

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de recherche : *Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement.*

Structure de Recherche : *Équipe de Microbiologie et de Biologie moléculaire.*

Discipline : *Biologie.*

Spécialité : *Biotechnologies médicales & pharmacologie.*

Présentée et soutenue le 30 octobre 2023 Par :

M^{me} Basma ABDALLAH

Caractérisation & vectorisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée médiévale arabe.

JURY

Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Présidente/ Rapportrice
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Rapportrice/ Examinatrice
Nadjet DEBBACHE	PES, Université de Béjaïa-Algérie	Rapportrice/ Examinatrice
François BERNIER	PES, Université de Strasbourg-France	Examinateur
Laurence CHOULIER	HDR, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7021	Co-directrice de thèse
Pierre FECHTER	HDR, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7242	Directeur de thèse
Hassan AIT BENHASSOU	Expert & Directeur du centre Prévention & Thérapeutiques de la Fondation MAScIR, Université Mohammed VI polytechnique de Bengrir	Directeur de thèse
Laila SBABOU	PES, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Directrice de thèse

Année Universitaire 2023 / 2024

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement.

Structure de Recherche : Équipe de Microbiologie et de Biologie moléculaire.

Discipline : Biologie.

Spécialité : Biotechnologies médicales & pharmacologie.

Présentée et soutenue le 30 octobre 2023 Par :

M^{me} Basma ABDALLAH

Caractérisation & vectorisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée médiévale arabe.

JURY

Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Présidente/ Rapportrice
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Rapportrice/ Examinatrice
Nadjet DEBBACHE	PES, Université de Béjaïa-Algérie	Rapportrice/ Examinatrice
François BERNIER	PES, Université de Strasbourg-France	Examinateur
Laurence CHOULIER	HDR, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7021	Co-directrice de thèse
Pierre FECHTER	HDR, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7242	Directeur de thèse
Hassan AIT BENHASSOU	Expert & Directeur du centre Prévention & Thérapeutiques de la Fondation MAScIR, Université Mohammed VI polytechnique de Bengrir	Directeur de thèse
Laila SBABOU	PES, Université Mohammed V-Faculté des sciences de Rabat	Directrice de thèse

Année Universitaire 2023 / 2024

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont rendu ce travail de thèse possible.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à **Campus France** et aux responsables du **partenariat des projets Toubkal PHC-Toubkal**, pour assurer la mobilité des étudiants dans mon cas, et de nous permettre de passer des séjours en France afin de bénéficier d'une expérience enrichissante dans un environnement de recherche de renommée internationale. Leurs efforts conjoints ont contribué à élargir mes horizons académiques, à établir des collaborations précieuses et à enrichir mon parcours professionnel. Je suis reconnaissante de cette opportunité qui a joué un rôle significatif dans le développement professionnel mais aussi personnel.

Tout d'abord, je tiens à remercier **les membres de Jury** d'avoir accepté de juger ce travail et de consacrer du temps pour l'examiner ;

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à la présidente du jury **Pr. Bouchra Belkadi** pour son leadership éclairé et ses précieuses orientations tout au long de ce processus d'évaluation. Mes remerciements vont également aux rapporteurs/examineurs du jury **Pr. Leila Medraoui, Pr. Nadjat Debbache, Pr. François Bernier** et **Pr. Bouchra Belkadi** pour leur temps, leur expertise et leur commentaires constructifs qui ont grandement enrichi mon travail. Leur engagement envers l'excellence académiques a été une source d'inspiration et leur contribution a été inestimable pour l'avancement de mes recherches.

Je remercie énormément **mes quatre directeurs de thèse** pour leur guidance, leurs conseils avisés et leur soutien constant tout au long de cette aventure. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect ;

Mes vifs remerciements vont également à ma professeur **Pr. Laila Sbabou** pour son encadrement, ses remarques et son soutien durant cette thèse. Je vous remercie pour votre accueil, votre écoute, pour votre expertise et vos conseils qui ont été inestimables.

Je remercie **Dr. Hassan Ait Benhassou** de m'avoir accordée cette opportunité de thèse en cotutelle, qui m'a permis de faire cet échange entre les deux pays la France et le Maroc, et de générer des résultats promettants pour la suite du projet. Vous m'avez fait toujours bénéficier de votre savoir-faire. Un très spécial remerciement pour votre sérieux, vos efforts fournis, et votre modestie.

Je tiens à remercier **Dr. Laurence Choulier** pour son écoute inconditionnelle, que ce soit scientifiquement ou personnellement ! Merci pour votre guidance et vos précieux conseils tout au long de cette thèse. Merci pour vos relectures minutieuses pendant la rédaction de ce manuscrit. Merci de me rassurer dans tous mes états de stress ! Je vous suis très reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Merci à **Dr. Pierre Fechter**. Vous m'avez toujours accueillie avec générosité et simplicité habituelle. Votre expertise et votre savoir-faire ont été fondamentaux pour la réalisation de cette thèse. Merci pour votre engagement à temps plein pour la réussite de ce projet, depuis le début de cette aventure et jusqu'à la fin de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également **les membres de mon comité de suivi de thèse** de l'Université de Strasbourg, **Dr. Renaud Wagner** et **Dr. Maria Zeniou**, pour leur temps et leur engagement envers ce projet. Merci d'avoir accepté de faire partie de mes CST. Votre engagement constant, votre disponibilité et vos encouragements ont été essentiels à chaque étape de mon parcours de recherche. Vos retours constructifs et suggestions ont été d'une valeur inestimable m'aidant ainsi à affiner mes idées, à surmonter les obstacles et à avancer dans ma thèse avec confiance.

