

Titre de la thèse	Polymères à empreintes moléculaires en tant qu'inhibiteurs de <i>quorum sensing</i> pour une stratégie anti-biofilms marins
Ecole Doctorale	ED548
Laboratoire	MAPIEM
Discipline	Chimie/Biochimie
Directeur(s) de Thèse & Encadrant(s)	Directrice : Catherine BRANGER Co-encadrante : Annick ORTALO-MAGNE

Description du sujet de recherche

CONTEXTE, ORIGINALITE ET PERTINENCE PAR RAPPORT A L'ETAT DE L'ART :

Toute structure ou équipement immergé présente le risque de développement d'un biofilm à sa surface. Ceci est particulièrement vrai dans le milieu marin avec un impact économique et écologique considérable [1]. Dans ce cas, la formation de biosalissures (*biofouling*) affecte de nombreux domaines (navigation, traitement des eaux, aquaculture, ...). Le *biofouling*, avec ses macro-salissures venant coloniser une surface immergée, fait suite à la formation d'un biofilm, c'est-à-dire d'une communauté de microorganismes maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice [2]. L'inhibition de la formation du biofilm apparaît donc comme un moyen de prévention du *biofouling*. Différentes stratégies peuvent être mises en œuvre pour atteindre ce but, parmi lesquelles celle basée sur la perturbation de la communication entre microorganismes. C'est à ce niveau que s'inscrivent les travaux de recherche de cette thèse dont l'objectif est la conception d'un moyen de lutte contre la formation de biofilms marins.

Au sein des biofilms, les bactéries interagissent entre elles en particulier au moyen d'un système de communication chimique dit de *quorum sensing* (QS). Sous l'effet du QS, elles peuvent coopérer ou au contraire s'opposer, adaptant leur comportement biologique. Le QS, aussi bien intra- qu'inter-espèces, est lié à une production continue de petites molécules-signal appelées autoinducteurs (AI) qui sont sécrétées par les cellules et se dispersent dans le milieu environnant. La concentration de ces molécules dans l'environnement dépend donc de la densité cellulaire, qui, augmentant, va entraîner une production d'AI croissante. Lorsque le quorum - concentration seuil- est atteint, il est responsable de la régulation de l'expression de certains gènes utiles pour, notamment, la colonisation, c'est à dire la formation d'un biofilm. Le *quorum quenching* (QQ, inhibition du *quorum sensing*) apparaît donc être une voie déterminante dans une stratégie anti-biofilm. Il peut être réalisé par (i) des molécules inhibitrices du QS qui vont inhiber la production ou la perception des AI au niveau des cellules bactériennes, (ii) la séquestration des AI, par exemple par des anticorps ou des molécules-cages de type cyclodextrines, ou (iii) la dégradation des AI par des enzymes spécifiques [2]. Pour les voies (ii) et (iii), quelques polymères à empreintes moléculaires (MIP) ont récemment été utilisés [3]. En effet, les MIP, également appelés « anticorps plastiques », sont des matériaux permettant de reconnaître de façon spécifique une espèce cible [4].

Ainsi, dans le cas du QQ, la cible peut être soit un AI (voie (ii)), soit un analogue d'état de transition de la dégradation d'un AI (voie (iii)).

Les MIP sont des réseaux polymères tridimensionnels préparés en présence d'une espèce cible autour de laquelle est construit le réseau polymère grâce à des interactions entre la cible et un (ou plusieurs) monomère(s) fonctionnel(s). A l'issue de la copolymérisation avec un agent réticulant, le relargage de l'espèce cible génère des cavités dites empreintes incorporant des fonctionnalités complémentaires à cette espèce. Ces matériaux présentent donc un haut pouvoir de reconnaissance et sont, par ailleurs, très stables, faciles et peu chers à fabriquer ; ils peuvent être stockés sur des durées assez longues avant utilisation [5]. Les domaines d'application des MIP vont ainsi de l'extraction sélective (chromatographie, extraction en phase solide), aux capteurs, en passant par les tests pseudo-immunologiques et la catalyse [6].

