



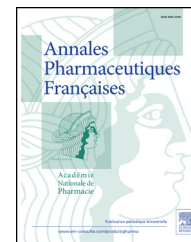
ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques ?

Enzymes for disrupting bacterial communication, an alternative to antibiotics?

B. Rémy^{a,b}, L. Plener^b, M. Elias^c, D. Daudé^{b,*},
E. Chabrière^{a,*}

^a IRD 198, Inserm 1095, URMITE, UM63, CNRS 7278, Aix Marseille université, 13385 Marseille cedex 05, France

^b Gene&GreenTK, faculté de médecine, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

^c Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics & Biotechnology Institute, University of Minnesota, 55108 St. Paul, MN, États-Unis

Reçu le 11 avril 2016 ; reçu sous la forme révisée le 20 juin 2016 ; accepté le 28 juin 2016

MOTS CLÉS

Quorum sensing ;
Virulence
bactérienne ;
Quorum quenching ;
Biofilm ;
Lactonase

Résumé De nombreuses bactéries utilisent un système de communication, appelé *quorum sensing* (QS), pour échanger de l'information et synchroniser leur comportement proportionnellement à leur densité de population. Pour cela, elles utilisent des molécules médiatrices, les auto-inducteurs (AI), sécrétées dans l'environnement pour se signaler les unes aux autres et réguler l'expression de certains gènes. Les caractères phénotypiques régulés par le QS sont multiples mais certains tels que la pathogénicité, la formation de biofilm ou la résistance aux agents antibactériens sont particulièrement problématiques. Cibler le QS afin de bloquer la communication bactérienne constitue une approche prometteuse pour contrôler les bactéries. Cette stratégie, appelée *quorum quenching* (QQ), peut être réalisée en utilisant des molécules inhibitrices du QS ou des enzymes dégradant les AI. Le QQ présente un fort intérêt car, contrairement aux antibiotiques, il n'induit pas la mort de la bactérie mais l'empêche simplement d'adopter certains phénotypes comme la virulence. Même si la pression de sélection appliquée n'est pas nulle, elle n'en reste pas moins faible comparée aux méthodes bactéricides et devrait limiter l'apparition de phénomène de résistance. L'utilisation d'enzymes est notamment prometteuse car elles peuvent être utilisées, de manière extracellulaire et en quantité

* Auteurs correspondants.

Adresses e-mail : david.daude@gene-greentk.com (D. Daudé), eric.chabriere@univ-amu.fr (E. Chabrière).

catalytique, pour dégrader les molécules médiateurs secrétées dans l'environnement. Cette revue dresse un inventaire des différentes applications médicales du QQ par voie enzymatique avant de s'intéresser aux éventuels phénomènes de résistance qui pourraient émerger.

© 2016 Académie Nationale de Pharmacie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Quorum sensing;
Bacterial virulence;
Quorum quenching;
Biofilm;
Lactonase

Summary Quorum sensing (QS) is used by bacteria to communicate and synchronize their actions according to the cell density. In this way, they produce and secrete in the surrounding environment small molecules dubbed autoinducers (AIs) that regulate the expression of certain genes. The phenotypic traits regulated by QS are diverse and include pathogenicity, biofilm formation or resistance to anti-microbial treatments. The strategy, aiming at disrupting QS, known as quorum quenching (QQ), has emerged to counteract bacterial virulence and involves QS-inhibitors (QSI) or QQ-enzymes degrading AIs. Differently from antibiotics, QQ aims at blocking cell signaling and does not alter bacterial survival. This considerably decreases the selection pressure as compared to bactericide treatments and may reduce the occurrence of resistance mechanisms. QQ-enzymes are particularly appealing as they may disrupt molecular QS-signal without entering the cell and in a catalytic way. This review covers several aspects of QQ-based medical applications and the potential subsequent emergence of resistance is discussed.

© 2016 Académie Nationale de Pharmacie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

La communication bactérienne, appelée *quorum sensing* (QS), est un mécanisme moléculaire permettant aux bactéries d'adapter leur comportement en fonction de la densité de population [1]. Les bactéries produisent des molécules médiateurs, les auto-inducteurs (AI), qui sont secrétées dans l'environnement et sont perçues par les récepteurs spécifiques des bactéries voisines. Ce mécanisme régule l'expression de nombreux gènes et a fait l'objet de plusieurs revues [2,3]. La réponse des bactéries au QS varie selon les microorganismes, mais certains traits comme la motilité, la production de divers facteurs (sidérophores, exo-polysaccharides, exo-enzymes, antibiotiques), les systèmes de sécrétion et la formation du biofilm semblent communs.