L'encadrement joue un rôle dans la réussite d'une thèse, mais l'environnement dans lequel on évolue façonne incontestablement la personne que l'on devient. Merci à la **fondation MAScIR** de m'avoir permis de passer ma thèse dans de bonnes conditions. Je remercie Sfy & Chaimae Mez. pour nos discussions autour d'un café ou pendant une pause, merci pour les bons moments et vos oreilles attentives. Merci à tous les membres de l'équipe de biologie médicale de la **fondation MAScIR**, un par un, pour le soutien et pour les bons moments. Je remercie également l'équipe **MMBCA de l'UMR7242**, ceux qui sont encore là ; Anne, Véronique, Régine, Marion, Hélène... et ceux qui sont partis pour d'autres aventures ; Sébastien, Anne Bonneau, Quentin, Gwen. Merci à **Dr. Isabelle Schalk** et à **Dr. Gaëtan Mislin** de m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Merci pour votre gentillesse, votre accueil, votre aide et vos suggestions. Je tiens à remercier également tous les membres de l'**UMR7021-LBP** pour leur accueil au sein du laboratoire, de leur aide et de leur gentillesse.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à **mon Mari, Hicham**, pour sa présence qui a été une bénédiction inestimable durant ma thèse. Son amour, son soutien et son écoute au cours de cette aventure de thèse de doctorat, m'ont permis de surmonter les moments de doute et de stress. Tu as été mon pilier de force me poussant à continuer lorsque les choses devenaient difficiles, et célébrant avec moi lorsque j'atteignais des étapes importantes.

Je tiens à remercier **Mes parents, Malika & Said**, pour le soutien financier et moral tout au long de mes études. Leur confiance en moi a été essentielle pour me permettre de réaliser ce rêve. Je remercie également leur soutien inconditionnel tout au long de ce processus. Sans leur amour et leur encouragement, je n'aurais pas été en mesure de terminer cette thèse. Je vous remercie du fond du cœur pour tout, tout simplement !

Pas des moindres merci à **Ma famille** sans qui cette thèse n'aurait pas la même saveur. Merci pour vos encouragements, vos appels, vos textos et vos prières. Merci à mes oncles et tantes, mes cousins et cousines pour votre soutien précieux. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon oncle **El Hassan**

Abdallah et **tata Asmae**, pour leur présence encourageante qui a joué un rôle exceptionnel dans le cheminement de ma thèse. Vos précieux conseils et votre bienveillance ont été une source de motivation tout au long de cette aventure académique.

Je remercie énormément la famille **Boujmaa** de Strasbourg, **Tata Fatna** et **Tonton Hassan**, pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse, leur soutien moral et logistique. Merci pour les précieux conseils, pour les journées découvertes à Strasbourg et en Allemagne, pour les délicieux gâteaux de Strasbourg autour d'un café. Je suis profondément reconnaissante d'avoir croisé votre chemin et d'avoir été intégrée dans votre cercle familial.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les membres de **Ma belle-famille**, pour leur soutien et encouragements tout au long de ma thèse de doctorat. Leur amour et leur compréhension ont été précieux pour moi et ont contribué grandement à mon succès. Je leur suis très reconnaissante.

Je suis profondément reconnaissante envers toutes les personnes, que j'ai cité ou j'ai dû oublier de mentionner. Vous avez contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse. Merci du fond de cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Résumé

Depuis l'antiquité, l'homme a su exploiter la diversité de son environnement pour ses besoins quotidiens (se nourrir, soulager ses souffrances physiques...) se basant sur des ingrédients naturels. Cette thèse porte plus particulièrement sur l'étude et la valorisation de pharmacopées anciennes à travers des outils technologiques modernes. Dans un premier temps, des arguments en faveur d'une rationalité dans leur élaboration ont été rassemblés et analysés. Deux remèdes issus de la pharmacopée médiévale arabe et prescrits contre des infections cutanées ont été étudiés. Le premier, simple et à base de métaux, a montré une synergie d'action à la fois antibactérienne contre les bactéries d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et anti-inflammatoire. Cette synergie est probablement l'une des clés de l'efficacité de ces thérapies anciennes. Le deuxième, encore en cours d'étude, nous a permis de lancer des études sur le pouvoir chélateur de fer de ces remèdes : certains ingrédients peuvent en effet priver les bactéries de fer, élément essentiel à leur survie. Enfin, dans une perspective de stratégie de vectorisation, nous avons étudié par microscopie confocale, les propriétés de liaison d'aptamères aux bactéries PAO1, *E. coli* et *S. aureus*. Les aptamères sont des oligonucléotides ADN ou ARN simple brin, considérés comme alternatifs aux anticorps. Nous avons identifié deux aptamères (issus de la littérature) liant respectivement les bactéries PAO1 et *E. coli*. L'un de ces aptamères permet de discriminer les PAO1 de *S. aureus*. Une perspective directe et concrète de mon projet sera de vectoriser les molécules actives issues des remèdes sélectionnés et étudiés dans cette thèse, après leur fractionnement, grâce à des aptamères.

Mots clefs : Antibiorésistance, aptamères, bactéries pathogènes, pharmacopée médiévale arabe.