Différents types d'AI associés au QS ont été identifiés. Sur la base de leur structure, il est possible d'en reconnaître trois classes en milieu marin, dont celle des homosérines lactones acylées (AHL) (Fig.1) [7]. Les AHL sont les AI du QS des bactéries Gram négatives, bactéries prédominantes dans le milieu marin [8]. La littérature fait état d'une dizaine de travaux dans lesquels sont développés des MIP pour les AHL, la majorité d'entre eux étant destinés à la détection de ces AI, pour une application en tant que capteurs, en particulier dans le domaine médical [3]. Quelques exemples concernent le QQ par séquestration d'AHL [9–11] et un par dégradation d'AHL catalysée par un MIP [12].

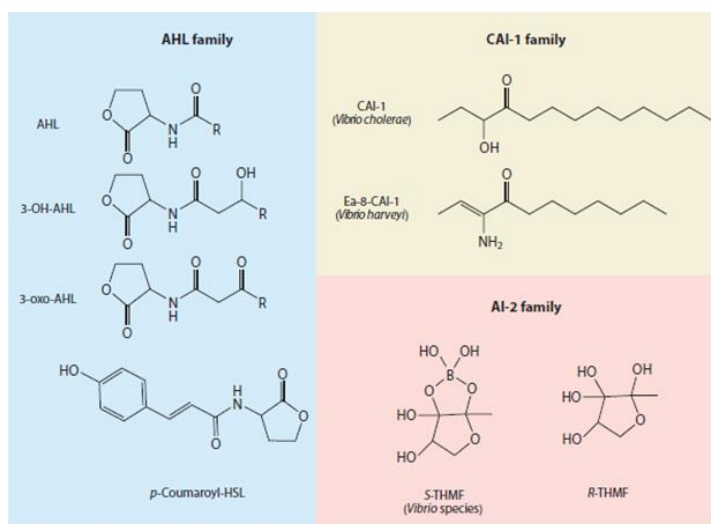


Figure 1. Exemples d'autoinducteurs du quorum sensing en milieu marin [7]

OBJECTIFS :

Dans ce contexte, cette thèse vise à développer une stratégie d'inhibition innovante de la formation des biofilms en milieu marin, écoresponsable, c'est-à-dire sans interférence avec l'écosystème. Cette stratégie s'appuie sur le QQ par des MIP pour une reconnaissance et inactivation subséquente spécifique des AI. L'étude bibliographique a montré la pertinence et l'originalité de cette démarche, qui, à notre connaissance, n'a pas été appliquée à l'heure actuelle au milieu marin.

Les travaux de thèse vont pouvoir s'appuyer sur l'expertise du laboratoire MAPIEM dans le domaine des MIPs ainsi que dans l'étude des biofilms marins.

Les objectifs sont donc les suivants :

1. Elaborer des MIP spécifiques d'AHL et caractériser leur action QQ en se basant sur la voie de la séquestration des AI (Fig.2.a).
2. Afin d'élargir le champ d'action de ces MIP sur différentes bactéries, les travaux de thèse ne seront pas limités à une AHL-cible, mais une spécificité de groupe visant des familles d'AHL structurellement apparentées sera envisagée.
3. En fonction des résultats obtenus, il sera ensuite envisagé, soit de viser une

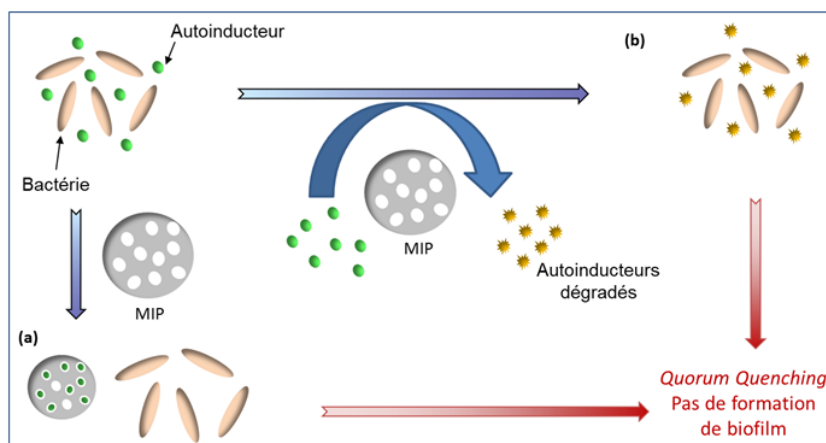


Figure 2. Principe de lutte contre la formation de biofilm par (a) capture des autoinducteurs ou (b) catalyse de la dégradation des autoinducteurs

