-PscF-His	Expression inductible codant pour la protéine PscF avec une étiquette 6xHis en C-terminal	QUINAUD et al, 2005
pESPRIT-His-PscF-Avitag	Expression inductible codant pour la protéine PscF avec une étiquette 6xHis en N-terminal et une étiquette Avitag en C-terminal	Cette étude
pESPRIT-His-PcrV-Avitag	Expression inductible de PcrV avec une étiquette 6xHis en amino-terminal et une étiquette Avitag en carboxy-terminal	Cette étude
Plasmide d'expression	Expression de variant de PcrV dans <i>P.aeruginosa</i>	Référence
pIApGpcrV variant 1	Expression du variant V1 de PcrV	PBRC
pIApGpcrV variant 2	Expression du variant V2 de PcrV	PBRC
pIApGpcrV variant 7	Expression du variant V7 de PcrV	PBRC
pIApGpcrV variant 8	Expression du variant V8 de PcrV	PBRC
pIApGpcrV variant 13	Expression du variant V13 de PcrV	PBRC

**Annexe 2 : Plasmides d'expression utilisés pour l'expression de protéines recombinantes dans *E.coli* et de variant de PcrV dans *P.aeruginosa*.**



Bactérie	Souche	Génotype	Référence
<i>P.aeruginosa</i>	CHAΔExoS :: ExoS-Bla chromosomique	Souche délétée du gène codant pour exoS et supplémenté par une insertion d'un gène de fusion exoS-β-lactamase	PBRC
	CHAΔpcrV :: miniCTX exoS-bla	Souche délétée du gène codant pour PcrV et supplémenté par une insertion d'un gène de fusion exoS-β-lactamase	PBRC

**Annexe 3 : Souches de *P.aeruginosa* utilisées lors de cette étude**

PCR1		
Chaîne lourde	5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
	5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
	5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG
	5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
	3' CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
Chaîne légère κ	5' LVK 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
	5' LVK 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
	5' LVK 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
	3' CK 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
Chaîne légère λ	5' LVL 1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG
	5' LVL 2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG
	5' LVL 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
	5' LVL 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
	5' LVL 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
	5' LVL 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
	5' LVL 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG
	3' CL	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG

**Annexe 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines lors de la 1<sup>ère</sup> étape de PCR imbriquée (TILLER et al, 2008)**

PCR2		
Chaîne lourde	5' AgeI VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
	5' AgeI VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
	5' AgeI VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
	5' AgeI VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG
	5' AgeI VH4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG
Chaîne légère κ	3' IgG (internal)	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC
	5' Pan VK	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG
	3' CK 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
Chaîne légère λ	5' AgeI VL 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5' AgeI VL 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5' AgeI VL 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5' AgeI VL 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCSCAGCYGTGCTGACTCA
	5' AgeI VL 6	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAATTTATGCTGACTCAG
	5' AgeI VL 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYAGRCTGTGGTGACYCAG
	3' XhoI CL	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

**Annexe 5 : Amorces utilisées pour l'amplification des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines lors de la 2<sup>nd</sup> étape de PCR imbriquée (TILLER et al, 2008**

Chain	Sens	Name Primer	Sequence Primer 5' --> 3'
HC	Fw	SL 5' VH1	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGCAG
		SL 5' VH1/5	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCA
		SL 5' VH3	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT GAGGTGCAGCTGGTGGAG
		SL 5' VH3-23	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT GAGGTGCAGCTGTTGGAG
		SL 5' VH4	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTGCAGGAG
		SL 5' VH 4-34	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTACAGCAGTG
		SL 5' VH 1-18	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTTCCAGCTGGTGCAG
		SL 5' VH 1-24	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTCCAGCTGGTACAG
		SL 5' VH3-33	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAG
		SL 5' VH 3-9	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT GAAGTGCAGCTGGTGGAG
		SL 5' VH4-39	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGCTGCAGCTGCAGGAG
		SL 5' VH 6-1	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTACAGCTGCAGCAG
		SL 5' VH7-4-1	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGCATC
		SL 5' VH 5-51*03	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG
		SL 5' VH1-3	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGGTcCAGCTtGTGCAG
		SL 5' VH3-23-04	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT GAGGTGCAGCTGGTGGAG
	SL 5' VH4-30-2*04	GGGTTTTCCCTTGTTGCTATTCTCGAGGGGTGCCAGTGT CAGCTGCAGCTGCAGGAG	
	Rv	SL 3' JH 1/2/4/5	GATGGGCCCTTGGTGTAGCTGAGGAGACGGTGACCAG
		SL 3' JH 3	GATGGGCCCTTGGTGTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTG
SL 3' JH 6		GATGGGCCCTTGGTGTAGCTGAGGAGACGGTGACCCTG	
		TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACAC	
KC	Fw	SL 5' VK 1-5	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGACATCCAGATGACCCAGTC
		SL 5' VK 1-9	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGACATCCAGTTGACCCAGTCT
		SL 5' VK 1D-43	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGCCATCCGGATGACCCAGTC
		SL 5' VK 2-24	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGATATTGTGATGACCCAGAC
		SL 5' VK 2-28	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGATATTGTGATGACTCAGTC
		SL 5' VK 2-30	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGATGTTGTGATGACTCAGTC
		SL 5' VK 3-11	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGAAATTGTGTTGACACAGTC
		SL 5' VK 3-15	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGAAATAGTGATGACGCAGTC
		SL 5' VK 3-20	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGAAATTGTGTTGACGCAGTCT
		SL 5' VK 4-1	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGACATCGTGATGACCCAGTC
		SL 5' VK 3-20*02	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCAC
		SL 5' VK 2D-29*02	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGATATTGTGATGACCCAGACT
		SL 5'-VK-1-39-01	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGACATCCAGATGACCCAGTCT
	SL 5'-VK-3-7	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACGAAATTGTAATGACACAGTCT	
	Rv	SL 3' JK 1/4	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTC
		SL 3' JK 2	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC
		SL 3' JK 3	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATATCCACTTGGTC
		SL 3' JK 5	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTAACTCCAGTCCGTGTC
		SL 3' JK 1/4 CLR1	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGACTTCCACCTTGGTT
		SL 3' JK 1/4 CLR2	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGACTTCCACCTTGGTC
SL 3' JK 2 CLR1		AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATCTCGAGCTTGGTC	
SL 3' JK 2 CLR2	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTATAGTCCACTTGGTC		
SL 3' JK 1	AAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTC		
LC	Fw	SL 5' VL 1	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGTGCTGACTCAG
		SL 5' VL 2	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGCCCTGACTCAG
		SL 5' VL 3	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACTCCTATGAGCTGACTCAG
		SL 5' VL 4/5	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGCCTGTGCTGACTCA
		SL 5' VL 6	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACAATTTTATGCTGACTCAG
		SL 5' VL 7/8	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGACTGTGGTACTCAG
		SL 5' VL 1-51	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGTGTTGACGCAG
		SL 5' VL 1-40	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGTGCTGACGCA
		SL 5' VL 3-27	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACTCCTATGAGCTGACACAGCCATCCTC
		SL 5' VL 3-21	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACTCCTATGTGCTGACTCAG
		SL 5' VL 1-47	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGTGCTGACTCA
		SL 5' VL 3-10	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACTCCTATGAGCTGACaCAG
		SL 5' VL 2-8/2-14	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGTCTGCCCTGACT
	SL 5' VL 4-69	TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACACCAGCTGTGCTGACTCA	
Rv	SL 3' CL	TGTTGGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGCGGGAACAGAGTG	

**Annexe 6 : Amorces spécifiques des familles de gènes d'immunoglobulines pour l'amplification des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines lors de de de PCR de clonage.** Les séquences « seamless » sont indiquées en gras.

Fluorochrome	Isotype	Reference / Brand	Ex max (nm)	Em max (nm)
Viability : Live /Dead Aqua		L 34957 thermo	405	525
Anti CD3 Vioblue	REA	130 – 114 – 519 miltenyi	400	425
Anti CD20 PE Vio 770	REA	130 - 111- 345 miltenyi	565	776
Anti CD19 PE Vio 770	REA	130 – 113 - 649 miltenyi		
Anti CD27 APC	REA	130 - 108 – 336 miltenyi	652	660
Anti IgD PE	REA	130 – 110 – 643 miltenyi	565	575
Anti IgA PE	REA	130-113-476 miltenyi		
Anti IgM PE	IgG	130 – 093- 075 miltenyi		
Streptavidin BV 605		405229 biolegend	405	603
Streptavidin FITC		405201 biolegend	488	520
Streptavidin BUV 737		AB_2869560 BD Biosciences	350	737
Streptavidin BUV 496		AB_2869599 BD Biosciences	348	496

**Annexe 7 : Anticorps et réactifs utilisés dans l'isolement de lymphocytes B mémoires par cytométrie**

# Bibliographie

**ABHILASH**, M., VIDYA, A., et JAGADEVI, T. Bacteriophage therapy: A war against antibiotic resistant bacteria. *Internet J Altern Med*, 2009, vol. 7, no 1, p. e17744.

**ACKERMAN**, Margaret E., MIKHAILOVA, Anastassia, BROWN, Eric P., *et al.* Polyfunctional HIV-specific antibody responses are associated with spontaneous HIV control. *PLoS Pathogens*, 2016, vol. 12, no 1, p. e1005315.

**ADAMO**, Robert, SOKOL, Sach, SOONG, Grace, *et al.* Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004, vol. 30, no 5, p. 627-634.

**AHMAD**, Zuhaida Asra, YEAP, Swee Keong, ALI, Abdul Manaf, *et al.* scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, vol. 2012.

**AHMADZADEH**, Vahideh, FARAJNIA, Safar, FEIZI, Mohammad Ali Hosseinpour, *et al.* Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2014, vol. 33, no 2, p. 67-73.

**AKEDA**, Yukihiro et GALÁN, Jorge E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 2005, vol. 437, no 7060, p. 911-915.

**ALBERTS**, Bruce, JOHNSON, Alexander, LEWIS, Julian, *et al.* B cells and antibodies. In : *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, 2002.

**ALCORN**, John F. et **WRIGHT**, Jo Rae. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no 29, p. 30871-30879.

**ALFALEH**, Mohamed A., **ALSAAB**, Hashem O., **MAHMOUD**, Ahmad Bakur, et al. Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Frontiers in immunology*, 2020, vol. 11, p. 1986.

**ALFALEH**, Mohamed A., **JONES**, Martina L., **HOWARD**, Christopher B., et al. Strategies for selecting membrane protein-specific antibodies using phage display with cell-based panning. *Antibodies*, 2017, vol. 6, no 3, p. 10.

**ALI**, S. Omar, **YU**, Xiang Qing, **ROBBIE**, Gabriel J., et al. Phase 1 study of MEDI3902, an investigational anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl bispecific human monoclonal antibody, in healthy adults. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, vol. 25, no 5, p. 629. e1-629. e6.

**AL-LAZIKANI**, Bissan, **LESK**, Arthur M., et **CHOTHIA**, Cyrus. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *Journal of Molecular Biology*, 1997, vol. 273, no 4, p. 927-948.

**AMIN**, Nagwa El, **GISKE**, Christian G., **JALAL**, Shah, et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *Apmis*, 2005, vol. 113, no 3, p. 187-196.

**AMIR**, Jacob, **SCOTT**, Mitchell G., **NAHM**, Moon H., et al. Bactericidal and opsonic activity of IgG1 and IgG2 anticapsular antibodies to *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of Infectious Diseases*, 1990, vol. 162, no 1, p. 163-171.

**ARNOLD**, James N., **WORMALD**, Mark R., **SIM**, Robert B., et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology*, 2007, vol. 25, no 1, p. 21-50.