Différents AI du QS ont été identifiés. Les bactéries à Gram positif utilisent principalement des peptides AI, aussi nommés peptide-phéromones, spécifiques des différentes souches et espèces. Les bactéries à Gram négatif utilisent, quant à elles, différentes molécules régulant plusieurs types de QS :

- les acylhomosérines lactones (AHL) également désignées AI-1, composées d'un cycle lactone et d'une chaîne aliphatique dont la longueur varie selon les espèces bactériennes [4] ;
- l'auto-inducteur de type 2 (AI-2), rencontré chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et positives principalement sous la forme d'un diester furanosyl-borate [5] ;
- AI-3, l'adrénaline ou la noradrénaline sont fréquemment rencontrés chez les pathogènes opportunistes de

l'homme (e.g. *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp.) [6] ;

- d'autres médiateurs incluant des quinolones (*Pseudomonas* spp.), des acides gras (*Xanthomonas* spp.), des esters (*Ralstonia* sp.), des hydroxycétones (*Legionella* spp., *Vibrio* spp.) ont également été décrits [7–10].

La plupart des bactéries à Gram négatif utilisent plusieurs systèmes de QS de manière additive [11,12], hiérarchisée [10], ou distincte [13]. Compte tenu de la grande diversité des réseaux de signalisation, le QS est probablement plus qu'un simple système de communication permettant également aux bactéries de percevoir et s'adapter à leur environnement [14].

Les bactéries pathogènes opportunistes de par leur rapidité de dissémination et leur capacité à acquérir des résistances aux traitements antibactériens classiques sont particulièrement problématiques. Elles sont notamment responsables d'une augmentation du risque de mortalité induisant des infections associées aux soins et engendrent d'importants surcoûts pour les systèmes de soins de santé [15]. Chez la plupart de ces bactéries, le QS est responsable de la transition du stade commensal/saprophyte au stade pathogène. C'est, par exemple, le cas du pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, naturellement présente dans l'eau et les environnements humides. *P. aeruginosa* est en effet capable, dans un environnement favorable telle qu'une plaie, de proliférer et d'adapter son comportement grâce à l'accumulation des AI et au QS, elle peut alors devenir pathogène et former un biofilm qui rend l'infection d'autant plus difficile à traiter [16].

Perturber le QS, pour limiter la pathogénicité des bactéries et leur capacité à former un biofilm, s'avère

particulièrement prometteur. Cette stratégie, le *quorum quenching* (QQ), a émergé dans les années 2000 grâce à l'identification d'une enzyme capable de dégrader les AHL [17]. Deux approches peuvent être considérées, la première consistant à empêcher les bactéries de produire ou percevoir les AI par l'utilisation d'inhibiteurs, la seconde à dégrader ces molécules par voie enzymatique. Parmi les inhibiteurs de QS, les furanones halogénées, identifiées pour la première fois chez la macroalgue rouge *Delisea pulchra*, sont les plus étudiées [18]. Bien que de nombreux criblages aient été réalisés pour élargir la gamme des inhibiteurs disponibles, peu de composés ont dépassé la phase de laboratoire [19,20]. Seul le 5-fluorouracile a atteint la phase clinique et a été utilisé pour fonctionnaliser des cathéters [21]. Le QQ par voie enzymatique repose, quant à lui, sur l'utilisation de biocatalyseurs capables de dégrader les signaux moléculaires de la communication bactérienne [22]. À l'instar des inhibiteurs, la plupart des enzymes n'ont été testées qu'en laboratoire. Récemment des enzymes ont pu également être incorporées dans des cathéters pour empêcher la formation du biofilm de *P. aeruginosa* [23,24]. Pour l'instant les principales limitations de cette stratégie reposent sur la spécificité des enzymes pour dégrader un large spectre d'AI ainsi que leur piètre stabilité qui limite leur potentiel applicatif.

Cette revue recense les applications du QQ par voie enzymatique. Les avantages et les limitations de cette technique sont présentés à la lumière de résultats récents. Une attention particulière est dédiée aux enzymes de la famille des *Phosphotriesterase-like lactonases* (PLL). En effet, contrairement aux enzymes mésophiles peu stables, de nombreuses PLL sont issues de microorganismes extrémophiles, ce qui leur confère une très grande robustesse et une compatibilité avec certaines contraintes industrielles qui leur ouvre un large champ d'applications possibles. Enfin, les éventuels mécanismes de résistance au QQ sont discutés.

Applications médicales du QQ

Les bactéries utilisant le QS pour déclencher la virulence sont particulièrement problématiques dans le secteur médical. Aux Etats-Unis, *P. aeruginosa* est responsable à elle seule de 7,5 % des infections nosocomiales. Les bactéries *Proteus* spp., *Serratia* spp. et *Acinetobacter baumannii* représentent 6,4 % de ces infections. Ces pathogènes sont fréquemment isolés dans les infections urinaires liées à l'utilisation de cathéters ou les infections pulmonaires [25]. Les enzymes capables de dégrader les AHL sont donc particulièrement pertinentes pour limiter les facteurs induits par le QS qui participe entre autres à la formation du biofilm, la sécrétion des facteurs de virulence, la compétence ou encore à la résistance aux agents antimicrobiens [26]. Les dispositifs médicaux fonctionnalisés avec des enzymes ont donc été considérés.