autre famille d'AI (AI-2 de la Fig.1), soit d'explorer la voie de la dégradation catalytique des AI (Fig.2.b).

Une étape ultérieure pourrait consister à définir les paramètres de modification des MIP pour leur structuration en un film qui viendrait recouvrir la surface devant être immergée, et ainsi la protéger d'un développement rapide d'un biofilm.

METHODES :

En termes de méthodes, les travaux seront basés sur plusieurs étapes successives, détaillées ci-dessous, interconnectées de façon à optimiser l'activité anti-biofilm marin recherchée pour les MIP synthétisés.

1. Synthèse des MIP

Dans un premier temps, il s'agira d'identifier le/les monomères fonctionnels permettant d'interagir avec la cible choisie. Ensuite, les MIP seront synthétisés en se basant sur le savoir-faire développé au laboratoire dans ce domaine. Afin d'évaluer l'effet d'empreinte et son impact sur l'action QQ, des polymères de contrôle (NIP ou polymère non-imprimés) seront systématiquement synthétisés selon le même mode opératoire mais en absence de l'espèce cible.

Les MIP et NIP seront ensuite caractérisés d'un point de vue physico-chimique afin de pouvoir établir des relations structure-propriétés. Leurs propriétés de reconnaissance des espèces cibles seront évaluées par HPLC-MS.

2. Caractérisation des propriétés de QQ des MIP

L'absence de toxicité des MIP et des NIP sera vérifiée sur des cellules bactériennes, avant de procéder à des tests d'inhibition de bioluminescence par QQ, puis des tests d'activité anti-biofilm. Ces derniers feront appel à des techniques d'analyses microscopiques (confocales -CLSM- et à balayage -MEB-) pour une mesure des volumes de biofilm et du taux de recouvrement de la surface colonisée, et des analyses colorimétriques (crystal violet) pour une quantification du biofilm. Toutes les expériences seront réalisées en triplicat. Différentes concentrations de MIP seront testées pour la recherche d'un effet dose-dépendant en comparaison aux cultures témoins (concentration nulle).

RETOMBÉES ATTENDUES :

Les travaux envisagés dans le cadre de cette thèse s'inscrivent parfaitement dans les domaines d'activité du laboratoire MAPIEM et dans l'axe identitaire Mer de l'Université de Toulon. Les perspectives d'application pourraient être grandes, ne serait-ce qu'à l'échelle du milieu marin avec toutes les problématiques liées au développement de biofilms sur les surfaces immergées. Concevoir des MIP anti-QS pour un effet anti-biofilm est une première étape d'une stratégie pouvant s'intégrer pleinement dans un plan d'action nécessairement plus complexe visant à limiter le développement de salissures sur ces surfaces.

Plus largement, la problématique du développement de biofilms ne concerne pas uniquement le milieu marin car elle représente également un souci de santé publique. Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette thèse pourraient également être utiles à la communauté scientifique pour la lutte contre des infections ou des contaminations dans les milieux médicaux et agro-alimentaires.

MOTS CLES : polymères à empreintes moléculaires (MIP) ; biofilms marins ; *quorum sensing* (QS) ; *quorum quenching* (QQ)

RÉFÉRENCES :

- [1] E. Védie, H. Brisset, J.-F. Briand, C. Bressy, Bioinspiration and Microtopography As Nontoxic Strategies for Marine Bioadhesion Control, *Adv. Mater. Interfaces*. 8 (2021) 2100994. <https://doi.org/10.1002/admi.202100994>.
- [2] B. Rémy, S. Mion, L. Plener, M. Elias, E. Chabrière, D. Daudé, Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 203. <https://doi.org/doi: 10.3389/fphar.2018.00203>.