**ARORA**, Shiwani K., **NEELY**, Alice N., **BLAIR**, Barbara, et al. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and immunity*, 2005, vol. 73, no 7, p. 4395-4398.

**ARORA**, Shiwani K., **RITCHINGS**, Bruce W., **ALMIRA**, Ernesto C., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and immunity*, 1998, vol. 66, no 3, p. 1000-1007.

**AZINOVIC**, Ignacio, **DENARDO**, Gerald L., **LAMBORN**, Kathleen R., et al. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2006, vol. 55, no 12, p. 1451-1458.

**BACKHAUS**, Oliver. Generation of antibody diversity. *Antibody Engineering*, 2018, vol. 1.

**BAER**, Mark, **SAWA**, Teiji, **FLYNN**, Peter, et al. An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infection and immunity*, 2009, vol. 77, no 3, p. 1083-1090.

**BAHAR**, Ali Adem et **REN**, Dacheng. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 2013, vol. 6, no 12, p. 1543-1575.

**BALL**, Geneviève, **DURAND**, Éric, **LAZDUNSKI**, Andrée, et al. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 2002, vol. 43, no 2, p. 475-485.

**BALL**, Geneviève, **VIARRE**, Véronique, **GARVIS**, Steven, et al. Type II-dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Research in microbiology*, 2012, vol. 163, no 6-7, p. 457-469.

**BALLOY**, Viviane, VERMA, Amrisha, KURAVI, Sudha, et al. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of infectious diseases*, 2007, vol. 196, no 2, p. 289-296.

**BANIN**, Ehud, VASIL, Michael L., et GREENBERG, E. Peter. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 31, p. 11076-11081.

**BARBAS 3RD**, C. F., KANG, Angray S., LERNER, Richard A., et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, vol. 88, no 18, p. 7978-7982.

**BARKEN**, Kim B., PAMP, Sünje J., YANG, Liang, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, 2008, vol. 10, no 9, p. 2331-2343.

**BARON**, Christian et COOMBES, Brian. Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 2007, vol. 7, no 1, p. 19-27.

**BASSO**, Pauline, RAGNO, Michel, ELSEN, Sylvie, et al. *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *MBio*, 2017, vol. 8, no 1, p. e02250-16.

**BAUMGART**, Ana Milda Karsten, MOLINARI, Marcelo André, et SILVEIRA, Alessandro Conrado de Oliveira. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2010, vol. 14, p. 433-436.



**BEARE**, Paul A., FOR, Raewyn J., MARTIN, Lois W., et al. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Molecular microbiology*, 2003, vol. 47, no 1, p. 195-207.

**BERGERON**, Julien RC, FERNÁNDEZ, Lucia, WASNEY, Gregory A., et al. The structure of a type 3 secretion system (T3SS) ruler protein suggests a molecular mechanism for needle length sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, vol. 291, no 4, p. 1676-1691.

**BERRAZEG**, M., JEANNOT, K., NTSOGO ENGUÉNÉ, Véronique Yvette, et al. Mutations in  $\beta$ -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015, vol. 59, no 10, p. 6248-6255.

**BERTHELOT**, Philippe, ATTREE, Ina, PLÉSIAT, Patrick, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *The Journal of infectious diseases*, 2003, vol. 188, no 4, p. 512-518.

**BERTRAND**, Quentin, JOB, Viviana, MAILLARD, Antoine P., et al. Exolysin (ExlA) from *Pseudomonas aeruginosa* punctures holes into target membranes using a molten globule domain. *Journal of Molecular Biology*, 2020, vol. 432, no 16, p. 4466-4480.

**BHATTACHARJEE**, A., ANUPURBA, S., GAUR, A., et al. Prevalence of inducible AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in northern India. 2008.

**BLEVES**, Sophie, LAZDUNSKI, Andree, et FILLOUX, Alain. Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 1996, vol. 178, no 14, p. 4297-4300.

**BLEVES**, Sophie, SANA, Thibault G., et VOULHOUX, Romé. The target cell genus does not matter. *Trends in microbiology*, 2014, vol. 22, no 6, p. 304-306.

**BLEVES**, Sophie, VIARRE, Véronique, SALACHA, Richard, et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, vol. 300, no 8, p. 534-543.

**BLOCH**, Evan M., SHOHAM, Shmuel, CASADEVALL, Arturo, et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *The Journal of clinical investigation*, 2020, vol. 130, no 6, p. 2757-2765.

**BOONYARATANAKORNKIT**, Jim et TAYLOR, Justin J. Techniques to study antigen-specific B cell responses. *Frontiers in immunology*, 2019, vol. 10, p. 1694.

**BOYD**, E. Fidelma et BRÜSSOW, Harald. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends in microbiology*, 2002, vol. 10, no 11, p. 521-529.

**BRAVO**, Denisse, SILVA, Cecilia, CARTER, Javier A., et al. Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *Journal of medical microbiology*, 2008, vol. 57, no 8, p. 938-946.

**BREDIUS**, R. G., FIJEN, C. A., DE HAAS, M., et al. Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3- opsonized bacteria and erythrocytes. *Immunology*, 1994, vol. 83, no 4, p. 624.

**BREGENHOLT**, Søren, JENSEN, Allan, LANTTO, Johan, et al. Recombinant human polyclonal antibodies: a new class of therapeutic antibodies against viral infections. *Current pharmaceutical design*, 2006, vol. 12, no 16, p. 2007-2015.

**BRITIGAN**, Bradley E., ROEDER, Tedmund L., RASMUSSEN, George T., et al. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for

Pseudomonas-associated tissue injury. The Journal of clinical investigation, 1992, vol. 90, no 6, p. 2187-2196.

**BROWN**, Jeremy S., HUSSELL, Tracy, GILLILAND, Sarah M., et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, vol. 99, no 26, p. 16969-16974.

**BRUCHMANN**, Sebastian, DÖTSCH, Andreas, NOURI, Bianka, et al. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to Pseudomonas aeruginosa fluoroquinolone resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013, vol. 57, no 3, p. 1361-1368.

**BRYCESON**, Yen-an T., MARCH, Michael E., LJUNGGREN, Hans-Gustaf, et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. Blood, 2006, vol. 107, no 1, p. 159-166.

**BURNS**, Stacy M. et HULL, Sheila I. Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic Escherichia coli O75: K5. Infection and immunity, 1998, vol. 66, no 9, p. 4244-4253.

**BURNS**, Stacy M. et HULL, Sheila I. Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O- and K- mutants of a uropathogenic Escherichia coli O75: K5 strain. Infection and immunity, 1999, vol. 67, no 8, p. 3757-3762.

**BURROWS**, Lori L. Pseudomonas aeruginosa twitching motility: type IV pili in action. Annual review of microbiology, 2012, vol. 66, no 1, p. 493-520.

**BURTON**, Dennis R., BARBAS 3RD, C. F., PERSSON, M. A., et al. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, vol. 88, no 22, p. 10134-10137.

**BYRD**, Matthew S., **SADOVSKAYA**, Irina, **VINOGRADOV**, Evgueny, et al. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 2009, vol. 73, no 4, p. 622-638.

**CAMPODÓNICO**, Victoria L., **LLOSA**, Nicolás J., **GROUT**, Martha, et al. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infection and immunity*, 2010, vol. 78, no 2, p. 746-755.

**CARRATALÀ**, Jordi, **ROSÓN**, Beatriz, **FERNÁNDEZ-SEVILLA**, Alberto, et al. Bacteremic pneumonia in neutropenic patients with cancer: causes, empirical antibiotic therapy, and outcome. *Archives of Internal Medicine*, 1998, vol. 158, no 8, p. 868-872.

**CARTER**, Paul J. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*, 2006, vol. 6, no 5, p. 343-357.

**CASADEVALL**, Arturo et **SCHARFF**, Matthew D. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 1995, vol. 21, no 1, p. 150-161.

**CASADEVALL**, Arturo et **SCHARFF**, Matthew D. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1994, vol. 38, no 8, p. 1695-1702.

**CASADEVALL**, Arturo, **DADACHOVA**, Ekaterina, et **PIROFSKI**, Liise-anne. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, vol. 2, no 9, p. 695-703.

**CASILAG**, Fiordiligie, **LORENZ**, Anne, **KRUEGER**, Jonas, et al. The LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. *Infection and immunity*, 2016, vol. 84, no 1, p. 162-171.

**CHAN**, Benjamin K., **ABEDON**, Stephen T., et **LOC-CARRILLO**, Catherine. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future microbiology*, 2013, vol. 8, no 6, p. 769-783.

**CHAPMAN**, Andrew P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Advanced drug delivery reviews*, 2002, vol. 54, no 4, p. 531-545.

**CHASTRE**, Jean, **FRANÇOIS**, Bruno, **BOURGEOIS**, Marc, et al. 635. Efficacy, pharmacokinetics (PK), and safety profile of MEDI3902, an anti-Pseudomonas aeruginosa bispecific human monoclonal antibody in mechanically ventilated intensive care unit patients; Results of the phase 2 EVADE study conducted by the public-private COMBACTE-MAGNET consortium in the innovative medicines initiative (IMI) program. In : *Open Forum Infectious Diseases*. US : Oxford University Press, 2020. p. S377-S378.

**CHEN**, H. Y., **YUAN**, Mei, et **LIVERMORE**, D. M. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics amongst Pseudomonas aeruginosa isolates collected in the UK in 1993. *Journal of Medical Microbiology*, 1995, vol. 43, no 4, p. 300-309.

**CHEN**, John et **NOVICK**, Richard P. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *science*, 2009, vol. 323, no 5910, p. 139-141.

**CHEN**, Zhaochun, **MOAYERI**, Mahtab, et **PURCELL**, Robert. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins*, 2011, vol. 3, no 8, p. 1004-1019.

**CHIANG**, Poney, **HABASH**, Marc, et **BURROWS**, Lori L. Disparate subcellular localization patterns of Pseudomonas aeruginosa type IV pilus ATPases involved in twitching motility. *Journal of bacteriology*, 2005, vol. 187, no 3, p. 829-839.

**CHUNG**, Christine H. Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *The oncologist*, 2008, vol. 13, no 6, p. 725-732.

**CHURCH**, Deirdre, **ELSAYED**, Sameer, **REID**, Owen, et al. Burn wound infections. *Clinical microbiology reviews*, 2006, vol. 19, no 2, p. 403-434.

**CIANFANELLI**, Francesca R., **MONLEZUN**, Laura, et **COULTHURST**, Sarah J. Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends in microbiology*, 2016, vol. 24, no 1, p. 51-62.

**CEGELSKI**, Lynette, **MARSHALL**, Garland R., **ELDRIDGE**, Gary R., *et al.* The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, vol. 6, no 1, p. 17-27.

**COBURN**, Bryan, **SEKIROV**, Inna, et **FINLAY**, B. Brett. Type III secretion systems and disease. *Clinical microbiology reviews*, 2007, vol. 20, no 4, p. 535-549.

**COGGAN**, Kimberly A. et **WOLFGANG**, Matthew C. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current issues in molecular biology*, 2012, vol. 14, no 2, p. 47-70.

**COMOLLI**, James C., **HAUSER**, Alan R., **WAITE**, Leslie, et al. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infection and immunity*, 1999, vol. 67, no 7, p. 3625-3630.

**CONCEPCION**, Joy, **WITTE**, Krista, **WARTCHOW**, Charles, et al. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 2009, vol. 12, no 8, p. 791-800

**CORNELIS**, Pierre. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, vol. 86, no 6, p. 1637-1645.

**COSTERTON**, J. William, **STEWART**, Philip S., et **GREENBERG**, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, vol. 284, no 5418, p. 1318-1322.