Abstract

Throughout history, humans have always known how to exploit the diversity of the environment for daily needs (to feed themselves, to relieve their suffering...), based on therapeutic remedies. This thesis specifically focuses on the study and valorization of ancient pharmacopoeias using modern technological tools. Firstly, arguments in favor of a rationale in their formulation have been gathered and analyzed. Two remedies derived from medieval Arab pharmacopoeia and prescribed for skin infections were studied. The first one, simple and metal-based, demonstrated a dual action as antibacterial against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* bacteria and as anti-inflammatory. This synergy is likely one of the keys to the effectiveness of these ancient therapies. The second remedy, still under study, enabled us to initiate research on the chelating power of iron of these remedies: certain ingredients can indeed deprive bacteria of iron, an essential element for their survival. Finally, in the context of a vectorization strategy, we investigated, using confocal microscopy, the binding properties of aptamers to PAO1, *E. coli*, and *S. aureus* bacteria. Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotides, considered as alternatives to antibodies. We identified two aptamers (from the literature) that respectively bind to PAO1 and *E. coli* bacteria. One of these aptamers allows to discriminate between PAO1 and *S. aureus*. A concrete perspective of my project will be to vectorize the active molecules derived from the selected and studied remedies in this thesis, after their fractionation, using aptamers.

Keywords: Antibiotic resistance, aptamers, medieval Arab pharmacopoeia, pathogen bacteria.

Liste des abréviations

(PbCO₃)₂·Pb(OH)₂ : Carbonate de plomb (II)
hydroxyde de plomb (II)

3D : Tridimensionnelle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique
complémentaire

ADNdb : Acide désoxyribonucléique double
brin

ADNsb : Acide désoxyribonucléique simple
brin

Al568 : Alexa fluor 568

ALOF + COMA A : Extrait d'acétate d'éthyle
du mélange d'*Aloe ferox* et *Commiphora
abyssinicae*

ALOF + COMA D : Extrait de
dichlorométhane du mélange d'*Aloe ferox* et
Commiphora abyssinicae

ALOF + COMA EH : Extrait d'eau/éthanol du
mélange d'*Aloe ferox* et *Commiphora
abyssinicae*

ALOFA : Extrait d'acétate d'éthyle d'*Aloe
ferox*

ALOFEH : Extrait d'eau/éthanol d'*Aloe ferox*

AMC : Composé d'amoxicilline et acide
clavulanique

AmiC : Aptamer-miRNA conjugués

AMPs : Peptide antimicrobiens

Ar : Argent

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNmi : Mico ARN

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNsi : Petit acide ribonucléique interférent

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

AS₂S₃ : Arsenic trisulfide

AS₄S₄ : Tetraarsenic tetrasulfide

AsiCs : Aptamer-siRNA conjugués

ATP synthase : Adénosine Tri-Phosphate
synthase

Au : Or

BHI : Brain Heart Infusion

Bi : Bismuth

BSA : Albumine de sérum bovin

C. striatum : *Corynebacterium striatum*

CFDA : China Food and Drugs Administration

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CMI : Concentration minimale inhibitrice

COMAA : Extrait d'acétate d'éthyle de
Commiphora abyssinicae

COMAD : Extrait de dichlorométhane de
Commiphora abyssinicae

COMAEH : Extrait d'eau/éthanol de
Commiphora abyssinicae

Covid-19 : Maladie à coronavirus 2019

Cu : Cuivre

Cu(CO₂CH₃)₂ ou CuAc : Acétate de cuivre

Cu₂O ou CuO : Oxyde de cuivre

CuCa : Carbonate de cuivre

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

Cy5 : Cyanine 5

Da : Unité de masse atomique unifiée ; dalton

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DARQ : Diarylquinoléines

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à
l'Âge

DO : Densité optique

DPBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Acide éthylène Diamine Tétracétique

EGFR : Récepteur du facteur de croissance
épidermique

ELONA : Tests enzymatiques d'oligonucléotides

ESBL : Bêta-lactamase à spectre étendu (Extended-Spectrum Beta-Lactamases)

EtOAc : Acétate d'éthyle

EtOH : Eau / Éthanol

FDA : Food and Drug Administration

Fe : Fer

Fe₂O₃ : Oxyde ferrique

FeSO₄ : Sulfate de fer

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

GFP : Green Fluorescent Protein

Hg : Mercure

K_d : Constante de dissociation

LB : Lysogeny Broth Lennox

LNA : Acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acids)

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MH II : Mueller Hinton II

MMF : Mycophénolate mofétil

NaCl : Chlorure de sodium

NaN₃ : Azoture de sodium

NP : Nanoparticules

OMS : Organisation mondiale de la santé

ON : Over night

Tris-Hcl : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride

Zn : Zinc

ZnO : Oxyde de zinc

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692

Pb: Plomb

PbO : Oxyde de plomb

PBP : Protéine de liaison à la pénicilline (Penicillin Binding Protein)

PBS : Phosphate buffered saline

PbS : Sulfate de plomb

PCR : Amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PEG : Polyéthylène glycol

PFA : Paraformaldéhyde

QD : Quantum Dots ou points quantiques

RBD : Domaine de liaison au récepteur

RT : Reverse transcriptase

S : Soufre

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. epi : *Staphylococcus epidermidis*

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SELEX : Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)

SM : Succinate Media

TB : Tuberculose

VGEF : Facteur de croissance vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

