

Directeur de thèse : Jean Damien Ricard

Effet inhibiteur des proanthocyanidines sur la croissance, l'adhésion et la virulence d'*E. coli*. Étude du mécanisme d'action

Résumé

L'incidence importante des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) malgré l'application de multiples mesures de prévention, l'augmentation et la diffusion rapide de germes multi-résistants et le manque de nouveaux antibiotiques incitent à la recherche de nouveaux moyens de prévention et de traitement. L'augmentation de fréquence des entérobactéries comme germe responsables de PAVM justifie le choix d'utiliser *E. coli* comme modèle d'étude pour de nouveaux moyens de prévention des PAVM. Par ailleurs, les similitudes entre infection pulmonaire et infection urinaire pour l'étape d'adhésion épithéliale et les effets déjà observés des proanthocyanides de la canneberge (cPAC) dans le contexte de l'infection urinaire, nous ont conduit à étudier l'effet des cPAC sur la croissance, l'adhésion et la virulence d'isolats cliniques d'*E. coli* responsable de PAVM. En parallèle, pour approfondir les mécanismes d'action des cPAC nous avons analysé le protéome total d'*E. coli*, analyse complétée par l'étude des voies métaboliques désignées par les résultats de protéomique. Enfin, nous avons vérifié la validité de nos résultats sur d'autres espèces bactériennes impliquées dans les PAVM.

Nous avons mis en évidence une forte inhibition dose dépendante, de la croissance bactérienne par les cPAC. Tous les paramètres classiques de croissance bactérienne étaient affectés par les cPAC. Cet effet était bactériostatique et non bactéricide. Nous avons observé une diminution significative de l'adhésion des bactéries traitées par cPAC sur des cellules buccales humaines qui atteignait 80% pour la souche la plus virulente. Nos études *in vivo* ont montré une réduction importante de la mortalité et de la réaction inflammatoire déclenchée par *E. coli* lorsqu'il était pré-exposé aux cPAC.

Notre analyse du protéome total nous a permis d'identifier 641 protéines dont 117 protéines différentiellement exprimées lorsque les bactéries étaient traitées par 1mg/ml de cPAC. Ces protéines étaient impliquées dans 25 voies métaboliques distinctes.

Les cPAC ne présentaient pas de cible biochimique isolée mais exercent leur activité antibactérienne en affectant de multiples voies du métabolisme cellulaire. Elles entraînent un état de privation en fer sans accumulation intracellulaire, elles dévient le métabolisme énergétique vers les voies de fermentation et de glycolyse tout en déprimant l'activité du cycle de Krebs et la respiration. Elles inhibent les protéines impliquées dans la division cellulaire, le

transport et la sécrétion protéique entraînant une diminution du potentiel de membrane et un blocage de la polymérisation des fimbriae et des flagelles. Par ailleurs nous avons montré qu'elles entraînent une réponse antioxydante forte. Enfin nous avons mis en évidence le caractère ubiquitaire de l'effet anti bactérien des cPAC sur les autres espèces bactériennes impliquées dans les PAVM qui ont été testées

Nos résultats indiquent que les cPAC entraînent une forte inhibition de la croissance de l'adhésion et de la virulence de souches d'*E. coli* responsables de PAVM, ce qui suggère que leur utilisation pour réduire la colonisation oropharyngée pourrait diminuer l'incidence des PAVM.

Abstract

The incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP), despite multiple prevention methods, the ever increasing antimicrobial resistance, the rapid and global spread of multiresistant bacteria, including carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, and the drastic reduction in the number of new anti-infective agents available on the market indicates the vital importance to dispose of new prevention strategies. Because the prevalence of *Enterobacteriaceae* in general and *E. coli* in particular is increasing in (VAP) and because it has already been shown that cPAC decreases *E. coli* adhesion to uroepithelial cells, we used an *In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* approach to test the hypothesis that proanthocyanidins could prove beneficial in oropharyngeal decontamination and bacterial virulence reduction.

In order to establish a baseline of knowledge of molecular responses to cPAC we employed proteomic analysis and made complementary experiences to characterize metabolic response of *E. coli* exposed to cPAC. The validity of our results to other bacterial species responsible for VAP has been explored by growth experiments.

A significant inhibition of bacterial growth was observed, affecting both time to maximal growth and maximal growth rate. The minimal concentration at which this effect occurred was 250 µg/ml. cPAC reduced *E. coli* adhesion to fresh buccal epithelial cells by up to 80%. Bacterial counts in homogenized lungs and bronchoalveolar lavage fluid were decreased after cPAC exposition and we also observed a significant decrease in KC concentrations and polymorphonuclear cell recruitment in bronchoalveolar lavage fluid ($p < 0.05$ for both). At identical inoculum, mortality was reduced by more than half in mice inoculated with *E. coli* exposed to cranberry proanthocyanidin.

Considerable differences were observed in protein abundances between the untreated and treated cells. A total of 641 proteins were detected by LC-MS/MS and among these, 117 had a significant effect during the exponential and stationary growth phases. These 117 proteins were manually grouped into 25 pathway categories

Proteomic and metabolic analysis showed that cPAC affect different metabolic pathways as iron limitation, without cytoplasmic accumulation, a redirection of respiratory metabolism through the fermentative pathways. cPAC exposure decrease proteins involved in cell division,

protein transport and secretion that leads to a strong reduction of proton-motive force, fimbrial and flagella polymerisation. The presence of cPAC also induces a strong antioxidant response in treated bacteria.

Cranberry proanthocyanidins exhibit potent effects on growth, adhesion, and virulence of oropharyngeal and lung isolates of *E. coli*, suggesting that cranberry proanthocyanidin could be of clinical interest to reduce oropharyngeal colonization and prevent lung infection.