**COWELL**, Brigitte A., **EVANS**, David J., et **FLEISZIG**, Suzanne MJ. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS microbiology letters*, 2005, vol. 250, no 1, p. 71-76.

**COX**, CHARLES D. Effect of pyochelin on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 1982, vol. 36, no 1, p. 17-23.

**CRAIG**, Lisa, **FOREST**, Katrina T., et **MAIER**, Berenike. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature reviews microbiology*, 2019, vol. 17, no 7, p. 429-440.

**Cystic Fibrosis Canada**. (2022). The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2020 Annual Data Report. Toronto, Canada: Cystic Fibrosis Canada

**CYWES-BENTLEY**, Colette, **SKURNIK**, David, **ZAIDI**, Tanweer, et al. Antibody to a conserved antigenic target is protective against diverse prokaryotic and eukaryotic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110, no 24, p. E2209-E2218.

**DA FONSECA**, Erica Lourenco, **VIEIRA**, Verônica Viana, **CIPRIANO**, Rosângela, et al. Emergence of bla GES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2007, vol. 59, no 3, p. 576-577.

**DALL'ACQUA**, William F., **KIENER**, Peter A., et **WU**, Herren. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no 33, p. 23514-23524.

**DASGUPTA**, Nandini, **ARORA**, Shiwani K., et **RAMPHAL**, Reuben. The flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. In : *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA, 2004. p. 675-698.

**DAUTIN**, Nathalie et **BERNSTEIN**, Harris D. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007, vol. 61, p. 89-112.

**DAVIES, G., WELLS, A. U., DOFFMAN, S., et al.** The effect of *Pseudomonas aeruginosa* on pulmonary function in patients with bronchiectasis. *European Respiratory Journal*, 2006, vol. 28, no 5, p. 974-979.

**DAVIES, Julian et DAVIES, Dorothy.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2010, vol. 74, no 3, p. 417-433.

**DE BENTZMANN, Sophie et PLÉSIAT, Patrick.** The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental microbiology*, 2011, vol. 13, no 7, p. 1655-1665.

**DE BENTZMANN, Sophie, POLETTE, Myriam, ZAHM, Jean-Marie, et al.** *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Laboratory investigation*, 2000, vol. 80, no 2, p. 209-219.

**DE JONG, Rob N., BEURSKENS, Frank J., VERPLOEGEN, Sandra, et al.** A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface. *PLoS biology*, 2016, vol. 14, no 1, p. e1002344.

**DEDRICK, Rebekah M., FREEMAN, Krista G., NGUYEN, Jan A., et al.** Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary *Mycobacterium abscessus* infection. *Nature medicine*, 2021, vol. 27, no 8, p. 1357-1361.

**DEL BARRIO-TOFIÑO, Ester, LÓPEZ-CAUSAPÉ, Carla, et OLIVER, Antonio.** *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally acquired  $\beta$ -lactamases: 2020 update. *International journal of antimicrobial agents*, 2020, vol. 56, no 6, p. 106196.

**DELEPELAIRE, Philippe.** Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2004, vol. 1694, no 1-3, p. 149-161.



**DENG**, Wanyin, **MARSHALL**, Natalie C., **ROWLAND**, Jennifer L., et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, vol. 15, no 6, p. 323-337.

**DENNING**, Gerene M., **RAILSBACK**, Michelle A., **RASMUSSEN**, George T., et al. Pseudomonas pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1998, vol. 274, no 6, p. L893-L900.

**DIAZ**, Maureen H., **SHAVER**, Ciara M., **KING**, John D., et al. Pseudomonas aeruginosa induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infection and immunity*, 2008, vol. 76, no 10, p. 4414-4421.

**DICKEY**, Seth W., **CHEUNG**, Gordon YC, et **OTTO**, Michael. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, vol. 16, no 7, p. 457-471.

**DIEBOLDER**, Christoph A., **BEURSKENS**, Frank J., **DE JONG**, Rob N., et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 2014, vol. 343, no 6176, p. 1260-1263.

**DIENE**, Seydina M. et **ROLAIN**, J.-M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, vol. 20, no 9, p. 831-838.

**DIGGLE**, Stephen P. et **WHITELEY**, Marvin. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 2020, vol. 166, no 1, p. 30.

**DIGIANDOMENICO**, Antonio, **KELLER**, Ashley E., **GAO**, Cuihua, et al. A multifunctional bispecific antibody protects against Pseudomonas aeruginosa. *Science Translational Medicine*, 2014, vol. 6, no 262, p. 262ra155-262ra155.

**DIGIANDOMENICO**, Antonio, WARRENER, Paul, HAMILTON, Melissa, et al. Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, vol. 209, no 7, p. 1273-1287.

**DIKSTEEL**, Gabrielle S., ULRICH, Magda MW, MIDDELKOOP, Esther, et al. Lessons learned from clinical trials using antimicrobial peptides (AMPs). *Frontiers in Microbiology*, 2021, vol. 12, p. 616979.

**DOMINGO-CALAP**, Pilar et DELGADO-MARTÍNEZ, Jennifer. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*, 2018, vol. 7, no 3, p. 66.

**DONLAN**, Rodney M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 2002, vol. 8, no 9, p. 881. LEWIS, K. I. M. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, no 4, p. 999-1007.

**DÖRING**, G., PFESTORF, M., BOTZENHART, K., et al. Impact of proteases on iron uptake of *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine from transferrin and lactoferrin. *Infection and Immunity*, 1988, vol. 56, no 1, p. 291-293.

**DREIER**, Jürg et RUGGERONE, Paolo. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 2015, vol. 6, p. 660.

**DUAN**, Kai, LIU, Bende, LI, Cesheng, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, vol. 117, no 17, p. 9490-9496.

**DUENSING**, Thomas D. et WATSON, Susan R. Complement-dependent cytotoxicity assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, vol. 2018, no 2, p. pdb. prot093799.

**DUERR**, Claudia U., ZENK, Sebastian F., CHASSIN, Cécilia, et al. O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS pathogens*, 2009, vol. 5, no 9, p. e1000567.

**DUONG**, Franck, **BONNET**, Estelle, **GÉLI**, Vincent, et al. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene*, 2001, vol. 262, no 1-2, p. 147-153.

**BEHRING**, Emil von. Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Drucke 19. Jh.*, 2013.

**ECKER**, Dawn M., **JONES**, Susan Dana, et **LEVINE**, Howard L. The therapeutic monoclonal antibody market. In : *MAbs*. Taylor & Francis, 2015. p. 9-14.

**ELSEN**, Sylvie, **HUBER**, Philippe, **BOUILLOT**, Stéphanie, et al. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell host & microbe*, 2014, vol. 15, no 2, p. 164-176.

**EL-SOLH**, Ali A., **HATTEMER**, Angela, **HAUSER**, Alan R., et al. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Critical care medicine*, 2012, vol. 40, no 4, p. 1157.

**ENGELS**, W., **ENDERT**, J., **KAMPS**, M. A., et al. Role of lipopolysaccharide in opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 1985, vol. 49, no 1, p. 182-189.

**FAEZI**, Sobhan, **BAHRMAND**, Ahmad Reza, **MAHDAVI**, Mehdi, et al. Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-flagellin immunoconjugate. *Biologicals*, 2017, vol. 47, p. 11-17.

**FAIRHEAD**, Michael et **HOWARTH**, Mark. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. In : *Site-Specific Protein Labeling*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 171-184.

**FALAGAS**, Matthew E., KASIAKOU, Sofia K., et SARAVOLATZ, Louis D. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 2005, vol. 40, no 9, p. 1333-1341.

**FAN**, Enguo, CHAUHAN, Nandini, UDATHA, DBRK Gupta, et al. Type V secretion systems in bacteria. *Microbiology spectrum*, 2016, vol. 4, no 1, p. 4.1. 10.

**FANG**, Zhi-li, ZHANG, Li-yan, HUANG, Ying-min, et al. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, vol. 21, p. 124-128.

**FASCIANO**, Alyssa C., SHABAN, Lamyaa, et MECSAS, Joan. Promises and challenges of the type three secretion system injectisome as an antivirulence target. *EcoSal Plus*, 2019, vol. 8, no 2.

**FAUDRY**, Eric, VERNIER, Grégory, NEUMANN, Emmanuelle, et al. Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no 26, p. 8117-8123.

**FAURE**, Karine, FUJIMOTO, Junichi, SHIMABUKURO, David W., et al. Effects of monoclonal anti-PcrV antibody on *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury in a rat model. *Journal of immune based therapies and vaccines*, 2003, vol. 1, no 1, p. 1-9.

**FELDMAN**, Matthew, BRYAN, Ruth, RAJAN, Sujatha, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and immunity*, 1998, vol. 66, no 1, p. 43-51.

**FELTMAN**, Heather, SCHULERT, Grant, KHAN, Salman, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2001, vol. 147, no 10, p. 2659-2669.

**FENTON**, Caroline, SCOTT, Lesley J., et PLOSKER, Greg L. Palivizumab. *Pediatric Drugs*, 2004, vol. 6, no 3, p. 177-197.

**FERNÁNDEZ**, Lucía et HANCOCK, Robert EW. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 2012, vol. 25, no 4, p. 661-681.

**FEUILLET**, Vincent, MEDJANE, Samir, MONDOR, Isabelle, et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no 33, p. 12487-12492.

**FIJEN**, C. A. P., BREDIUS, R. G. M., KUIJPER, E. J., et al. The role of Fc  $\gamma$  receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clinical & Experimental Immunology*, 2000, vol. 120, no 2, p. 338-345.

**FILLOUX**, Alain. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function. *Frontiers in microbiology*, 2011, vol. 2, p. 155.

**FINCK-BARBANÇON**, Viviane, GORANSON, Joanne, ZHU, Lei, et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molecular microbiology*, 1997, vol. 25, no 3, p. 547-557.

**FISCHETTI**, Vincent A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current opinion in microbiology*, 2008, vol. 11, no 5, p. 393-400.

**FISH**, Randolph, KUTTER, Elizabeth, WHEAT, Gordon, et al. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *Journal of wound care*, 2016, vol. 25, no Sup7, p. S27-S33.

**FLEISZIG**, S. M., WIENER-KRONISH, Jeanine P., MIYAZAKI, Hiroshi, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infection and immunity*, 1997, vol. 65, no 2, p. 579-586.

**FOCOSI**, Daniele, MCCONNELL, Scott, CASADEVALL, Arturo, et al. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022.

**FOTHERGILL**, Joanne L., WALSHAW, Martin J., et WINSTANLEY, Craig. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *European Respiratory Journal*, 2012, vol. 40, no 1, p. 227-238.

**FRANÇOIS**, Bruno, LUYT, Charles-Edouard, DUGARD, Anthony, et al. Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Critical care medicine*, 2012, vol. 40, no 8, p. 2320-2326.

**FRANÇOIS**, Bruno, MERCIER, Emmanuelle, GONZALEZ, Céline, et al. Safety and tolerability of a single administration of AR-301, a human monoclonal antibody, in ICU patients with severe pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*: first-in-human trial. *Intensive care medicine*, 2018, vol. 44, no 11, p. 1787-1796.

**FRANK**, Dara W., VALLIS, Amy, WIENER-KRONISH, Jeanine P., et al. Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *The Journal of infectious diseases*, 2002, vol. 186, no 1, p. 64-73.

**FRANKLIN**, Michael J., NIVENS, David E., WEADGE, Joel T., et al. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in microbiology*, 2011, vol. 2, p. 167.

**FRASCH**, Carl E., BORROW, Ray, et DONNELLY, John. Bactericidal antibody is the immunologic surrogate of protection against meningococcal disease. *Vaccine*, 2009, vol. 27, p. B112-B116.