Liste des figures

FIGURE 1 : STRUCTURE D'UNE CELLULE BACTÉRIENNE (DESSIN RÉALISÉ AVEC L'OUTIL BIORENDER).....	7
FIGURE 2 : DIFFÉRENCE DE LA STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE DES BACTÉRIES	7
FIGURE 3 : LES PRINCIPAUX MÉCANISMES D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES.....	8
FIGURE 4 : UNE CHRONOLOGIE DE L'ÉVOLUTION DES ANTIBIOTIQUES	9
FIGURE 5 : ILLUSTRATION REPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTS MÉCANISMES DE L'ANTIBIORÉSISTANCE.....	11
FIGURE 6 : SCHÉMA ILLUSTRANT LE PROCESSUS DE LA TRANSCRIPTION DE L'ADN DOUBLE BRIN EN ARNm SIMPLE BRIN.	34
FIGURE 7 : ILLUSTRATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES STRUCTURES D'APTAMÈRES	36
FIGURE 8 : SCHÉMA ILLUSTRANT LE PROCESSUS D'UN SELEX D'APTAMÈRES CIBLANT DES BACTÉRIES.....	39
FIGURE 9 : SCHÉMAS ILLUSTRANT LE CELL-SELEX.....	41
FIGURE 10 : LES DIFFÉRENTES MODIFICATIONS AU NIVEAU DE LA POSITION 2' DU SUCRE	43
FIGURE 11 : STRUCTURE DES APTAMÈRES MIROIRS, APPELÉS SPIEGELMERS, AVEC L-DÉSOXYRIBONUCLÉOTIDE (L-ADN).....	44
FIGURE 12 : STRUCTURES CHIMIQUES DES LNA (FIGURE DU HAUT) ET SCHÉMA RÉACTIONNEL DE LA CONJUGAISON DE L'APTAMÈRE À UN POLYÉTHYLÈNE GLYCOL (PEG) DE 40 kDA À L'EXTRÉMITÉ 5' DE L'APTAMÈRE (FIGURE DU BAS),.....	45
FIGURE 13 : SÉQUENCE DU PEGAPTANIB ET STRUCTURE SECONDAIRE PRÉDITE.	46
FIGURE 14 : DISPOSITION DE LA PLAQUE DE 96 Puits POUR LE TEST DES EXTRAITS DES PLANTES SUR LA CROISSANCE DES BACTÉRIES.	61
FIGURE 15 : DISPOSITION DE LA PLAQUE DE 96 Puits POUR LE TEST DES CHÉLATEURS DE FER SUR LA CROISSANCE DES BACTÉRIES.	61
FIGURE 16 : SPECTRES D'ABSORPTION ET D'ÉMISSION DE FLUORESCENCE CARACTÉRISTIQUES DES FLUOROPHORES UTILISÉS DANS NOS ÉTUDES	65
FIGURE 17 : SCHÉMA EXPLICATIF DU TEST QUALITATIF, EFFECTUÉ SUR BOITE DE PETRI	101
FIGURE 18 : RÉSULTATS DES TESTS DES EXTRAITS DE PLANTES (500µG/1,5MG/5MG) SUR GÉLOSE CONTENANT LE BHI, CONTRE LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES PATHOGÈNES	103
FIGURE 19 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE ALOFA SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	105
FIGURE 20 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE ALOFEH SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	106

FIGURE 21 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE COMAA SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	106
FIGURE 22 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE COMAEH SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	107
FIGURE 23 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE COMAD SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	107
FIGURE 24 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE ALOF + COMA A SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.	108
FIGURE 25 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE ALOF+COMA EH SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES	108
FIGURE 26 : RÉSULTAT DU TEST DE L'EXTRAIT DE PLANTE ALOF+COMA D SUR LES DIFFÉRENTES BACTÉRIES	109
FIGURE 27 : TEST DES DEUX FORMES DU CUIVRE CONTRE LES TROIS SOUCHES PATHOGÈNES C. STRIATUM, S. AUREUS ET S. EPIDERMIDIS.....	111
FIGURE 28 : STRUCTURES CHIMIQUES DES QUATRE CHÉLATEURS DE FER ÉTUDIÉS ; DÉFEROXAMINE, DEFERIPRONE, EXJADE ET NOCARDAMINE.....	114
FIGURE 29 : SCHÉMA EXPLICATIF DES TESTS DE LIAISON DES APTAMÈRES AUX BACTÉRIES. ...	123
FIGURE 30 : TEST DE LIAISON DE L'APTAMÈRE F23 SUR LES SOUCHES PAO1, E. COLI MG1655 ET S. AUREUS HG001.....	124
FIGURE 31 : TEST DE LIAISON DE L'APTAMÈRE P1231 SUR LES SOUCHES PAO1, E. COLI MG1655 ET S. AUREUS HG001.....	126
FIGURE 32 : TEST DE LIAISON DE L'APTAMÈRE E2 SUR LES SOUCHES PAO1, E. COLI MG1655 ET S. AUREUS HG001.....	127
FIGURE 33 : TEST DE LIAISON DE L'APTAMÈRE A14 SUR LES SOUCHES PAO1, E. COLI MG1655 ET S. AUREUS HG001.....	129
FIGURE 34 : TEST DE LIAISON DE L'APTAMÈRE SA23 SUR LES SOUCHES PAO1, E. COLI MG1655 ET S. AUREUS HG001.....	130
FIGURE 35 : SCHÉMA EXPLICATIF CORRESPONDANT AU PROTOCOLE UTILISÉ POUR TESTER LES APTAMÈRES CIBLANT UN MÉLANGE BACTÉRIEN.	132
FIGURE 36 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE F23 SUR DIFFÉRENTS MÉLANGES BACTÉRIENS.	134
FIGURE 37 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE E2 SUR DIFFÉRENTS MÉLANGES BACTÉRIENS.	136
FIGURE 38 : TEST DE LA LIAISON DU MÉLANGE DES APTAMÈRES F23 ET E2 SUR LE MÉLANGE PAO1 GFP AVEC E. COLI.....	138