- [3] B. Tse Sum Bui, T. Auroy, K. Haupt, Fighting Antibiotic-Resistant Bacteria: Promising Strategies Orchestrated by Molecularly Imprinted Polymers, *Angew. Chem. Int. Ed.* 61 (2022) e202106493. <https://doi.org/10.1002/anie.202106493>.
- [4] J.L. Bowen, P. Manesiotis, C.J. Allender, Twenty years since ‘antibody mimics’ by molecular imprinting were first proposed: A critical perspective, *Mol. Imprinting.* 1 (2013). <https://doi.org/10.2478/molim-2013-0001>.
- [5] J.J. BelBruno, Molecularly Imprinted Polymers, *Chem. Rev.* 119 (2019) 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>.
- [6] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O’Mahony, M.J. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106–180. <https://doi.org/10.1002/jmr.760>.
- [7] L.R. Hmelo, Quorum Sensing in Marine Microbial Environments, *Annu. Rev. Mar. Sci.* 9 (2017) 257–281. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060656>.
- [8] A. Borges, M. Simões, Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria, *Mar. Drugs.* 17 (2019) 427. <https://doi.org/10.3390/md17070427>.
- [9] E.V. Piletska, G. Stavroulakis, K. Karim, M.J. Whitcombe, I. Chianella, A. Sharma, K.E. Eboigbodin, G.K. Robinson, S.A. Piletsky, Attenuation of *Vibrio fischeri* Quorum Sensing Using Rationally Designed Polymers, *Biomacromolecules.* 11 (2010) 975–980. <https://doi.org/10.1021/bm901451j>.
- [10] E.V. Piletska, G. Stavroulakis, L.D. Larcombe, M.J. Whitcombe, A. Sharma, S. Primrose, G.K. Robinson, S.A. Piletsky, Passive Control of Quorum Sensing: Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation by Imprinted Polymers, *Biomacromolecules.* 12 (2011) 1067–1071. <https://doi.org/10.1021/bm101410q>.
- [11] L. Ma, S. Feng, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock, X. Lu, Development of Molecularly Imprinted Polymers To Block Quorum Sensing and Inhibit Bacterial Biofilm Formation, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10 (2018) 18450–18457. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01584>.
- [12] J. Garcia Lopez, E.V. Piletska, M.J. Whitcombe, J. Czulak, S.A. Piletsky, Application of molecularly imprinted polymer nanoparticles for degradation of the bacterial autoinducer *N*-hexanoyl homoserine lactone, *Chem. Commun.* 55 (2019) 2664–2667. <https://doi.org/10.1039/C8CC07685E>.

Encadrement et conditions matérielles pour le doctorant

La thèse se déroulera au sein du laboratoire MAPIEM de l’Université de Toulon, avec un plein accès donné aux laboratoires, matériels et équipements nécessaires au bon déroulement des manipulations de la thèse. Le(la) doctorant(e) sera installé(e) dans un bureau et disposera d’un ordinateur. L’encadrement sera assuré par le Dr Catherine Branger pour la partie synthèse et caractérisation des polymères, et par le Dr Annick Ortalo-Magné pour les tests d’activité anti-QS et anti-biofilm. Toutes deux sont enseignants-chercheurs au sein du laboratoire MAPIEM.

Concernant les expériences de tests microbiologiques, les rudiments de la culture bactérienne nécessaires à leur réalisation seront enseignés au doctorant. Pour cette partie très spécifique, l’appui d’un stagiaire sera envisagé, en respect de la volonté du doctorant.

Compétences attendues et personnes à contacter

Compétences attendues :

Le/la candidat(e) aura des compétences en chimie des polymères et chimie organique. Des compétences acquises en biochimie seront un plus, avec un vif intérêt pour les tests microbiologiques dont la réalisation, ou au moins la supervision, rentre dans le déroulement de la thèse.

Personne(s) à contacter :

Catherine Branger : branger@univ-tln.fr

Annick Ortalo-Magné : annick.ortalo-magne@univ-tln.fr