**FRESCHI**, Luca, VINCENT, Antony T., JEUKENS, Julie, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome biology and evolution*, 2019, vol. 11, no 1, p. 109-120.

**FRIEDMAN**, Lisa et **KOLTER**, Roberto. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. 2004.

**GARRITY-RYAN**, L., **KAZMIERCZAK**, B., **KOWAL**, R., et al. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infection and immunity*, 2000, vol. 68, no 12, p. 7100-7113.

**GÉBUS**, Caroline, **FAUDRY**, Eric, **BOHN**, Yu-Sing Tammy, et al. Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no 32, p. 21776.

**GENDRIN**, Claire, **CONTRERAS-MARTEL**, Carlos, **BOUILLOT**, Stéphanie, et al. Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 2012, vol. 8, no 4, p. e1002637.

**GERA**, Nimish, **HUSSAIN**, Mahmud, et **RAO**, Balaji M. Protein selection using yeast surface display. *Methods*, 2013, vol. 60, no 1, p. 15-26.

**GHAFOOR**, Aamir, **HAY**, Iain D., et **REHM**, Bernd HA. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology*, 2011, vol. 77, no 15, p. 5238-5246.

**GOEHRING**, Udo-Michael, **SCHMIDT**, Gudula, **PEDERSON**, Kristin J., et al. The N-terminal Domain of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Is a GTPase-activating Protein for Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no 51, p. 36369-36372.

**GÓMEZ-MANTILLA**, José David, **TROCÓNIZ**, Iñaki F., **PARRA-GUILLÉN**, Zinnia, et al. Review on modeling anti-antibody responses to monoclonal antibodies. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2014, vol. 41, no 5, p. 523-536.

**GOULD**, I. M. Antibiotic resistance: the perfect storm. *International journal of antimicrobial agents*, 2009, vol. 34, p. S2-S5.

**GOURE**, Julien, BROZ, Petr, ATTREE, Olivier, et al. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *The Journal of infectious diseases*, 2005, vol. 192, no 2, p. 218-225.

**GOURE**, Julien, PASTOR, Alexandrine, FAUDRY, Eric, et al. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infection and immunity*, 2004, vol. 72, no 8, p. 4741-4750.

**GRAHAM**, Barney S. et AMBROSINO, Donna M. History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2015, vol. 10, no 3, p. 129.

**GRAUS**, Y. F., VERSCHUUREN, J. J., DEGENHARDT, A., et al. Selection of recombinant anti-HuD Fab fragments from a phage display antibody library of a lung cancer patient with paraneoplastic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 1998, vol. 82, no 2, p. 200-209.

**GREEN**, Erin R. et MECSAS, Joan. Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology spectrum*, 2016, vol. 4, no 1, p. 4.1. 13.

**GREIG**, Sarah L. Obiltoximab: first global approval. *Drugs*, 2016, vol. 76, no 7, p. 823-830.

**GROSSMAN**, N. et LEIVE, L. Complement activation via the alternative pathway by purified *Salmonella* lipopolysaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *The Journal of Immunology*, 1984, vol. 132, no 1, p. 376-385.

**GRUBER**, Rudolf, VAN HAARLEM, Leonardus JM, WARNAAR, Sven O., et al. The human antimouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A. *Cancer Research*, 2000, vol. 60, no 7, p. 1921-1926.



**GULATI**, Sunita, BEURSKENS, Frank J., DE KREUK, Bart-Jan, et al. Complement alone drives efficacy of a chimeric antigonococcal monoclonal antibody. *PLoS Biology*, 2019, vol. 17, no 6, p. e3000323.

**GUTIÉRREZ, O., JUAN, C., CERCENADO, E., et al.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007, vol. 51, no 12, p. 4329-4335.

**GUTU**, Alina D., SGAMBATI, Nicole, STRASBOURGER, Pnina, et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, vol. 57, no 5, p. 2204-2215.

**GUZZO**, J., PAGES, J. M., DUONG, F., et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *Journal of bacteriology*, 1991, vol. 173, no 17, p. 5290-5297.

**HALL**, Susan, MCDERMOTT, Catherine, ANOOPKUMAR-DUKIE, Shailendra, et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 2016, vol. 8, no 8, p. 236.

**HANSEL**, Trevor T., KROPSHOFER, Harald, SINGER, Thomas, et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature reviews Drug discovery*, 2010, vol. 9, no 4, p. 325-338.

**HARRIS**, Frederick, DENNISON, Sarah R., et PHOENIX, David A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science*, 2009, vol. 10, no 6, p. 585-606.

**HASSAN**, Ramadan, EL-NAGGAR, Wael, ABD EL-AZIZ, Abeer M., *et al.* Immunization with outer membrane proteins (OprF and OprI) and flagellin B protects mice from pulmonary infection with mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 2018, vol. 51, no 3, p. 312-320.

**HAURUM**, John S. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?. *Drug Discovery Today*, 2006, vol. 11, no 13-14, p. 655-660.

**HAUSER**, Alan R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, vol. 7, no 9, p. 654-665.

**HAUSER**, Alan R., COBB, Enesha, BODÍ, Maria, *et al.* Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical care medicine*, 2002, vol. 30, no 3, p. 521-528.

**HELLWIG**, Sandra MM, VAN OIRSCHOT, Hans FLM, HAZENBOS, Wouter LW, *et al.* Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *The Journal of infectious diseases*, 2001, vol. 183, no 6, p. 871-879.

**HO**, Mitchell *et* PASTAN, Ira. Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. In : *Antibody Phage Display*. Humana Press, 2009. p. 99-113.

**HOBBS**, Matthew *et* MATTICK, John S. 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*, 1993, vol. 10, no 2, p. 233-243.

**HOICZYK**, Egbert *et* BLOBEL, Günter. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no 8, p. 4669-4674.

**HOLLAND**, I. Barry, SCHMITT, Lutz, et YOUNG, Joanne. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Molecular membrane biology*, 2005, vol. 22, no 1-2, p. 29-39.

**HONG**, Mei et PAYNE, Shelley M. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Molecular microbiology*, 1997, vol. 24, no 4, p. 779-791.

**HOOD**, M. Indriati et SKAAR, Eric P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, vol. 10, no 8, p. 525-537.

**HORCAJADA**, Juan P., MONTERO, Milagro, OLIVER, Antonio, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*, 2019, vol. 32, no 4, p. e00031-19.

**HOWELL**, Heather A., LOGAN, Latania K., et HAUSER, Alan R. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *MBio*, 2013, vol. 4, no 2, p. e00032-13.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02357966>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03222401>)

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03816956>

**HUANG**, Hao, SHAO, Xiaolong, XIE, Yingpeng, et al. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature communications*, 2019, vol. 10, no 1, p. 1-13.

**HUANG**, Lihua, BIOLSI, Susan, BALES, Kelly R., et al. Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization. *Analytical biochemistry*, 2006, vol. 349, no 2, p. 197-207.

**HUECK**, Christoph J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, vol. 62, no 2, p. 379-433.

**HYMAN**, Paul et **ABEDON**, Stephen T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*, 2010, vol. 70, p. 217-248.

**IDUSOGIE**, Esohe E., **PRESTA**, Leonard G., **GAZZANO-SANTORO**, Helene, et al. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *The Journal of Immunology*, 2000, vol. 164, no 8, p. 4178-4184.

**IYAMA**, Kazuhiro, **TAKAHASHI**, Eigo, **LEE**, Jae Man, et al. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 2017, vol. 364, no 7.

**IMPACT-RSV STUDY GROUP**. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*, 1998, vol. 102, no 3, p. 531-537.

**ISHIDA**, Isao, **TOMIZUKA**, Kazuma, **YOSHIDA**, Hitoshi, et al. Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning & Stem Cells*, 2002, vol. 4, no 1, p. 91-102.

**IVANOV**, Ivan E., **KINTZ**, Erica N., **PORTER**, Laura A., et al. Relating the physical properties of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to virulence by atomic force microscopy. *Journal of bacteriology*, 2011, vol. 193, no 5, p. 1259-1266.

**IZORE**, Thierry, **JOB**, Viviana, et **DESSEN**, Andréa. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*, 2011, vol. 19, no 5, p. 603-612.

**JACKSON**, Kara D., STARKEY, Melissa, KREMER, Stefanie, et al. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. 2004.

**JACKSON**, Robert. Serum sickness. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 2000, vol. 4, no 4, p. 223-225.

**JAFARSHAD**, Ali, DZIEGIEL, Morten H., LUNDQUIST, Rasmus, et al. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *The Journal of Immunology*, 2007, vol. 178, no 5, p. 3099-3106.

**JAIN**, Akshay, BARVE, Ashutosh, ZHAO, Zhen, et al. Comparison of avidin, neutravidin, and streptavidin as nanocarriers for efficient siRNA delivery. *Molecular pharmaceutics*, 2017, vol. 14, no 5, p. 1517-1527.

**JAIN**, Manu, BAR-MEIR, Maskit, MCCOLLEY, Susanna, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Translational Research*, 2008, vol. 152, no 6, p. 257-264.

**JAIN**, Manu, RAMIREZ, Daniel, SESHADRI, Roopa, et al. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no 11, p. 5229-5237.

**JAIN**, Raksha, BECKETT, V. V., KONSTAN, M. W., et al. KB001-A, a novel anti-inflammatory, found to be safe and well-tolerated in cystic fibrosis patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018, vol. 17, no 4, p. 484-491.

**JAKOBOVITS**, Aya, AMADO, Rafael G., YANG, Xiaodong, et al. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nature biotechnology*, 2007, vol. 25, no 10, p. 1134-1143.

**JAZAYERI**, Jalal A. et **CARROLL**, Graeme J. Fc-based cytokines. *BioDrugs*, 2008, vol. 22, no 1, p. 11-26.

**JEFFERIS**, Roy. Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of immunology research*, 2016, vol. 2016.

**JENNES**, Serge, **MERABISHVILI**, Maia, **SOENTJENS**, Patrick, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Critical Care*, 2017, vol. 21, no 1, p. 1-3.

**JIANG**, Feng, **WATERFIELD**, Nicholas R., **YANG**, Jian, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell host & microbe*, 2014, vol. 15, no 5, p. 600-610.

**JONES**, Christopher J. et **WOZNIAK**, Daniel J. Psl produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the establishment of biofilms and immune evasion. *MBio*, 2017, vol. 8, no 3, p. e00864-17.

**JONES-NELSON**, Omari, **TOVCHIGRECHKO**, Andrey, **GLOVER**, Matthew S., et al. Antibacterial monoclonal antibodies do not disrupt the intestinal microbiome or its function. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2020, vol. 64, no 5, p. e02347-19.

**JUAN**, Carlos, **MACIÁ**, María D., **GUTIÉRREZ**, Olivia, et al. Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, vol. 49, no 11, p. 4733-4738.

**KANE**, Trevor L., **CAROTHERS**, Katelyn E., et **LEE**, Shaun W. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics. *Current drug targets*, 2018, vol. 19, no 2, p. 111-127.

**KANIGA**, Kone, TROLLINGER, David, et GALAN, Jorge E. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *Journal of bacteriology*, 1995, vol. 177, no 24, p. 7078-7085.

**KAPLAN**, Heidi B. et GREENBERG, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of bacteriology*, 1985, vol. 163, no 3, p. 1210-1214.

**KAPUR**, Rick, KUSTIAWAN, Iwan, VESTRHEIM, Anne, et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2014, vol. 123, no 4, p. 471-480.

**KAUR**, Ravinder, SURENDRAN, Naveen, OCHS, Martina, et al. Human antibodies to PhtD, PcpA, and Ply reduce adherence to human lung epithelial cells and murine nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, 2014, vol. 82, no 12, p. 5069-5075.