FIGURE 39 : HISTOGRAMMES REPRÉSENTANT LA CROISSANCE DES BIOFILMS DES DIFFÉRENTES BACTÉRIES.....	142
FIGURE 40 : HISTOGRAMMES DE LA PRODUCTION DU BIOFILM DE PAO1 ET DE S. AUREUS EN PRÉSENCE L'APTAMÈRE F23, JN27 ET TUTU22 À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS ET DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE MH II, LB ET SM.....	144
FIGURE 41 : HISTOGRAMME DE L'EFFET DES APTAMÈRES F23, JN27 ET TUTU22 AJOUTÉS À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS ET DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE, 24H APRÈS LA CROISSANCE DU BIOFILM DE PAO1 ET DE S. AUREUS.	145
FIGURE 42 : SCHÉMA EXPLICATIF CORRESPONDANT AU PROTOCOLE UTILISÉ POUR TESTER LA LIAISON DES APTAMÈRES AU BIOFILM DE PAO1 PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	147
FIGURE 43 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE F23 SUR LE BIOFILM DE PAO1.....	148
FIGURE 44 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE E2 SUR LE BIOFILM DE PAO1.	148
FIGURE 45 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE A14 SUR LE BIOFILM DE PAO1	149
FIGURE 46 : TEST DE LA LIAISON DE L'APTAMÈRE TUTU22 SUR LE BIOFILM DE PAO1	149
FIGURE 47 : SCHÉMA ILLUSTRANT UN LIPOSOME CONJUGUÉ À UN APTAMÈRE.....	156

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : STRATÉGIES DE PRÉVENTION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE SELON L'APPROCHE MULTIDISCIPLINAIRE	13
TABLEAU 2 : DESCRIPTION DE QUELQUES PLANTES UTILISÉES À L'ÉPOQUE MÉDIÉVALE ARABE ET LEURS EFFETS THÉRAPEUTIQUES.	23
TABLEAU 3 : LES DIFFÉRENTES FORMES ET MÉTHODES UTILISÉES POUR PRÉPARER LES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES.	28
TABLEAU 4 : MÉDICAMENTS À BASE DE MÉTAUX UTILISÉS À L'ÉPOQUE MÉDIÉVALE ARABE.....	29
TABLEAU 5 : COMPARAISON DE DIFFÉRENTES PROPRIÉTÉS ENTRE LES APTAMÈRES ET LES ANTICORPS.	37
TABLEAU 6 : QUELQUES EXEMPLES D'APTAMÈRES EN COURS D'ESSAIS CLINIQUES	48
TABLEAU 7 : ANTIBIOTIQUES UTILISÉS.....	62
TABLEAU 8 : COMPOSITION DE LA PRÉPARATION DU REMÈDE 1 SÉLECTIONNÉ.	86
TABLEAU 9 : COMPOSITION DE LA PRÉPARATION DU REMÈDE 2 SÉLECTIONNÉ.	100
TABLEAU 10 : LES DIFFÉRENTS EXTRAITS DES DEUX PLANTES ALOE FEROX ET COMMIPHORA ABYSSINICAE, UTILISÉES DANS LE REMÈDE 2.	101
TABLEAU 11 : TEST ANTIBACTÉRIEN DES EXTRAITS DES PLANTES SUR BOITE DE PETRI (N=3) CONTRE LES TROIS BACTÉRIES, EXPRIMÉ EN QUANTITÉ DÉPOSÉE À PARTIR DUQUEL NOUS OBSERVONS DES ZONES D'INHIBITION.	104
TABLEAU 12 : DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES EXTRAITS DE PLANTES CONTRE LES DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES.....	110
TABLEAU 13 : DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES CHÉLATEURS DE FER CONTRE LES SOUCHES PATHOGÈNES ÉTUDIÉES	114
TABLEAU 14 : DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE DES ANTIBIOTIQUES CONTRE S. EPIDERMIDIS.	115
TABLEAU 15 : DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE DES DIFFÉRENTS CHÉLATEURS DE FER, EN PRÉSENCE D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MILIEU.	116
TABLEAU 16 : DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE DES ANTIBIOTIQUES, EN PRÉSENCE DE DÉFÉROXAMINE OU NOCARDAMINE DANS LE MILIEU. .	117
TABLEAU 17 : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES APTAMÈRES CIBLANT DIFFÉRENTES BACTÉRIES PATHOGÈNES.....	120
TABLEAU 18 : DESCRIPTION DES APTAMÈRES SÉLECTIONNÉS POUR L'ÉTUDE DES BACTÉRIES PAO1, E. COLI ET S. AUREUS	121
TABLEAU 19 : RÉCAPITULATIF DU TEST DE LIAISON DES APTAMÈRES AUX BACTÉRIES PLANCTONIQUES.....	139
TABLEAU 20 : RÉCAPITULATIF DU TEST DE LIAISON DES APTAMÈRES AUX MÉLANGES BACTÉRIENS.	140

Liste des publications, communications et participation à des congrès

Publications:

Abdallah B, Benhassou H. A, Sbabou L, Bintz R. J, Choulier L, Pitchon V, Fechter P. History as a Source of Innovation in Antimicrobial Drug Discovery. Biomed Pharmacol J 2023;16(2).

Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., BenHassou, H. A., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalsk, J.I., Mislin, L.A.G., Fournel, S., Pitchon, V., Fechter, P. (2022). Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 71, p.126926.

Cruz Da Silva E, Foppolo S, Lhermitte B, Ingremeau M, Justiniano H, Klein L, Chenard MP, Vauchelles R, Abdallah B, Lehmann M, Etienne-Selloum N, Dontenwill M, Choulier L. Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity. Pharmaceutics. 2022 Sep 20;14(10):1980.

Communications orales / par affiche :

Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalk, I.J., Mislin, G. L. A., Fournel, S., Pitchon, V.; Fechter, P. (2022). Past mastering of metal transformation enable physicians to increase their therapeutic potential. Journées doctorales au sein de la faculté des sciences de Rabat, Maroc. Mai 2023. (**Présentation orale**).

Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalk, I.J., Mislin, G. L. A., Fournel, S., Pitchon, V.; Fechter, P. Caractérisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée arabe. Journées doctorales au sein de la faculté des sciences de Rabat, Maroc. Juillet 2022. (**Présentation orale**).

Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalk, I.J., Mislin, G. L. A., Fournel, S., Pitchon, V.; Fechter, P. (2022). Past mastering of metal transformation enable physicians to increase their therapeutic potential. 1 er congrès national de l'innovation thérapeutique à Casablanca, Maroc. Juin 2022. (**Poster**).

Abdallah, B., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Fechter, P. Caractérisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée arabe. Journée du Campus d'illkirch JCI2021, Strasbourg, France. Avril 2021. (**Présentation orale**).

Abdallah, B., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Fechter, P. Caractérisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée arabe. Journée scientifique entre jeunes chercheurs au sein de l'UMR7242 WIP2019, Strasbourg, France. Novembre 2019. **(Présentation orale)**.

Participation aux congrès :

1^{er} congrès national de l'innovation thérapeutique à Casablanca, Maroc. Juin 2022. **(Poste)**.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT	I
LISTE DES ABRÉVIATIONS	II
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET PARTICIPATION À DES CONGRÈS	VIII
INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
CHAPITRE 1.....	3
ANTIBIOTIQUES & RÉSISTANCE.....	3
1. <i>Bactéries, antibiotiques et mécanismes de résistance</i>	4
1.1. <i>Antibiotiques</i>	4
1.2. <i>Bactéries et mécanismes d'action des antibiotiques</i>	6
2. <i>Antibiorésistance</i>	8
2.1. <i>Définition</i>	8
2.2. <i>Mécanismes de l'antibiorésistance</i>	10
2.3. <i>Stratégies de lutte contre l'antibiorésistance</i>	12
CHAPITRE 2.....	20
INTRODUCTION DES SCIENCES MÉDICO-PHARMACEUTIQUES ARABO- MUSULMANES	20
1. <i>Thérapies naturelles à base de plantes</i>	21
2. <i>Thérapies naturelles à base de métaux</i>	22
CHAPITRE 3.....	32
STRATÉGIE DE CIBLAGE À BASE D'APTAMÈRES	32
1. <i>Généralités</i>	33
2. <i>Aptamères</i>	35
2.1. <i>Définition et caractéristiques</i>	35
2.2. <i>Technique de SELEX</i>	37
2.3. <i>Stabilité des aptamères</i>	43
2.4. <i>Applications</i>	47
OBJECTIFS DE LA THÈSE	55
PARTIE EXPERIMENTALE	56
MATERIELS ET METHODES	56

1. Souches bactériennes	57
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	57
1.2. <i>Staphylococcus</i> sp.	57
1.3. <i>Escherichia coli</i> MG1655.....	58
1.4. <i>Corynebacterium striatum</i>	58
2. Milieux de culture et préparations.....	58
2.1. Lysogeny broth Lennox.....	59
2.2. Brain Heart infusion.....	59
2.3. Mueller Hinton II.....	59
2.4. Succinate media.....	59
3. Test de l'activité antibactérienne des remèdes anciens.....	60
3.1. Test qualitatif.....	60
3.2. Test quantitatif.....	60
4. Test de l'apta-fluorescence sur une bactérie ou sur différentes bactéries simultanément	63
4.1. Essais fonctionnels de liaison des aptamères aux bactéries	63
4.2. Essais de liaison des aptamères aux biofilms bactériens	66
PARTIE EXPERIMENTALE	68
RESULTATS & DISCUSSION	68
CHAPITRE 1.....	69
EXPLORATION DES REMÈDES ANCIENS : RÉVÉLER DES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES CONTRE LES PATHOGÈNES RÉSISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES.....	69
1. Introduction de la revue : History as a Source of Innovation in Antimicrobial Drug Discovery	70
2. Études des thérapies naturelles sélectionnées	85
2.1. Introduction à l'article 1 : Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential.....	86
2.2. Remède 2.....	100
3. Étude des chélateurs de fer	113
3.1. Test de l'activité antibactérienne des chélateurs de fer	113
3.2. Test de la synergie entre les chélateurs de fer et les antibiotiques sur <i>S.</i> <i>epidermidis</i>	115
CHAPITRE 2.....	118
CIBLAGE DES BACTÉRIES PATHOGÈNES PAR DES APTAMÈRES.....	118
1. Identification d'aptamères ciblant PAO1, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> et <i>M. tuberculosis</i>	119
2. Test de liaison des aptamères aux bactéries planctoniques.....	122
2.1. Liaison d'un aptamère par bactérie.....	122
2.2. Liaison d'un ou de deux aptamères sur un mélange de deux bactéries.....	131
3. Test de liaison des aptamères aux biofilms	141
3.1. Étude de la croissance des biofilms	141

3.2. Étude de l'effet des aptamères sur la croissance des biofilms de PAO1 et de *S. aureus* 142

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
REFERENCES	157
ANNEXES.....	169

INTRODUCTION

Depuis des millénaires, l'homme a su exploiter l'environnement qui l'entourait (plantes, minéraux...) afin de se nourrir et de soulager ses souffrances physiques. Les antibiotiques, molécules 'miracles' permettant de combattre les infections bactériennes ont été découvertes il y a un peu plus d'un siècle. Ces molécules ont permis de sauver des millions de vie. Malheureusement, sous l'influence de plusieurs facteurs, et pour chaque classe d'antibiotique, des mécanismes de résistance sont apparus. Mon travail de doctorat met l'accent sur la lutte contre la problématique de l'antibiorésistance, qui fut et reste l'une des grandes menaces de santé humaine à l'échelle mondiale, ainsi que sur la recherche de solutions alternatives aux antibiotiques classiques.