Les membranes fonctionnalisées

L'immobilisation de la PLL hyperthermostable SsoPox issue de l'archée *Sulfolobus solfataricus* sur des membranes de nano-alumine a été étudiée pour bloquer la communication bactérienne [27]. La fixation s'effectue via les interactions électrostatique entre le support et l'enzyme. Peu de

relargage a été détecté via des mesures d'activités et de quantité protéique dans les solutions de rinçage. Avec environ 25 % de l'activité initiale fixée, il est possible de diminuer drastiquement l'expression de la pyocyanine et l'activité élastase d'une culture de *P. aeruginosa* PAO1. Pour la première fois l'action d'une enzyme immobilisée pour le blocage de la communication bactérienne a ainsi été démontrée [27]. Ce résultat ouvre la porte à un large champ d'applications dans le secteur des dispositifs médicaux.

Les cathéters fonctionnalisés

La persistance des pathogènes dans les cathéters est extrêmement problématique pour la santé des patients et engendre des coûts importants [28]. Afin de limiter ces problèmes, un cathéter fonctionnalisé par le 5-fluorouracile a été développé et évalué cliniquement [21]. L'étude portant sur 960 adultes répartis dans 25 centres médicaux américains a montré que les cathéters basés sur le QQ constituent une alternative prometteuse aux dispositifs fonctionnalisés par la chlorhexidine ou la sulfadiazine d'argent. Fort de ces observations, de nouveaux cathéters à base d'enzymes ont été développés. Un cathéter en silicone, fonctionnalisé par l'acylase d'*Aspergillus melleus*, a été développé et a permis de réduire l'adhérence de *P. aeruginosa* ATCC 10145 [23]. La quantité de biofilm a également été diminuée dans des modèles statiques et dynamiques. L'innocuité du cathéter sur des cultures de fibroblastes a également été mise en évidence [23]. Plus récemment, un cathéter urinaire couplant une acylase et une α -amylase a été décrit [24]. Il consiste en un cathéter de silicone recouvert par une alternance de couches d'enzymes et de polyéthylèneimine liées par des interactions électrostatiques, cependant aucune mention n'est faite sur le relargage potentiel de l'enzyme. L'efficacité in vivo de ce dispositif a été démontrée ainsi que sa capacité à retarder la formation du biofilm par *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* jusqu'à 7 j.

Application topique et perspective de pansements fonctionnalisés

Un modèle de brûlure chez la souris infectée par *P. aeruginosa* PAO1 a été mis en place pour évaluer l'efficacité de la lactonase de *Bacillus* sp. ZA12 [29]. Les animaux ont été brûlés au troisième degré avant d'être infectés en voie sous-cutanée par une dose létale correspondant à 10^6 bactéries. L'application topique d'un gel contenant la lactonase a permis de prévenir une infection systémique par la bactérie réduisant ainsi la mortalité. La combinaison de la lactonase avec un antibiotique, la ciprofloxacine, a permis de guérir les souris soulignant l'action synergique des deux traitements. Pour la première fois, l'efficacité d'une enzyme à activité QQ, administrée par voie cutanée pour limiter l'infection d'une plaie, a été démontrée ouvrant de nombreuses perspectives pour le développement de pansement anti-infectieux.

Traitement des infections pulmonaires

L'effet in vivo d'un variant de l'enzyme SsoPox issue d'expériences d'évolution dirigée administrée par voie

intratrachéale a été étudié [30]. Un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* PAO1 chez le rat a permis d'évaluer l'effet de l'administration concomitante ou retardée de l'enzyme. La mortalité a ainsi été réduite de 75 % jusqu'à 20 % dans ce modèle. La capacité de l'enzyme à inhiber la formation du biofilm de la bactérie in vitro, à hauteur de 65 %, a été mise en évidence. La lactonase administrée s'est avérée particulièrement efficace pour bloquer la virulence de *P. aeruginosa*, notamment rencontrée chez les patients atteints de la mucoviscidose.

L'utilisation du QQ constitue une alternative prometteuse aux agents antibactériens classiquement utilisés comme les antibiotiques et antiseptiques. Les enzymes dégradant les AHL ont été largement décrites comme limitant la virulence et la formation du biofilm. Bien que des études toxicologiques ont pu démontrer que l'utilisation d'une lactonase n'induit pas d'inflammation ni de réponse cytokinique en application topique ou en injection intrapéritonéale [29], la plupart des enzymes utilisées dans des stratégies de QQ ne sont pas humaines ni humanisées, il se peut qu'elles entraînent des réactions allergiques ou immunitaires. Cependant, de nombreuses techniques sont connues pour diminuer l'allergénicité des protéines. Classiquement, la PEGylation est une technique simple qui consiste à masquer des molécules bioactives en leur attachant des chaînes de polyéthylène glycol (PEG). Cette technique peu agressive permet de diminuer la toxicité et l'immunogénicité des protéines tout en améliorant de nombreux paramètres pharmacocinétiques de ces dernières [31,32]. Une autre approche consiste à piéger les enzymes dans des liposomes ce qui permet de cibler les zones à traiter et de réduire l'immunogénicité des enzymes [33]. Cette technique a notamment été utilisée avec des oxydases dans des tests d'élimination de biofilm in vitro. Enfin, une technique plus récente consiste à utiliser les globules rouges du patient comme transporteur d'enzyme réduisant presque entièrement les risques de rejet de la part de ce dernier [34]. Ces techniques, appliquées aux enzymes à QQ, permettront de développer de nouveaux dispositifs médicaux et ouvriront la voie vers des traitements prophylactiques et thérapeutiques contre les infections bactériennes.