**KAWAI**, Taro et AKIRA, Shizuo. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 2010, vol. 11, no 5, p. 373-384.

**KIDA**, Yutaka, HIGASHIMOTO, Yuichiro, INOUE, Hiroyoshi, et al. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- $\kappa$ B through protease-activated receptors. *Cellular microbiology*, 2008, vol. 10, no 7, p. 1491-1504.

**KINTZ**, Erica, SCARFF, Jennifer M., DIGIANDOMENICO, Antonio, et al. Lipopolysaccharide O-antigen chain length regulation in *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O11 strain PA103. 2008.

**KIPNIS**, E., SAWA, T., et WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*, 2006, vol. 36, no 2, p. 78-91.

**KLOCKGETHER**, Jens, CRAMER, Nina, WIEHLMANN, Lutz, et al. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in microbiology*, 2011, vol. 2, p. 150.

**KNIGHT**, David A., FINCK-BARBANÇON, Viviane, KULICH, Scott M., et al. Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infection and Immunity*, 1995, vol. 63, no 8, p. 3182-3186.

**KÖHLER**, Georges et MILSTEIN, Cesar. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*, 1975, vol. 256, no 5517, p. 495-497.

**KONG**, Kok-Fai, JAYAWARDENA, Suriya Ravi, INDULKAR, Shalaka Dayaram, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB  $\beta$ -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, no 11, p. 4567-4575.

**KÖNIG**, W. et PREVOST, G. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *Journal of medical microbiology*, 1997, vol. 46, no 6, p. 479-485.

**KOROTKOV**, Konstantin V., GONEN, Tamir, et HOL, Wim GJ. Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends in biochemical sciences*, 2011, vol. 36, no 8, p. 433-443.

**KOROTKOV**, Konstantin V., SANDKVIST, Maria, et HOL, Wim GJ. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, vol. 10, no 5, p. 336-351.

**KOSIKOWSKA**, Paulina et LESNER, Adam. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 2016, vol. 26, no 6, p. 689-702.



**KRALL**, Rebecca, SCHMIDT, Gudula, AKTORIES, Klaus, et al. Pseudomonas aeruginosa ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infection and immunity*, 2000, vol. 68, no 10, p. 6066-6068.

**KUBORI**, Tomoko, SUKHAN, Anand, AIZAWA, Shin-Ichi, et al. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no 18, p. 10225-10230.

**KUMAR**, Mukesh, KHAN, Imran, et SINHA, Subrata. Nature of immobilization surface affects antibody specificity to placental alkaline phosphatase. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2015, vol. 36, no 4, p. 405-413.

**KUMAR**, Rajesh, PARRAY, Hilal Ahmed, SHRIVASTAVA, Tripti, et al. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International journal of biological macromolecules*, 2019, vol. 135, p. 907-918.

**KUNG**, Vanderlene L., OZER, Egon A., et HAUSER, Alan R. The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2010, vol. 74, no 4, p. 621-641.

**KURAHASHI**, Kiyoyasu, KAJIKAWA, Osamu, SAWA, Teiji, et al. Pathogenesis of septic shock in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *The Journal of clinical investigation*, 1999, vol. 104, no 6, p. 743-750.

**KUTTER**, Elizabeth, DE VOS, Daniel, GVASALIA, Guram, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2010, vol. 11, no 1, p. 69-86.

**LAARMAN**, Alexander J., BARDOEL, Bart W., RUYKEN, Maartje, et al. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *The Journal of Immunology*, 2012, vol. 188, no 1, p. 386-393.

**LABRIE**, Simon J., **SAMSON**, Julie E., et **MOINEAU**, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, vol. 8, no 5, p. 317-327.

**LAMAS FERREIRO**, Jose Luis, **ÁLVAREZ OTERO**, Judith, **GONZÁLEZ GONZÁLEZ**, Lucía, et al. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PloS one*, 2017, vol. 12, no 5, p. e0178178.

**LAMONT**, Iain L., **BEARE**, Paul A., **OCHSNER**, Urs, et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 10, p. 7072-7077.

**LANGAEE**, Taimour Yousef, **GAGNON**, Luc, et **HULETSKY**, Ann. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC  $\beta$ -lactamase expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000, vol. 44, no 3, p. 583-589.

**LANGDON**, Amy, **CROOK**, Nathan, et **DANTAS**, Gautam. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome medicine*, 2016, vol. 8, no 1, p. 1-16.

**LAU**, Gee W., **HASSETT**, Daniel J., **RAN**, Huimin, et al. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 2004, vol. 10, no 12, p. 599-606.

**LAVERGNE**, Stephanie, **HAMILTON**, Theron, **BISWAS**, Biswajit, et al. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. In : *Open forum infectious diseases*. US : Oxford University Press, 2018. p. ofy064.

**LAVERTY**, Garry, **GORMAN**, Sean P., et **GILMORE**, Brendan F. The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of molecular sciences*, 2011, vol. 12, no 10, p. 6566-6596.

**LAWLEY**, Thomas J., BIELORY, Leonard, GASCON, Pedro, et al. A prospective clinical and immunologic analysis of patients with serum sickness. *New England Journal of Medicine*, 1984, vol. 311, no 22, p. 1407-1413.

**LAZAR**, Greg A., DANG, Wei, KARKI, Sher, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no 11, p. 4005-4010.

**LEE**, Arnold. Ansuvimab: first approval. *Drugs*, 2021, vol. 81, no 5, p. 595-598.

**LEE**, Daniel G., URBACH, Jonathan M., WU, Gang, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome biology*, 2006, vol. 7, no 10, p. 1-14.

**LEE**, Jeom Kyu, LEE, Yeong Seon, PARK, Yong Keun, et al. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*, 2005, vol. 25, no 4, p. 290-295.

**LEE**, Ji-Young et KO, Kwan Soo. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *International journal of antimicrobial agents*, 2012, vol. 40, no 2, p. 168-172.

**LEE**, Vincent T., SMITH, Roger S., TÜMMLER, Burkhard, et al. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infection and immunity*, 2005, vol. 73, no 3, p. 1695-1705.

**LEGOUFFE**, E., LIAUTARD, J., GAILLARD, J. P., et al. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clinical & Experimental Immunology*, 1994, vol. 98, no 2, p. 323-329.

**LEI**, Lin, **TRAN**, Karen, **WANG**, Yimeng, et al. Antigen-specific single B cell sorting and monoclonal antibody cloning in guinea pigs. *Frontiers in microbiology*, 2019, vol. 10, p. 672.

**LENZ**, Heinz-Josef. Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *The oncologist*, 2007, vol. 12, no 5, p. 601-609.

**LEO**, Jack C., **GRIN**, Iwan, et **LINKE**, Dirk. Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, vol. 367, no 1592, p. 1088-1101.

**LÉTOFFÉ**, Sylvie, **REDEKER**, Virginie, et **WANDERSMAN**, Cécile. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular microbiology*, 1998, vol. 28, no 6, p. 1223-1234.

**LEWIS**, K. I. M. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, no 4, p. 999-1007.

**LI**, Hui, **LUO**, Yi-Feng, **WILLIAMS**, Bryan J., et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 2012, vol. 302, no 2, p. 63-68.

**LI**, Ting, **HUANG**, Xiaoyuan, **YUAN**, Zhechen, et al. Pyocyanin induces NK92 cell apoptosis via mitochondrial damage and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Innate Immunity*, 2019, vol. 25, no 1, p. 3-12.

**LIAO**, Chongbing, **HUANG**, Xin, **WANG**, Qingxia, et al. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, vol. 12.

**LIPES**, Barbara D., CHEN, Yu-Hsun, MA, Hongzheng, et al. An entirely cell-based system to generate single-chain antibodies against cell surface receptors. *Journal of molecular biology*, 2008, vol. 379, no 2, p. 261-272.

**LISTER**, Philip D., WOLTER, Daniel J., et HANSON, Nancy D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 2009, vol. 22, no 4, p. 582-610.

**LIU**, Dan, VAN BELLEGHEM, Jonas D., DE VRIES, Christiaan R., et al. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies. *Viruses*, 2021, vol. 13, no 7, p. 1268.

**LIU**, Hongyan, SAXENA, Abhishek, SIDHU, Sachdev S., et al. Fc engineering for developing therapeutic bispecific antibodies and novel scaffolds. *Frontiers in Immunology*, 2017, vol. 8, p. 38.

**LIU**, Suyan, YAHR, Timothy L., FRANK, Dara W., et al. Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 1997, vol. 179, no 5, p. 1609-1613.

**LIU**, Suyan, YAHR, Timothy L., FRANK, Dara W., et al. Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 1997, vol. 179, no 5, p. 1609-1613.

**LIU**, Yi-Yun, WANG, Yang, WALSH, Timothy R., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 2016, vol. 16, no 2, p. 161-168.

**LOMBARDI**, Charlotte, **TOLCHARD**, James, **BOUILLOT**, Stephanie, et al. Structural and functional characterization of the type three secretion system (T3SS) needle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 2019, vol. 10, p. 573.

**LONBERG**, Nils, **TAYLOR**, Lisa D., **HARDING**, Fiona A., et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 1994, vol. 368, no 6474, p. 856-859.

**LU**, Lenette L., **SUSCOVICH**, Todd J., **FORTUNE**, Sarah M., et al. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 2018, vol. 18, no 1, p. 46-61.

**LYCZAK**, Jeffrey B., **CANNON**, Carolyn L., et **PIER**, Gerald B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection*, 2000, vol. 2, no 9, p. 1051-1060.

**MA**, Luyan, **WANG**, Shiwei, **WANG**, Di, et al. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, vol. 65, no 2, p. 377-380.

**MACNAB**, Robert M. How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology*, 2003, vol. 57, p. 77.

**MAGILL**, Shelley S., **EDWARDS**, Jonathan R., **BAMBERG**, Wendy, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*, 2014, vol. 370, no 13, p. 1198-1208.

**MAGIORAKOS**, A.-P., **SRINIVASAN**, A., **CAREY**, Roberta B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 2012, vol. 18, no 3, p. 268-281.

**MAHLAPUU**, Margit, HÅKANSSON, Joakim, RINGSTAD, Lovisa, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2016, vol. 6, p. 194.

**MAIER**, Berenike et WONG, Gerard CL. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends in microbiology*, 2015, vol. 23, no 12, p. 775-788.

**MARCH**, Catalina, CANO, Victoria, MORANTA, David, et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 2, p. e56847.

**MARIENCHECK**, William I., ALCORN, John F., PALMER, Scott M., et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2003, vol. 28, no 4, p. 528-537.

MARKHAM, Anthony. Ibalizumab: first global approval. *Drugs*, 2018, vol. 78, no 7, p. 781-785.

**MAROZSAN**, Andre J., MA, Dangshe, NAGASHIMA, Kirsten A., et al. Protection against *Clostridium difficile* infection with broadly neutralizing antitoxin monoclonal antibodies. *The Journal of infectious diseases*, 2012, vol. 206, no 5, p. 706-713.

**MATASEJE**, L. F., PEIRANO, Gisele, CHURCH, Deirdre L., et al. Colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 654 with bla NDM-1 arrives in North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2016, vol. 60, no 3, p. 1794-1800.

**MATHEE**, Kalai, NARASIMHAN, Giri, VALDES, Camilo, et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no 8, p. 3100-3105.

**MATSUZAKI**, Shigenobu, RASHEL, Mohammad, UCHIYAMA, Jumpei, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, 2005, vol. 11, no 5, p. 211-219.

**MATTEI**, Pierre-Jean, FAUDRY, Eric, JOB, Viviana, et al. Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *The FEBS journal*, 2011, vol. 278, no 3, p. 414-426.