Cette situation est d'autant plus alarmante que très peu de nouveaux antibiotiques / nouvelles stratégies ont vu le jour ces dernières années, alors même que de nombreuses solutions pour combattre ces infections avaient été proposées au cours des siècles passés. Ce vivier pourrait-il à nouveau servir à l'identification de molécules originales ? En parallèle, de nouvelles stratégies sont développées. Certaines sont basées sur le ciblage thérapeutique qui permettrait de réduire les problèmes de solubilité et les doses utiles des drogues délivrées pour diminuer leur toxicité, mais aussi de délivrer un ensemble de molécules différentes au foyer infectieux. Nous nous intéressons particulièrement au ciblage bactérien grâce à des molécules innovantes nommées aptamères. Ce sont des séquences d'acides nucléiques qui ont la capacité de se lier à une cible avec une grande affinité et spécificité et sont donc des molécules proposées en alternative à l'utilisation d'anticorps.

La présente thèse s'inscrit dans le cadre d'*une cotutelle France-Maroc*, avec le laboratoire des biotechnologies médicales de la fondation MAScIR (Rabat, Maroc), le laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté des sciences de Rabat, le laboratoire de biologie et signalisation cellulaire de Strasbourg (UMR 7242, ESBS, équipe des métaux et microorganismes), et le laboratoire de bio imagerie et pathologies de la faculté de pharmacie de Strasbourg (UMR 7021). Ce projet s'intègre dans un projet pluridisciplinaire afin d'exploiter des pharmacopées anciennes pour des applications thérapeutiques anti-infectieuses, et a été financé par le programme Hubert Curien Toubkal, projet des coopérations scientifiques franco-marocaine. Il a été initié par Dr. Fechter Pierre, microbiologiste au sein de l'UMR 7242 (équipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications, Strasbourg), en collaboration avec Pr. Vonthron-Senecheau Catherine, pharmacogyste au sein de l'UMR 7200 (équipe Chimie-Biologie Intégrative et Pharmacognosie, Strasbourg), Dr. Pitchon Véronique,

historienne au sein de l'UMR 7044 (équipe Territoires et empire d'Orient, Strasbourg), Dr. Choulier Laurence, biochimiste spécialisée dans la vectorisation au sein de l'UMR 7021 (équipe Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires, Illkirch). Les expériences décrites dans la partie Résultats ont été réalisées et analysées, au sein des UMRs 7242 et 7021.

Ce manuscrit est divisé en plusieurs parties :

La partie bibliographique est divisée en **trois chapitres**, dresse un état de l'art sur le projet. Le premier chapitre permet de faire le point sur le problème de la résistance aux antibiotiques, sur les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance, et sur les différentes stratégies actuelles pour contrer l'antibiorésistance.

Le deuxième chapitre précise l'intérêt que peut avoir l'étude des manuscrits anciens dans l'identification de nouvelles stratégies antibactériennes, en se focalisant sur la période du Moyen Age Arabe, considérée comme l'Age d'or de la médecine antique.

Le troisième chapitre introduit l'utilisation des aptamères dans une perspective de vectorisation de remèdes ou de nouvelles molécules thérapeutiques.

La partie expérimentale décrit **le matériel et les méthodes** utilisés, suivie de la partie des **résultats et discussion** qui est divisée en deux chapitres.

Le premier donne des arguments en faveur d'une rationalité dans l'élaboration des remèdes anciens en se basant sur la pharmacopée médiévale arabe en tant que source privilégiée de manuscrits et remèdes. Ainsi, l'objectif est de sélectionner et caractériser des remèdes de la pharmacopée médiévale arabe au regard de leurs propriétés biologiques et plus particulièrement l'étude de deux remèdes identifiés de la pharmacopée médiévale arabe qui contiennent principalement des métaux ou des extraits de plantes utilisés essentiellement contre les infections cutanées. En effet, les plantes contiennent de nombreux composés phénoliques, dont certains pourraient chélater des métaux comme le fer et ainsi priver les bactéries de ce nutriment. Nous avons étudié différents chélateurs de fer sur la croissance de différentes souches bactériennes.

Le deuxième chapitre a pour objectif d'étudier différents aptamères ciblant des bactéries pathogènes afin de les utiliser, à long terme, en tant que vecteurs pour les molécules ou les combinaisons de molécules issues de l'étude des pharmacopées arabes médiévales pour des applications cliniques.

Le projet de ma thèse a pour objectif d'étudier différents remèdes issus de la pharmacopée arabe médiévale et d'envisager des méthodes modernes de vectorisation de ces remèdes grâce à des aptamères, dans l'objectif d'identifier de nouvelles combinaisons et/ou stratégies

thérapeutiques. L'étude a été menée sur deux remèdes différents, composés de métaux et plantes ou l'association des deux. Ces remèdes ont été sélectionnés parmi plusieurs remèdes anciens issus de pharmacopées arabes, et sont prescrits contre des infections cutanées de type abcès ou furoncle. La composition et la formulation de ces remèdes sont indiquées dans la partie expérimentale (Résultats et discussion, chapitre 1-2. Etudes des thérapies naturelles sélectionnées).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

Antibiotiques & résistance

Chapitre 1 : Antibiotiques & résistance

Un antibiotique est défini comme étant une substance naturelle ou synthétique capable d'inhiber la croissance bactérienne (bactériostatique) ou de tuer les bactéries (bactéricide). Depuis une centaine d'années, de multiples variétés d'antibiotiques ont été développées pour lutter contre les infections. Ces médicaments ont changé la médecine et ont sauvé des millions de vies, donnant l'illusion que le traitement des infections était un problème résolu et laissant présager que les infections pouvaient être un sujet marginal. Or, 15 ans après sa découverte par Alexander Fleming, l'apparition de résistance à la pénicilline a malheureusement refroidi ces espoirs ¹. Depuis lors, l'émergence de la résistance aux différentes classes d'antibiotiques a augmenté rapidement dans le monde entier, et représente aujourd'hui une menace croissante pour la santé, impliquant la recherche sur les agents pathogènes microbiens et le développement de médicaments antimicrobiens.