Néanmoins, de nombreux verrous technologiques doivent être levés afin de valider le potentiel des enzymes. La production à grande échelle, ainsi que la stabilité et compatibilité avec les contraintes industrielles doivent faire l'objet d'une attention particulière. Dans cette optique, des enzymes robustes issues d'environnements extrêmes ont été plus particulièrement étudiées. Parmi celles-ci, les PLL s'avèrent être des candidats prometteurs.

Phosphotriesterase-Like Lactonases

Des enzymes à large promiscuité

Les PLL sont des lactonases naturelles (EC 3.1.1.25) montrant une activité de promiscuité sur les molécules organophosphorées. Ces enzymes sont très proches des phosphotriestérases (PTE) dont elles constituent le plus probable ancêtre [35–37]. Elles appartiennent à la superfamille des amidohydrolases et leur structure tridimensionnelle est formée par un tonneau (β/α)₈. Elles comportent un site actif

contenant deux cations métalliques divalents coordonnés par quatre histidines, un acide aspartique et une lysine carboxylée [38]. Le centre bi-métallique participe à la catalyse en tant qu'acide de Lewis impliqué dans l'activation d'une molécule d'eau en ion hydroxyde pour l'attaque nucléophile du substrat. Deux sous-familles, les PLL-A et PLL-B, ont été identifiées sur la base de leur similarité de séquences et de la longueur de deux boucles caractéristiques, les boucles 7 et 8. Les PLL-A sont capables de dégrader les AHL et les oxo-lactones contrairement aux PLL-B spécifiques des oxo-lactones [39]. La capacité des PLL-A à dégrader les AHL est particulièrement intéressante pour le développement de stratégies basées sur le QQ. Cette sous-famille compte parmi ses représentants de nombreuses enzymes issues d'organismes extrémophiles qui présentent un fort potentiel applicatif. Les lactonases *VmoLac* (issue de la crénarchée extrémophile *Vulcaniseta moutnovskia*) [39,40], *GkL* (issue de la bactérie thermophile *Geobacillus kaustophilus*) [41], *SacPox* (issue de l'archée acidophile *Sulfolobus acidocaldarius*) [42], *SisLac* (issue de l'archée hyperthermophile *Sulfolobus islandicus*) [43] ou encore *SsoPox* (issue de l'archée hyperthermophile *S. solfataricus*) ont été décrites [38,44,45]. Leur stabilité intrinsèque (T_m de 106 °C et 128 °C pour *SsoPox* et *VmoLac* respectivement) constitue un atout majeur pour le développement de dispositifs médicaux fonctionnalisés par des enzymes. D'un point de vue évolutif, ces enzymes sont éloignées d'autres lactonases appartenant à la superfamille des métallo- β -lactamases qui comprend notamment l'enzyme *AiiA* de *Bacillus thuringiensis* qui a fait l'objet de nombreux travaux (Fig. 1) [17,46]. Bien que ces enzymes ne présentent pas de similarité structurale, il est intéressant de noter que leurs sites actifs montrent des ressemblances frappantes [37].

Intérêt des enzymes hyperthermostables : le cas de *SsoPox*

SsoPox est la PLL la mieux caractérisée à ce jour. L'enzyme, isolée d'une archée hyperthermophile des sources d'eau chaude du Vésuve, a été initialement étudiée pour sa capacité à hydrolyser les pesticides et agents neurotoxiques de guerre organophosphorés [45,47,48]. Cette enzyme est extrêmement stable et active sur de larges gammes de températures (10–100 °C) et de pH (5,0–9,0) ce qui lui confère un fort potentiel biotechnologique [44]. Outre son activité phosphotriestérase, *SsoPox* possède également une activité lactonase qui lui permet de dégrader efficacement les AHL même à température ambiante. La structure tridimensionnelle de *SsoPox* a été résolue et montre un repliement en tonneau (β/α)₈ légèrement tordu [49]. Contrairement aux autres PTE qui disposent d'une structure similaire, *SsoPox* montre de légers changements au niveau des boucles 7 et 8, respectivement plus courte et plus longue que celles des PTE. Ces modifications structurales engendrent la formation d'un canal hydrophobe qui accommode parfaitement les substrats de type lactone.