**MAY**, Thomas B., SHINABARGER, Dean, MAHARAJ, ROMILA, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical microbiology reviews*, 1991, vol. 4, no 2, p. 191-206.

**MAZAR**, Joseph et COTTER, Peggy A. New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends in microbiology*, 2007, vol. 15, no 11, p. 508-515.

**MCCAFFERTY**, John, GRIFFITHS, Andrew D., WINTER, Greg, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *nature*, 1990, vol. 348, no 6301, p. 552-554.

**MELO-BRAGA**, Marcella Nunes, CARVALHO, Milene Barbosa, FERREIRA, Manuela Cristina Emiliano, et al. New insights of glycosylation role on variable domain of antibody structures. *bioRxiv*, 2021.

**MENDEZ**, Michael J., GREEN, Larry L., CORVALAN, Jose RF, et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature genetics*, 1997, vol. 15, no 2, p. 146-156.

**MEYER**, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 64(2), 518-523.

**MICEK**, Scott T., LLOYD, Ann E., RITCHIE, David J., et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, vol. 49, no 4, p. 1306-1311.



**MIGONE**, Thi-Sau, **SUBRAMANIAN**, G. Mani, **ZHONG**, John, et al. Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 361, no 2, p. 135-144.

**MILAGRES**, Lucimar G., **CASTRO**, Tatiana LA, **GARCIA**, Daniely, et al. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 2009, vol. 44, no 4, p. 392-401.

**MILLA**, Carlos E., **CHMIEL**, James F., **ACCURSO**, Frank J., et al. Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: A novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Pediatric pulmonology*, 2014, vol. 49, no 7, p. 650-658.

**MILLER**, Melissa B., **BASSLER**, Bonnie L., et al. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*, 2001, vol. 55, no 1, p. 165-199.

**MILLER**, Samuel I., **ERNST**, Robert K., et **BADER**, Martin W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, vol. 3, no 1, p. 36-46.

**MIOTTI**, Silvia, **NEGRI**, Donatella RM, **VALOTA**, Olga, et al. Level of anti-mouse-antibody response induced by bi-specific monoclonal antibody OC/TR in ovarian-carcinoma patients is associated with longer survival. *International journal of cancer*, 1999, vol. 84, no 1, p. 62-68.

**MOISSENET**, D., **KHEDHER**, M., et al. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. In : *Annales de biologie clinique*. 2011. p. 393-403.

**MONJARÁS FERIA**, Julia et **VALVANO**, Miguel A. An overview of anti-eukaryotic T6SS effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, p. 617.

**MONTAGNER**, Caroline, **ARQUINT**, Christian, et **CORNELIS**, Guy R. Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. *Journal of bacteriology*, 2011, vol. 193, no 24, p. 6923-6928.

**MONTELONGO-JAUREGUI**, Daniel, VILA, Taissa, SULTAN, Ahmed S., et al. Convalescent serum therapy for COVID-19: A 19th century remedy for a 21st century disease. In : *Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data*. Jenny Stanford Publishing, 2021. p. 857-867.

**MOODY**, M. Anthony et HAYNES, Barton F. Antigen-specific B cell detection reagents: use and quality control. *Cytometry Part A*, 2008, vol. 73, no 11, p. 1086-1092.

**MOORE**, Terri, ANANABA, Godwin A., BOLIER, Jacqueline, et al. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*, 2002, vol. 105, no 2, p. 213-221.

**MORAIS**, Victor. Antivenom therapy: efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2018, vol. 24.

**MORETTA**, Antonio, SCIEUZO, Carmen, PETRONE, Anna Maria, et al. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, vol. 11, p. 453.

**MORRISON**, Chris. Antibacterial antibodies gain traction. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, vol. 14, no 11, p. 737-739.

**MORRISON**, Sherie L., JOHNSON, M. Jacqueline, HERZENBERG, Leonard A., et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, vol. 81, no 21, p. 6851-6855.

**MOSS**, Joel, EHRMANTRAUT, Mary E., BANWART, Bruce D., et al. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infection and Immunity*, 2001, vol. 69, no 2, p. 1185-1188.

**MOTLEY**, Michael P., **BANERJEE**, Kasturi, et **FRIES**, Bettina C. Monoclonal antibody-based therapies for bacterial infections. *Current opinion in infectious diseases*, 2019, vol. 32, no 3, p. 210.

**MOYÁ**, Bartolomé, **BECEIRO**, Alejandro, **CABOT**, Gabriel, *et al.* Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, vol. 56, no 9, p. 4771-4778.

**MUELLER**, Catherine A., **BROZ**, Petr, **MÜLLER**, Shirley A., et al. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, 2005, vol. 310, no 5748, p. 674-676.

**MUKHERJEE**, Sampri et **BASSLER**, Bonnie L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, vol. 17, no 6, p. 371-382.

**MULLER**, Michael. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, vol. 41, no 11, p. 1670-1677.

**MURPHY**, Andrew J., **MACDONALD**, Lynn E., **STEVENS**, Sean, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, vol. 111, no 14, p. 5153-5158.

**MURPHY**, Kenneth et **WEAVER**, Casey. *Janeway's immunobiology*. Garland science, 2016.

**MURRAY**, Christopher JL, **IKUTA**, Kevin Shunji, **SHARARA**, Fablina, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 2022, vol. 399, no 10325, p. 629-655.

**MURRAY**, Gerald L., **ATTRIDGE**, Stephen R., et **MORONA**, Renato. Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Molecular microbiology*, 2003, vol. 47, no 5, p. 1395-1406.

**MYENI**, Sebenzile K., **WANG**, Lu, et **ZHOU**, Daoguo. SipB-SipC complex is essential for translocon formation. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no 3, p. e60499.

**NAGAOKA**, Kentaro, **YAMASHITA**, Yu, **KIMURA**, Hirokazu, et al. Anti-PcrV titers in non-cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, vol. 87, p. 54-59.

**NATHWANI**, Dilip, **RAMAN**, Gowri, **SULHAM**, Katherine, et al. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control*, 2014, vol. 3, no 1, p. 1-16.

**NELSON**, Aaron L., **DHIMOLEA**, Eugen, et **REICHERT**, Janice M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature reviews drug discovery*, 2010, vol. 9, no 10, p. 767-774.

**NG**, Wai-Leung et **BASSLER**, Bonnie L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 2009, vol. 43, p. 197.

**NIKAIDO**, Hiroshi et **TAKATSUKA**, Yumiko. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2009, vol. 1794, no 5, p. 769-781.

**NIVENS**, David E., **OHMAN**, Dennis E., **WILLIAMS**, Jessica, et al. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of bacteriology*, 2001, vol. 183, no 3, p. 1047-1057.

**O'TOOLE**, Ann, **RICKER**, Erica B., et **NUXOLL**, Eric. Thermal mitigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, 2015, vol. 31, no 8, p. 665-675.

**OECHSLIN**, Frank. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 2018, vol. 10, no 7, p. 351.

**OHNO**, Akira, **ISII**, Yosikazu, **TATEDA**, Kazuhiro, et al. Role of LPS length in clearance rate of bacteria from the bloodstream in mice. *Microbiology*, 1995, vol. 141, no 10, p. 2749-2756.

**OLIVER**, Antonio, **MULET**, Xavier, **LÓPEZ-CAUSAPÉ**, Carla, et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 2015, vol. 21, p. 41-59.

**O'NEILL**, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

**ORTEGA**, Bryan, **GROENEVELD**, AB Johan, et **SCHULTSZ**, Constance. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2004, vol. 25, no 10, p. 825-831.

**ORTH**, Peter, **XIAO**, Li, **HERNANDEZ**, Lorraine D., et al. Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by X-ray crystallography. *Journal of biological chemistry*, 2014, vol. 289, no 26, p. 18008-18021.

**O'TOOLE**, George A. et **KOLTER**, Roberto. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 1998, vol. 30, no 2, p. 295-304.

**OZER**, Eden, **YANIV**, Karin, **CHETRIT**, Einat, et al. An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. *Science advances*, 2021, vol. 7, no 24, p. eabg8581.

**OZER**, Egon A., NNAH, Ekpeno, DIDELOT, Xavier, et al. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of *exoU+* and *exoS+* lineages. *Genome biology and evolution*, 2019, vol. 11, no 7, p. 1780-1796.

PAMP, Sünje Johanna, GJERMANSEN, Morten, et TOLKER-NIELSEN, Tim. The biofilm matrix: a sticky framework. *Kjelleberg S, Givskov*, 2009.

**PANTOPHLET**, Ralph et BURTON, Dennis R. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annual review of immunology*, 2006, vol. 24, no 1, p. 739-769.

**PAPANIKOU**, Effrosyni, KARAMANOY, Spyridoula, et ECONOMOU, Anastassios. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, vol. 5, no 11, p. 839-851.

**PARMLEY**, Stephen F. et SMITH, George P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 1988, vol. 73, no 2, p. 305-318.

**PASCHALL**, Amy V., MIDDLETON, Dustin R., et AVCI, Fikri Y. Opsonophagocytic killing assay to assess immunological responses against bacterial pathogens. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2019, no 146, p. e59400.

**PASTOR**, Alexandrine, CHABERT, Jacqueline, LOUWAGIE, Mathilde, et al. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS microbiology letters*, 2005, vol. 253, no 1, p. 95-101.

**PATEL**, Gopi et BONOMO, Robert A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert review of anti-infective therapy*, 2011, vol. 9, no 5, p. 555-570.

**PECHOUS**, Roger D. et GOLDMAN, William E. Illuminating targets of bacterial secretion. *PLoS Pathogens*, 2015, vol. 11, no 8, p. e1004981.

**PEDERSON**, Kristin J. et BARBIERI, Joseph T. Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, 1998, vol. 30, no 4, p. 751-759.

**PEDERSON**, Kristin J., VALLIS, Amy J., AKTORIES, Klaus, et al. The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Molecular microbiology*, 1999, vol. 32, no 2, p. 393-401.

**PEDRIOLI**, Alessandro et OXENIUS, Annette. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends in immunology*, 2021, vol. 42, no 12, p. 1143-1158.

**PERSAT**, Alexandre, INCLAN, Yuki F., ENGEL, Joanne N., et al. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, vol. 112, no 24, p. 7563-7568.

**PETERSON**, Johnny W. *Bacterial pathogenesis. Medical Microbiology*. 4th edition, 1996.

**PETTERSSON**, Jonas, HOLMSTRÖM, Anna, HILL, Jim, et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Molecular microbiology*, 1999, vol. 32, no 5, p. 961-976.

**PFALZGRAFF**, Anja, BRANDENBURG, Klaus, et WEINDL, Günther. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in pharmacology*, 2018, vol. 9, p. 281.

**PHILLIPS**, Rebecca M., SIX, David A., DENNIS, Edward A., et al. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no 42, p. 41326-41332.

**PICKING**, Wendy L., NISHIOKA, Hiroaki, HEARN, Patricia D., et al. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and immunity*, 2005, vol. 73, no 3, p. 1432-1440.

**PIER**, Gerald B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International journal of medical microbiology*, 2007, vol. 297, no 5, p. 277-295.

**PIRNAY**, Jean-Paul, VERBEKEN, Gilbert, CEYSSENS, Pieter-Jan, et al. The magistral phage. *Viruses*, 2018, vol. 10, no 2, p. 64.

**POOLE**, Keith. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*, 2011, vol. 2, p. 65.

**QUALE**, John, BRATU, Simona, GUPTA, Jyoti, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, vol. 50, no 5, p. 1633-1641.

**QUINAUD**, Manuelle, CHABERT, Jacqueline, FAUDRY, Eric, et al. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 43, p. 36293-36300.

**QUINAUD**, Manuelle, PLÉ, Sophie, JOB, Viviana, et al. Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, vol. 104, no 19, p. 7803-7808.

**RADA**, Balázs et LETO, Thomas L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in microbiology*, 2013, vol. 21, no 2, p. 73-81.



**RAMÍREZ-ESTRADA**, Sergio, **BORGATTA**, Bárbara, et **RELLO**, Jordi. Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia management. *Infection and drug resistance*, 2016, vol. 9, p. 7.

**RAUTEMAA**, Riina et **MERI**, Seppo. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes and Infection*, 1999, vol. 1, no 10, p. 785-794.

**REBOUD**, Emeline, **BASSO**, Pauline, **MAILLARD**, Antoine P., et al. Exolysin shapes the virulence of Pseudomonas aeruginosa clonal outliers. *Toxins*, 2017, vol. 9, no 11, p. 364.

**REGISTRE FRANÇAIS DE LA MUCOVISCIDOSE** – Bilan des données 2021 Vaincre la Mucoviscidose Paris, août 2022

**REGO**, Ana Toste, **CHANDRAN**, Vidya, et **WAKSMAN**, Gabriel. Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochemical Journal*, 2010, vol. 425, no 3, p. 475-488.

**REICHOW**, Steve L., **KOROTKOV**, Konstantin V., **GONEN**, Melissa, et al. The binding of cholera toxin to the periplasmic vestibule of the type II secretion channel. *Channels*, 2011, vol. 5, no 3, p. 215-218.

**RICE**, Louis B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 2008, vol. 197, no 8, p. 1079-1081.

**RIECHMANN**, Lutz, **CLARK**, Michael, **WALDMANN**, Herman, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, vol. 332, no 6162, p. 323-327.

**ROCHA**, Claudia L., **COBURN**, Jenifer, **RUCKS**, Elizabeth A., et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A. 1 macrophages. *Infection and immunity*, 2003, vol. 71, no 9, p. 5296-5305.

**RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ**, José-Manuel, POIREL, Laurent, et NORDMANN, Patrice. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, vol. 53, no 11, p. 4783-4788.

**ROGERS**, Thomas F., ZHAO, Fangzhu, HUANG, Deli, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science*, 2020, vol. 369, no 6506, p. 956-963.

**ROLLET**, Cécile, GAL, Laurent, et GUZZO, Jean. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 2009, vol. 290, no 2, p. 135-142.

**ROTHER**, A., KLIMKA, A., TUR, M. K., et al. Construction of phage display libraries from reactive lymph nodes of breast carcinoma patients and selection for specifically binding human single chain Fv on cell lines. *International journal of molecular medicine*, 2004, vol. 14, no 4, p. 729-764.

**ROUX**, Damien, PIER, Gerald B., et SKURNIK, David. Magic bullets for the 21st century: the reemergence of immunotherapy for multi-and pan-resistant microbes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2012, vol. 67, no 12, p. 2785-2787.

**ROY**, Paul H., TETU, Sasha G., LAROUCHE, André, et al. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS one*, 2010, vol. 5, no 1, p. e8842.

**ROY-BURMAN**, Arup, SAVEL, Richard H., RACINE, Sara, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *The Journal of infectious diseases*, 2001, vol. 183, no 12, p. 1767-1774.

**RUSSELL**, Alistair B., HOOD, Rachel D., BUI, Nhat Khai, et al. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 2011, vol. 475, no 7356, p. 343-347.

**RUTHERFORD**, Steven T. et **BASSLER**, Bonnie L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, vol. 2, no 11, p. a012427.

**SAKAGUCHI**, Atsumi, **NAKAJIMA**, Chika, **SAWANO**, Ayuko, et al. Rapid and reliable hybridoma screening method that is suitable for production of functional structure-recognizing monoclonal antibody. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2021, vol. 131, no 6, p. 696-702.

**SALDÍAS**, M. Soledad, **ORTEGA**, Ximena, et **VALVANO**, Miguel A. Burkholderia cenocepacia O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *Journal of medical microbiology*, 2009, vol. 58, no 12, p. 1542-1548.

**SANA**, Thibault G., **BAUMANN**, Christoph, **MERDES**, Andreas, et al. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. *MBio*, 2015, vol. 6, no 3, p. e00712-15.

**SANA**, Thibault G., **HACHANI**, Abderrahman, **BUCIOR**, Iwona, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no 32, p. 27095-27105.

**SANDERS**, Rogier W., **DERKING**, Ronald, **CUPO**, Albert, et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS pathogens*, 2013, vol. 9, no 9, p. e1003618.

**SATO**, Hiromi, **FRANK**, Dara W., **HILLARD**, Cecilia J., et al. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *The EMBO journal*, 2003, vol. 22, no 12, p. 2959-2969.

**SAWA**, Teiji, KINOSHITA, Mao, INOUE, Keita, et al. Immunoglobulin for treating bacterial infections: One more mechanism of action. *Antibodies*, 2019, vol. 8, no 4, p. 52.

**SAWA**, Teiji, YAHR, Timothy L., OHARA, Maria, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature medicine*, 1999, vol. 5, no 4, p. 392-398.

**SAYNER**, Sarah L., FRANK, Dara W., KING, Judy, et al. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circulation research*, 2004, vol. 95, no 2, p. 196-203.

**SCHMIDTKE**, Amber J. et HANSON, Nancy D. Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, vol. 52, no 11, p. 3922-3927.

**SCHOEHN**, Guy, DI GUILMI, Anne Marie, LEMAIRE, David, et al. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *The EMBO journal*, 2003, vol. 22, no 19, p. 4957-4967.

**SCHOOLEY**, Robert T., BISWAS, Biswajit, GILL, Jason J., et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017, vol. 61, no 10, p. e00954-17.

**SCHROFF**, Robert W., FOON, Kenneth A., BEATTY, Shannon M., et al. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer research*, 1985, vol. 45, no 2, p. 879-885.

**SCHULERT**, Grant S., FELTMAN, Heather, RABIN, Shira DP, et al. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, 2003, vol. 188, no 11, p. 1695-1706.

**SCHUSTER**, Martin, LOSTROH, C. Phoebe, OGI, Tomoo, et al. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*, 2003, vol. 185, no 7, p. 2066-2079.

**SEO**, Min-Duk, WON, Hyung-Sik, KIM, Ji-Hun, et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*, 2012, vol. 17, no 10, p. 12276-12286.

**SERRA**, Raffaele, GRANDE, Raffaele, BUTRICO, Lucia, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*, 2015, vol. 13, no 5, p. 605-613.

**SHAFIKHANI**, Sasha H. et ENGEL, Joanne. *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no 42, p. 15605-15610.

**SHAVER**, Ciara M. et HAUSER, Alan R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and immunity*, 2004, vol. 72, no 12, p. 6969-6977.

**SHEETS**, Michael D., AMERSDORFER, Peter, FINNERN, Ricarda, et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, vol. 95, no 11, p. 6157-6162.

**SHERE**, Kalpana D., SALLUSTIO, Sandra, MANESSIS, Anastasios, et al. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Molecular microbiology*, 1997, vol. 25, no 3, p. 451-462.

**SHEVCHIK**, Vladimir E., ROBERT-BAUDOY, Janine, et CONDEMINE, Guy. Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general

secretory pathway, and secreted proteins. *The EMBO journal*, 1997, vol. 16, no 11, p. 3007-3016.

**SHI**, Wei, LIAO, Yang, WILLIS, Simon N., et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nature immunology*, 2015, vol. 16, no 6, p. 663-673.

**SHIELDS**, Robert L., LAI, Jadine, KECK, Rodney, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no 30, p. 26733-26740.

SIATKOWSKI, R. Michael, TYUTYUNIKOV, Anna, BIGLAN, Albert W., et al. Serum antibody production to botulinum A toxin. *Ophthalmology*, 1993, vol. 100, no 12, p. 1861-1866.

**SLIFKA**, Mark K. et AMANNA, Ian J. Passive immunization. *Plotkin's Vaccines*, 2018, p. 84.

**SMITH**, George P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, vol. 228, no 4705, p. 1315-1317.

**SMITH**, Kenneth, GARMAN, Lori, WRAMMERT, Jens, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nature protocols*, 2009, vol. 4, no 3, p. 372-384.

**SMITH**, Richard et COAST, Joanna. The true cost of antimicrobial resistance. *Bmj*, 2013, vol. 346.

**SMITH**, Scott A. et CROWE, JR, James E. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiology spectrum*, 2015, vol. 3, no 1, p. 3.1. 05.

**SONG**, Y., BAER, M., SRINIVASAN, R., et al. PcrV antibody–antibiotic combination improves survival in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2012, vol. 31, no 8, p. 1837-1845.

**SONG**, Zhijun, WU, Hong, CIOFU, Oana, et al. Pseudomonas aeruginosa alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. *Journal of medical microbiology*, 2003, vol. 52, no 9, p. 731-740.

**SPIESS**, Christoph, ZHAI, Qianting, et CARTER, Paul J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular immunology*, 2015, vol. 67, no 2, p. 95-106.

**SRIAROON**, Panida et BALLOW, Mark. Immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *Immunology and Allergy Clinics*, 2015, vol. 35, no 4, p. 713-730.

STEINWAND, Miriam, DROSTE, Patrick, FRENZEL, André, et al. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. In : *MABs*. Taylor & Francis, 2014. p. 204-218.

**STIEHM**, E. Richard, KELLER, Margaret A., et VYAS, Girish N. Preparation and use of therapeutic antibodies primarily of human origin. *Biologicals*, 2008, vol. 36, no 6, p. 363-374.

**STOVER**, C. K<sup>†</sup>, PHAM, X. Q<sup>†</sup>, ERWIN, A. L., et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, vol. 406, no 6799, p. 959-964.

**STUDNICKA**, Gary M., SOARES, Sandra, BETTER, Marc, et al. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1994, vol. 7, no 6, p. 805-814.

**SUBRAMANIAN**, G. Mani, CRONIN, Patrick W., POLEY, Gerald, et al. A phase 1 study of PAmAb, a fully human monoclonal antibody against Bacillus anthracis protective antigen, in healthy volunteers. *Clinical infectious diseases*, 2005, vol. 41, no 1, p. 12-20.

**SULAKVELIDZE**, Alexander, ALAVIDZE, Zemphira, et MORRIS JR, J. Glenn. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, no 3, p. 649-659.

**SUMMERS**, William C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, vol. 2, no 2, p. 130-133.

**SUN**, Daqian, ACCAVITTI, M. A., et BRYERS, J. D. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2005, vol. 12, no 1, p. 93-100.

**SUN**, Jianjun et BARBIERI, Joseph T. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no 35, p. 32794-32800.

**SUTCLIFFE**, Iain C. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends in microbiology*, 2010, vol. 18, no 10, p. 464-470.

**SYBESMA**, Wilbert, ROHDE, Christine, et al. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy—part II. *Antibiotics*, 2018, vol. 7, no 2, p. 35.

**TABOR**, D. E., OGANESYAN, V., KELLER, A. E., et al. *Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl, the molecular targets of bispecific antibody MEDI3902, are conserved among diverse global clinical isolates. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, vol. 218, no 12, p. 1983-1994.

**TACCONELLI**, Evelina, CARRARA, Elena, SAVOLDI, Alessia, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 2018, vol. 18, no 3, p. 318-327.

**TALÀ**, Lorenzo, FINEBERG, Adam, KUKURA, Philipp, et al. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nature microbiology*, 2019, vol. 4, no 5, p. 774-780.



**THEURETZBACHER**, Ursula, **OUTTERSON**, Kevin, **ENGEL**, Aleks, *et al.* The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, vol. 18, no 5, p. 275-285.