La capacité de l'enzyme sauvage à hydrolyser une large gamme de lactones a été démontrée. *SsoPox* est ainsi capable de dégrader les AHLs, les γ -lactones et les δ -lactones avec des efficacités catalytiques allant jusqu'à $8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [35,38,50]. L'activité lactonase de *SsoPox*

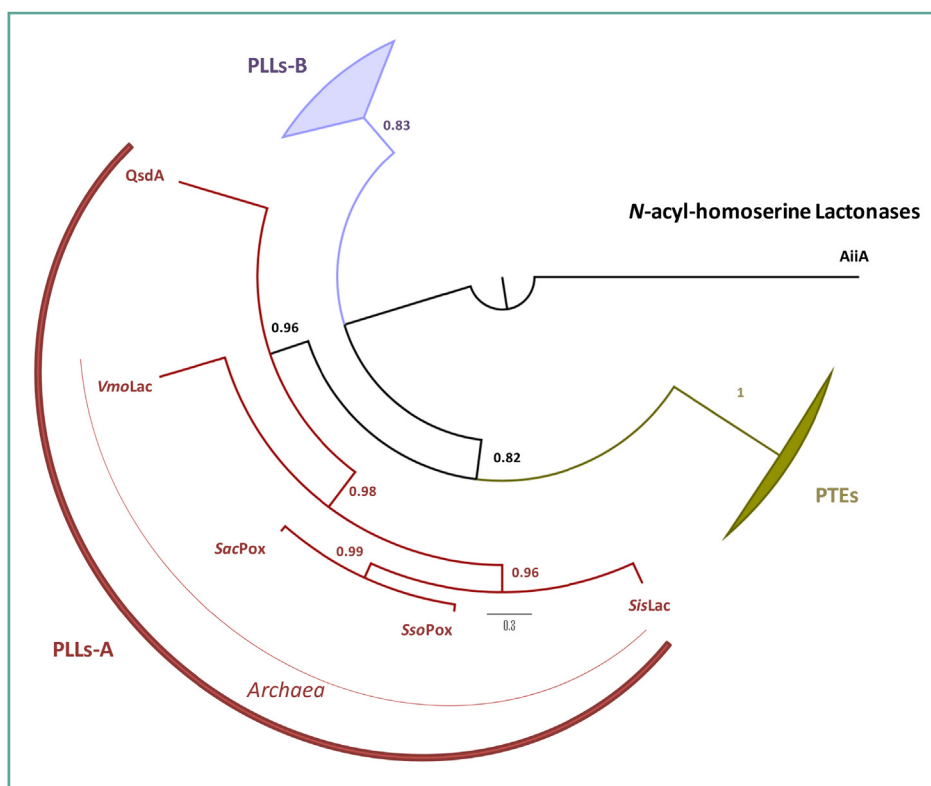


Figure 1. Arbre phylogénétique des PLL et des familles d'enzymes associées. L'outil web www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi a été utilisé pour l'alignement de séquences et l'arbre a été construit avec FigTree v1.4.0. Les séquences suivantes ont été utilisées : AiiA (P0CJ63), PTEs (Q93LD7, P0A434), SacPox (V9S7Z1), SsoPox (Q97VT7), SisLac (C4KKZ9), VmoLac (F0QXN6), QsdA (B1N7B5), PLLs-B (A4IN23, Q5KZU5, Q9RVU2).

Phylogenetic tree of PLLs and related enzymes. Webtool www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi was used for sequence alignment and phylogeny, the tree was obtained with FigTree v1.4.0. Sequence used for the analysis were: AiiA (P0CJ63), PTEs (Q93LD7, P0A434), SacPox (V9S7Z1), SsoPox (Q97VT7), SisLac (C4KKZ9), VmoLac (F0QXN6), QsdA (B1N7B5), PLLs-B (A4IN23, Q5KZU5, Q9RVU2).

a par ailleurs été améliorée par ingénierie enzymatique. Le résidu W263, situé dans le site actif et impliqué dans les mouvements de boucles, a été particulièrement considéré. Une expérience de mutagenèse à saturation a permis d'identifier un variant extrêmement efficace, SsoPox-W263I, montrant des efficacités catalytiques allant jusqu'à $5,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [50]. Le variant SsoPox-W263I a été co-cristallisé avec un analogue de substrat, le N-décanoyl-L-homocystéinethiolactone (Fig. 2). Ce variant est particulièrement intéressant en vue d'applications biotechnologiques, car si son activité lactonase a été grandement améliorée, il maintient également une forte stabilité ($T_m = 88^\circ\text{C}$). L'enzyme sauvage et ses variants sont capables d'hydrolyser une vingtaine de lactones soulignant leur grande promiscuité de substrats. Ils résistent de plus à l'action des protéases, détergents et des solvants organiques [47,50]. Ces enzymes sont donc attractives pour le développement de dispositifs médicaux innovants pour lutter contre la virulence bactérienne et la formation du biofilm.

QQ et résistance

Les antibiotiques ont été massivement utilisés durant les dernières décennies pour traiter les infections bactériennes

chroniques et aiguës. Ces agents anti-bactériens induisent une très forte pression de sélection sur les bactéries en les tuant ou en empêchant leur développement. Ceci a conduit à l'apparition de nombreux mécanismes de résistance chez les bactéries diminuant considérablement l'efficacité des antibiotiques et entraînant l'augmentation des doses efficaces [51–53]. Le QQ apparaît comme un traitement complémentaire, voire dans certains cas alternatif, aux antibiotiques, dans la mesure où il peut être utilisé pour limiter la virulence et la formation de biofilm sans tuer les bactéries [54–57]. Toutefois, si la pression de sélection appliquée par le QQ est plus faible que celle induite par un agent antimicrobien classique, elle n'en demeure pas nulle pour autant [58–60]. En présence de l'inhibiteur de QS C-30, une furanone de QQ très efficace, *P. aeruginosa* a rétabli par des mutations compensatoires son système de QS, notamment en augmentant l'efflux du C-30 [55,56]. Des bactéries ayant perdu leur capacité à réguler leur métabolisme en fonction de la densité de population bactérienne ont également été découvertes et seraient par conséquent insensibles au QQ [62]. Néanmoins, la diffusion d'une telle résistance est supposée lente puisqu'une étude récente a montré que des mutants bactériens QS-négatifs ont une moins bonne valeur sélective que leurs homologues QS-positifs [63], et les communautés bactériennes adoptent des contre-mesures pour pénaliser les bactéries insensibles au QS qui bénéficient

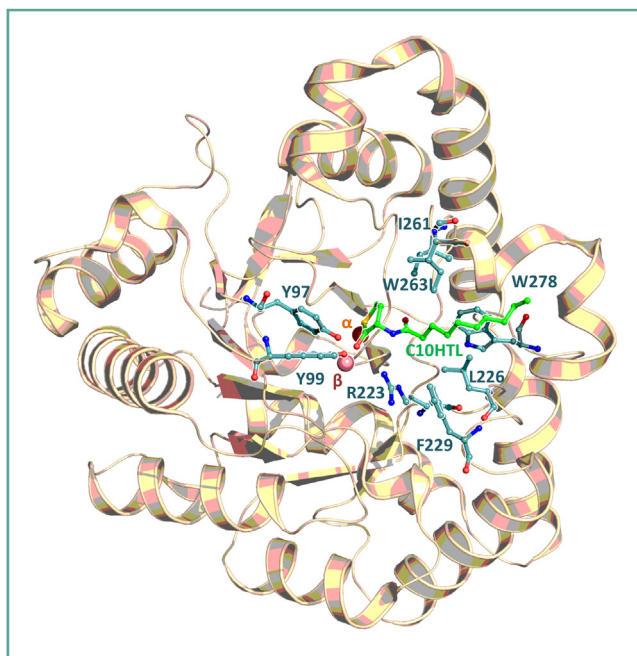


Figure 2. Structure de SsoPox-W263I (PDB ID : 4KF1) en complexe avec l’analogue de substrat C10HTL. Les résidus catalytiques ainsi que les cations métalliques sont également présentés. *Structure of variant SsoPox-W263I (PDB ID: 4KF1) bound with substrate analogue C10HTL. Catalytic residues and metallic cations are emphasized in blue sticks and spheres respectively.*

des composés extracellulaires produits par les bactéries QS-positifs [61,62].

L’émergence des phénotypes de résistance sera dépendante de la stratégie de QQ utilisée. La stratégie la moins agressive consiste probablement à utiliser des enzymes. En effet, contrairement aux inhibiteurs de QS, les enzymes peuvent agir depuis l’extérieur de la cellule en dégradant les AI sécrétés dans l’environnement. Outre les phénomènes de résistance précédemment décrits, des mécanismes de résistance putatifs aux enzymes à activité QQ ont toutefois été proposés [58,59]. Une augmentation de la production d’AI pourrait permettre de contrer l’utilisation d’enzymes. Une plus grande affinité ou sensibilité du récepteur cellulaire des AI permettrait également de réduire l’influence des enzymes [64,65]. Toutefois, ces mécanismes pourraient être contournés en augmentant la quantité d’enzyme dans l’environnement, ou en augmentant son activité et son affinité. Une autre stratégie pourrait consister à modifier la structure même de l’AI. Néanmoins les enzymes à activité QQ, et notamment les PLL, sont capables de dégrader une grande variété de lactones et devraient pouvoir supporter des modifications chimiques mineures. Une autre option pourrait consister en la production par les bactéries d’un inhibiteur des enzymes du QQ.

Conclusion et perspectives

Le QQ semble une stratégie prometteuse pour renforcer notre arsenal contre les infections bactériennes. En effet, contrairement aux approches classiques de désinfection et de traitements antibiotiques, le QQ est une approche plus

douce, induisant potentiellement une plus faible pression de sélection, ne tuant pas les bactéries mais en les maintenant dans un état non virulent, sans former de biofilm. Par ailleurs, si le QQ est traditionnellement vu comme une approche uniquement préventive, de récents travaux suggèrent qu’il pourrait, grâce à l’ingénierie moléculaire, être utilisé en traitement en combinaison avec des antibiotiques [66]. De nombreuses études ont mis en évidence la corrélation entre formation du biofilm et résistance aux antibiotiques chez de nombreuses bactéries [67–73]. En effet, le biofilm limite la diffusion des agents antimicrobiens et favorise le transfert horizontal de gènes, notamment pour l’acquisition de résistances [66,74]. Dans la mesure où le QQ est généralement associé à une diminution de la quantité de biofilm, il pourrait limiter l’apparition de bactéries résistantes et permettre une meilleure accessibilité des bactéries aux antibiotiques [66].