**THI**, Minh Tam Tran, **WIBOWO**, David, *et* **REHM**, Bernd HA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 2020, vol. 21, no 22, p. 8671.

**TIDWELL**, Thomas T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of  $\beta$ -lactam synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, vol. 47, no 6, p. 1016-1020.

**TILLER**, Thomas, **MEFFRE**, Eric, **YURASOV**, Sergey, *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *Journal of immunological methods*, 2008, vol. 329, no 1-2, p. 112-124.

**TRIAS**, J. *et* **NIKAIDO**, H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1990, vol. 34, no 1, p. 52-57.

**TSUCHIYA**, Yuko *et* **MIZUGUCHI**, Kenji. The diversity of H 3 loops determines the antigen-binding tendencies of antibody CDR loops. *Protein Science*, 2016, vol. 25, no 4, p. 815-825.

**TSURUSHITA**, Naoya, **HINTON**, Paul R., *et* **KUMAR**, Shankar. Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax. *Methods*, 2005, vol. 36, no 1, p. 69-83.

**VACCA**, Fabiola, **SALA**, Claudia, *et* **RAPPUOLI**, Rino. Monoclonal Antibodies for Bacterial Pathogens: Mechanisms of Action and Engineering Approaches for Enhanced Effector Functions. *Biomedicines*, 2022, vol. 10, no 9, p. 2126.

**VALLIS**, Amy J., **FINCK-BARBANÇON**, Viviane, **YAHR**, Timothy L., *et al.* Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infection and immunity*, 1999, vol. 67, no 4, p. 2040-2044.

**VAN BELLEGHEM**, Jonas D., **DĄBROWSKA**, Krystyna, **VANEECHOUTTE**, Mario, et al. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses*, 2018, vol. 11, no 1, p. 10.

**VAN ULSEN**, Peter, **VAN ALPHEN**, Loek, **TEN HOVE**, Jan, et al. A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Molecular microbiology*, 2003, vol. 50, no 3, p. 1017-1030.

**VARSHNEY**, Avanish K., **KUZMICHEVA**, Galina A., **LIN**, Jian, et al. A natural human monoclonal antibody targeting Staphylococcus Protein A protects against Staphylococcus aureus bacteremia. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no 1, p. e0190537.

**VASIL**, Michael L., **LE ROY**, M. Graham, **OSTROFF**, Rachel M., et al. Phospholipase C: Molecular Biology and Contribution to the Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa in human diseases*, 1991, vol. 44, p. 34-47.

**VEROVE**, Julien, **BERNARDE**, Cédric, **BOHN**, Yu-Sing Tammy, et al. Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 1, p. e30488.

**VIDARSSON**, Gestur, **DEKKERS**, Gillian, et **RISPENS**, Theo. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 2014, vol. 5, p. 520.

**VISCIDI**, R., **LAUGHON**, B. E., **YOLKEN**, R., et al. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Journal of Infectious Diseases*, 1983, vol. 148, no 1, p. 93-100.

**VOULHOUX**, Romé, **BALL**, Geneviève, **IZE**, Bérengère, et al. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *The EMBO journal*, 2001, vol. 20, no 23, p. 6735-6741.

**WAGNER**, Victoria E., GILLIS, Richard J., et IGLEWSKI, Barbara H. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 2004, vol. 22, p. S15-S20.

**WALDMANN**, Herman. Human monoclonal antibodies: the benefits of humanization. *Human Monoclonal Antibodies*, 2019, p. 1-10.

**WALKER**, Laura M., HUBER, Michael, DOORES, Katie J., et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*, 2011, vol. 477, no 7365, p. 466-470.

**WALKER**, Laura M., PHOGAT, Sanjay K., CHAN-HUI, Po-Ying, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, 2009, vol. 326, no 5950, p. 285-289.

**WANDERSMAN**, Cécile et DELEPELAIRE, Philippe. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology*, 2004, vol. 58, p. 611.

**WANG**, C. Y., JERNG, J. S., CHENG, K. Y., et al. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006, vol. 12, no 1, p. 63-68.

**WANG**, Hui, CHEN, Daijie, et LU, Huili. Anti-bacterial monoclonal antibodies: next generation therapy against superbugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, p. 1-16.

**WANG**, Qin, LI, Huayin, ZHOU, Jian, et al. PcrV antibody protects multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2014, vol. 193, p. 21-28.

**WANG**, Xian-zhe, COLJEE, Vincent W., et MAYNARD, Jennifer A. Back to the future: recombinant polyclonal antibody therapeutics. *Current opinion in chemical engineering*, 2013, vol. 2, no 4, p. 405-415.

**WANG-LIN**, Shun Xin et **BALTHASAR**, Joseph P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for the use of monoclonal antibodies in the treatment of bacterial infections. *Antibodies*, 2018, vol. 7, no 1, p. 5.

**WARRENER**, Paul, **VARKEY**, Reena, **BONNELL**, Jessica C., et al. A novel anti-PcrV antibody providing enhanced protection against *Pseudomonas aeruginosa* in multiple animal infection models. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014, vol. 58, no 8, p. 4384-4391.

**WEINER**, Lindsey M., **WEBB**, Amy K., **LIMBAGO**, Brandi, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *infection control & hospital epidemiology*, 2016, vol. 37, no 11, p. 1288-1301.

**WENZEL**, Esther Veronika, **BOSNAK**, Margarita, **TIERNEY**, Robert, et al. Human antibodies neutralizing diphtheria toxin in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 2020, vol. 10, no 1, p. 1-21.

**WHITFIELD**, Chris et **TRENT**, M. Stephen. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annual review of biochemistry*, 2014, vol. 83, p. 99-128.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION**, et al. 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. 2022.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION**, et al. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2022–2020 Data. 2022.

**WIENER-KRONISH**, JEANINE P., **SAKUMA**, TSUTOMO, **KUDOH**, **ICHIDAI**, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *Journal of applied physiology*, 1993, vol. 75, no 4, p. 1661-1669.

**WILCOX**, Mark H., GERDING, Dale N., POXTON, Ian R., et al. Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 2017, vol. 376, no 4, p. 305-317.

**WILHELM**, Susanne, GDYNIA, Aneta, TIELEN, Petra, et al. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 2007, vol. 189, no 18, p. 6695-6703.

**WILHELM**, Susanne, TOMMASSEN, Jan, et JAEGER, Karl-Erich. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 1999, vol. 181, no 22, p. 6977-6986.

**WILLIAMS**, P., & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 182-191. Novick, R. P., & Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*, 42, 541-564.

**WILLIAMS**, P., LAMBERT, P. A., HAIGH, C. G., et al. The influence of the O and K antigens of *Klebsiella aerogenes* on surface hydrophobicity and susceptibility to phagocytosis and antimicrobial agents. *Journal of medical microbiology*, 1986, vol. 21, no 2, p. 125-132.

**WINTER**, Greg, GRIFFITHS, Andrew D., HAWKINS, Robert E., et al. Making antibodies by phage display technology. *Annual review of immunology*, 1994, vol. 12, no 1, p. 433-455.

**WITTEBOLE**, Xavier, DE ROOCK, Sophie, et OPAL, Steven M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 2014, vol. 5, no 1, p. 226-235.

**WOOD**, Thomas E., HOWARD, Sophie A., FÖRSTER, Andreas, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS delivers a periplasmic toxin that disrupts bacterial cell morphology. *Cell reports*, 2019, vol. 29, no 1, p. 187-201. e7.

**WRAMMERT**, Jens, SMITH, Kenneth, MILLER, Joe, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*, 2008, vol. 453, no 7195, p. 667-671.

**WRIGHT**, Ann, TAO, Mi-hua, KABAT, E. A., et al. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *The EMBO journal*, 1991, vol. 10, no 10, p. 2717-2723.

**WU**, Xueling, YANG, Zhi-Yong, LI, Yuxing, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*, 2010, vol. 329, no 5993, p. 856-861.

**YAHR**, Timothy L., MENDE-MUELLER, LIANE M., FRIESE, Matthew B., et al. Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *Journal of bacteriology*, 1997, vol. 179, no 22, p. 7165-7168.

**YAHR**, Timothy L., VALLIS, Amy J., HANCOCK, Michael K., et al. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, vol. 95, no 23, p. 13899-13904.

**YUMEREFENDI**, Hayretin, TARENDEAU, Franck, MAS, Philippe J., *et al.* ESPRIT: an automated, library-based method for mapping and soluble expression of protein domains from challenging targets. *Journal of structural biology*, 2010, vol. 172, no 1, p. 66-74.

**ZHAVI**, David et WEINER, Louis. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies*, 2020, vol. 9, no 3, p. 34.

**ZAROFF**, Samantha et TAN, Grace. Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *Biotechniques*, 2019, vol. 67, no 3, p. 90-92.

**ZHOU**, Tongqing, GEORGIEV, Ivelin, WU, Xueling, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*, 2010, vol. 329, no 5993, p. 811-817.

**ZHU**, Henderson, ROLLIER, Christine S., et POLLARD, Andrew J. Recent advances in lipopolysaccharide-based glycoconjugate vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 2021, vol. 20, no 12, p. 1515-1538.

### **Isolement d'anticorps monoclonaux humains à visée thérapeutique contre le système de sécrétion de type III de *Pseudomonas aeruginosa*.**

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes est un problème de santé publique croissant. Ainsi *Pseudomonas aeruginosa* fait partie des pathogènes hautement virulents et résistants pour lesquels le développement de stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques est prioritaire selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Des anticorps monoclonaux bloquant les facteurs de virulence bactériens pourraient constituer une telle alternative thérapeutique. Notre objectif a donc été d'isoler, à partir de patients chroniquement infectés par *Pseudomonas aeruginosa*, des anticorps monoclonaux capables de bloquer le système de sécrétion de type 3 (SST3) de cette bactérie. Le SST3 est une nanomachine macromoléculaire formant une aiguille à la surface de la bactérie et permettant l'injection de toxines dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Ce système a été décrit comme un mécanisme majeur de pathogenèse de *Pseudomonas aeruginosa*. Grâce à une approche de tri par cytométrie de flux de cellules B mémoires spécifiques nous avons isolé des anticorps monoclonaux contre deux protéines du SST3, PcrV et PscF. Deux anticorps reconnaissant PcrV ont démontré une activité d'inhibition du SST3 et vont être étudiés pour leur potentiel thérapeutique. Notre approche pourra dans le futur être étendue à l'isolement d'anticorps contre d'autres facteurs de virulence et d'autres bactéries, permettant potentiellement le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques pour contrer la résistance aux antibiotiques.

### **Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies against the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*.**

Antibiotic resistance in pathogenic bacteria is a growing public health problem. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the highly virulent and resistant pathogens for which the development of alternative therapeutic strategies to antibiotics is a priority according to the World Health Organization. Monoclonal antibodies blocking bacterial virulence factors could constitute such a therapeutic alternative. Our objective was therefore to isolate, from patients chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*, monoclonal antibodies capable of blocking the type 3 secretion system (T3SS) of this bacterium. The T3SS is a macromolecular nanomachine that forms a needle on the surface of the bacterium and allows the injection of toxins into the cytoplasm of host cells. This system has been described as a major mechanism of pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. Using a flow cytometry sorting approach of specific memory B cells, we isolated monoclonal antibodies against two T3SS proteins, PcrV and PscF. Two antibodies directed against PcrV showed T3SS inhibitory activity and will be studied for their therapeutic potential. Our approach can be extended in the future to the isolation of antibodies against other virulence factors and other bacteria, potentially allowing the development of therapeutic monoclonal antibodies to counter antibiotic resistance.