Le QQ, et plus particulièrement les enzymes capables de dégrader les AI, constituent des alternatives prometteuses aux traitements classiques. Leur incorporation dans des dispositifs médicaux tels que des pansements ou des cathéters constituerait une rupture technologique majeure. Pour ce faire, le développement d’enzymes pouvant résister aux contraintes industrielles (chaleur, pH, stockage, stérilisation) est crucial. Les enzymes issues d’organismes extrémophiles ont été le sujet de nombreuses études. Les PLL, notamment l’enzyme SsoPox, ont fait l’objet d’une attention particulière car elles sont à la fois très actives pour la dégradation des lactones et extrêmement stables. Les preuves de concept de l’efficacité de ces enzymes ont d’ores et déjà été démontrées, restent maintenant le développement et l’évaluation de dispositifs médicaux de nouvelle génération pour la lutte contre les infections bactériennes.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d’un contrat DGA-RAPID (LACTO-TEX). BR est financé par une bourse de thèse du programme “Emplois Jeunes Doctorants” de la région Provence-Alpes-Côte d’Azur.

Déclaration de liens d’intérêts

B.R., L.P., M.E., D.D. et E.C. : intérêts financiers dans l’entreprise Gene&GreenTK.

M.E. et E.C. ont un brevet WO2014167140 A1 licencié à Gene&GreenTK.

Références

- [1] Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 1979;43:496–518.
- [2] Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure DD. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 2016;40:86–116.
- [3] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:165–99.
- [4] Churchill MEA, Chen L. Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. *Chem Rev* 2011;111:68–85.

- [5] Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002;415:545–9.
- [6] Kendall MM, Sperandio V. Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:10–5.
- [7] Ryan RP, An S, Allan JH, McCarthy Y, Dow JM, The DSF. Family of cell–cell signals: an expanding class of bacterial virulence regulators. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004986.
- [8] Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 1997;26:251–9.
- [9] Winans SC. A new family of quorum sensing pheromones synthesized using S-adenosylmethionine and Acyl-CoAs. *Mol Microbiol* 2011;79:1403–6.
- [10] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2014;6:26–41.
- [11] Plener L, Lorenz N, Reiger M, Ramalho T, Gerland U, Jung K. The phosphorylation flow of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing cascade determines levels of phenotypic heterogeneity in the population. *J Bacteriol* 2015;197:1747–56.
- [12] Jung SA, Chapman CA, Ng W-L. Quadruple quorum-sensing inputs control vibrio cholerae virulence and maintain system robustness. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004837.
- [13] Schmid N, Pessi G, Deng Y, Aguilar C, Carlter AL, Grunau A, et al. The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in *Burkholderia cenocepacia* H111. *PLoS One* 2012;7:e49966.
- [14] West SA, Winzer K, Gardner A, Diggle SP. Quorum sensing and the confusion about diffusion. *Trends Microbiol* 2012;20:586–94.
- [15] Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 2010;362:1804–13.
- [16] Kaye KS, Pogue JM. Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 2015;35:949–62.
- [17] Dong Y-H, Xu J-L, Li X-Z, Zhang L-H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3526–31.
- [18] Givskov M, Nys R de, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, et al. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* 1996;178:6618–22.
- [19] Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kôte M, et al. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI Selector. *J Bacteriol* 2005;187:1799–814.
- [20] Gnanendra S, Mohamed S, Natarajan J. Identification of potent inhibitors for *Salmonella Typhimurium* quorum sensing via virtual screening and pharmacophore modeling. *Comb Chem High Throughput Screen* 2013;16:826–39.
- [21] Walz JM, Avelar RL, Longtine KJ, Carter KL, Mermel LA, Heard SO, et al. Anti-infective external coating of central venous catheters: a randomized, noninferiority trial comparing 5-fluorouracil with chlorhexidine/silver sulfadiazine in preventing catheter colonization. *Crit Care Med* 2010;38:2095–102.
- [22] Fast W, Tipton PA. The enzymes of bacterial census and censorship. *Trends Biochem Sci* 2012;37:7–14.
- [23] Ivanova K, Fernandes MM, Mendoza E, Tzanov T. Enzyme multilayer coatings inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:4373–85.
- [24] Ivanova K, Fernandes MM, Francesco A, Mendoza E, Guezguez J, Burnet M, et al. Quorum-quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:27066–77.
- [25] Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, 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, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34:1–14.
- [26] Fetzner S. Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol* 2015;201:2–14.
- [27] Ng FSW, Wright DM, Seah SYK. Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:1181–6.
- [28] Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:26–59.
- [29] Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns* 2015;41:153–62.
- [30] Hraiech S, Hiblot J, Lafleur J, Lepidi H, Papazian L, Rolain J-M, et al. Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One* 2014;9:e107125.
- [31] Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001;22:405–17.
- [32] Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:214–21.
- [33] Rukavina Z, Vanić Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics* 2016;8:18.
- [34] Millán CG, Marinero MLS, Castañeda AZ, Lanao JM. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release* 2004;95:27–49.
- [35] Afriat L, Roodveldt C, Manco G, Tawfik DS. The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry (Mosc)* 2006;45:13677–86.
- [36] Afriat-Jurnou L, Jackson CJ, Tawfik DS. Reconstructing a missing link in the evolution of a recently diverged phosphotriesterase by active-site loop remodeling. *Biochemistry (Mosc)* 2012;51:6047–55.
- [37] Elias M, Tawfik DS. Divergence and convergence in enzyme evolution: parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases. *J Biol Chem* 2011;287:11–20.
- [38] Elias M, Dupuy J, Merone L, Mandrich L, Porzio E, Moniot S, et al. Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. *J Mol Biol* 2008;379:1017–28.
- [39] Hiblot J, Bzdrenga J, Champion C, Chabriere E, Elias M. Crystal structure of VmoLac, a tentative quorum quenching lactonase from the extremophilic crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia*. *Sci Rep* 2015;5:8372.
- [40] Hiblot J, Gotthard G, Champion C, Chabriere E, Elias M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lactonase VmoLac from *Vulcanisaeta moutnovskia*. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2013;69:1235–8.
- [41] Xue B, Chow JY, Baldansuren A, Yap LL, Gan YH, Dikanov SA, et al. Structural evidence of a productive active site architecture for an evolved quorum-quenching GKL lactonase. *Biochemistry (Mosc)* 2013;52:2359–70.
- [42] Bzdrenga J, Hiblot J, Gotthard G, Champion C, Elias M, Chabriere E. SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase. *BMC Res Notes* 2014;7:333.

- [43] Hiblot J, Gotthard G, Chabriere E, Elias M. Structural and enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*. *PLoS One* 2012;7:e47028.
- [44] Vecchio P, Elias M, Merone L, Graziano G, Dupuy J, Mandrich L, et al. Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 2009;13:461–70.
- [45] Merone L, Mandrich L, Rossi M, Manco G. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles* 2005;9:297–305.
- [46] Liu D, Thomas PW, Momb J, Hoang QQ, Petsko GA, Ringe D, et al. Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry (Mosc)* 2007;46:11789–99.
- [47] Hiblot J, Gotthard G, Chabriere E, Elias M. Characterisation of the organophosphate hydrolase catalytic activity of SsoPox. *Sci Rep* 2012;2:779.
- [48] Jacquet P, Daudé D, Bzdrenga J, Masson P, Elias M, Chabrière E. Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: special focus on hyperstable enzymes. *Environ Sci Pollut Res* 2016;1–19.
- [49] Elias M, Dupuy J, Merone L, Lecomte C, Rossi M, Masson P, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* phosphotriesterase. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2007;63:553–5.
- [50] Hiblot J, Gotthard G, Elias M, Chabriere E. Differential active site loop conformations mediate promiscuous activities in the lactonase SsoPox. *PLoS One* 2013;8:e75272.
- [51] Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 2005;36:697–705.
- [52] Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1451–70.
- [53] Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1486–513.
- [54] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J* 2003;22:3803–15.
- [55] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:319–46.
- [56] Romero M, Acuna L, Otero A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Pat Biotechnol* 2012;6:2–12.
- [57] Uroz S, Dessaux Y, Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 2009;10:205–16.
- [58] Defoirdt T, Boon N, Bossier P. Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog* 2010;6:e1000989.
- [59] García-Contreras R, Maeda T, Wood TK. Resistance to quorum-quenching compounds. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:6840–6.
- [60] Maeda T, García-Contreras R, Pu M, Sheng L, Garcia LR, Tomás M, et al. Quorum quenching quandary: resistance to antiviral compounds. *ISME J* 2012;6:493–501.
- [61] García-Contreras R, Nuñez-López L, Jasso-Chávez R, Kwan BW, Belmont JA, Rangel-Vega A, et al. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME J* 2015;9:115–25.
- [62] Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15876–81.
- [63] Gerdt JP, Blackwell HE. Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chem Biol* 2014;9:2291–9.
- [64] Collins CH, Arnold FH, Leadbetter JR. Directed evolution of *Vibrio fischeri* LuxR for increased sensitivity to a broad spectrum of acyl-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 2005;55:712–23.
- [65] Hawkins AC, Arnold FH, Stuermer R, Hauer B, Leadbetter JR. Directed evolution of *Vibrio fischeri* LuxR for improved response to butanoyl-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5775–81.
- [66] Kiran S, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol* 2011;3:1–12.
- [67] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [68] Mah TF, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34–9.
- [69] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond Engl* 2001;358:135–8.
- [70] Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002;416:740–3.
- [71] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol IJMM* 2002;292:107–13.
- [72] Mah T-F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O’Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003;426:306–10.
- [73] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:322–32.
- [74] Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011;19:419–26.