Pour présenter le contexte de mon projet, je présenterai l'histoire de la découverte des antibiotiques et de l'apparition des résistances, les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, et finalement certaines solutions / stratégies nouvelles qui ont pu être proposées pour combattre cette résistance.

1. Bactéries, antibiotiques et mécanismes de résistance

1.1. Antibiotiques

L'ère pré-antibiotique a été caractérisée par des terribles scénarios de pandémies qui ont touché l'Homme, comme la peste dont l'agent responsable, la bactérie *Yersinia pestis*, a été découvert par le bactériologiste Alexandre Émile Yersin (1863-1943) ¹. Au Moyen Âge, toute forme de maladie était traditionnellement attribuée à une mauvaise qualité de l'air, à des miasmes, à des alignements planétaires défavorables ou à un déséquilibre entre les quatre éléments ; feu, terre, eau et air, et les quatre sucs corporels ; sang, mucus, bile jaune et bile noire ¹.

Louis Pasteur (1822-1895) est considéré comme le pionnier de la microbiologie. Il est le premier à prouver que des agents pathogènes sont responsables de maladies infectieuses. Ses découvertes ont été plutôt liées aux principes de la vaccination (l'anthrax, le choléra et la rage), la pasteurisation et la théorie des germes ¹. Il a été le premier à proposer que les microbes peuvent sécréter des substances pour tuer d'autres bactéries ².

Robert Koch (1843-1910) a été le premier à identifier des agents pathogènes responsables de maladies infectieuses, notamment les bactéries. Koch a découvert le bacille responsable de l'anthrax (*Bacillus anthracis*). Il a également identifié les agents spécifiques du choléra (*Vibrio cholerae*) et de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Lorsqu'il a commencé ses travaux sur la tuberculose en 1881, il a réussi à mettre en place le protocole classique de coloration avec le colorant de Ziehl-Neelsen, dans des tissus et à cultiver le pathogène ¹.

Le premier antibiotique a été découvert par Bartolomeo Gosio, un scientifique italien dans les années 1893. Il s'agit d'un composé antibactérien ; l'acide mycophénolique produit par *Penicillium brevicompactum*. Il a montré une activité antibactérienne efficace contre la bactérie de l'anthrax *Bacillus anthracis*. Aujourd'hui, l'un de ses dérivés chimiques appelé mycophénolate mofétil (MMF) est utilisé en tant qu'immunosuppresseur dans les transplantations d'organes ^{1,3}. En 1909, un nouveau médicament contre la syphilis et la trypanosomiase a été découvert par Ehrlich et Hata dont l'appellation est Salvarsan ou le 606, mais qui a fini par être abandonné suite aux dérivés toxiques d'arsenic qui sont libérés lors de sa voie de synthèse ¹. Ehrlich a examiné de nouveaux produits en améliorant le Salvarsan en Neosalvarsan, avec une toxicité réduite en raison de la faible concentration d'arsenic passant de 30% à 19% ¹, le Salvarsan/Neosalvarsan est resté le médicament de choix jusqu'à ce que la pénicilline soit découverte par Alexander Fleming.

En 1928, Alexander Fleming a redécouvert la pénicilline de manière fortuite. Il a constaté l'inhibition de la croissance du *Staphylococcus aureus* par un champignon ayant poussé sur boîte de Pétri oubliée sur une paille pendant deux semaines de congés. Ce champignon correspond au *Penicillium notatum* ⁴.

Environ 30 ans avant qu'Alexander Fleming ne découvre/redécouvre la pénicilline, Ernest Duchesne (1874-1912), un médecin français, a remarqué l'activité antibactérienne des moisissures, comme tant d'autres avant lui ¹. Il a étudié les interactions entre les bactéries et les champignons producteurs d'antibiotiques et a été le premier à évoquer une application thérapeutique de ces micro-organismes producteurs d'antibiotiques ¹. Les travaux de Duchesne ont été confirmés par Chain, Florey et leurs collègues, qui ont identifié l'antibiotique produit par une espèce de *Penicillium* et son effet contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ¹.

La classe des sulfamides a été découverte par Paul Gerhard Domagk dans les années 1930, ce qui a constitué une étape importante dans l'histoire des antibiotiques ¹. Ce scientifique a été chargé d'identifier des colorants azoïques antibactériens. Ainsi, il a découvert qu'un colorant, le sulfamidochrysoïdine avait un effet sur les streptocoques. Cette substance a été brevetée sous

le nom de Prontosil, et Paul Gerhard Domagk a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1939¹. La résistance aux sulfamides a été décrite dès 1942¹.

Au début des années 1930, des peptides antibactériens extraits de bactéries du sol ont été découverts. Ces bactéries sont souvent du genre de *Bacillus*. La gramicidine, un oligopeptide isolé de *Bacillus brevis* par René Dubos, a montré une activité inhibitrice sur la croissance d'une variété d'espèces bactériennes Gram positif⁴.

Les premières études de l'activité antibactérienne issue des bactéries du sol ont été réalisées par Selman Waksman. Dans les années 40, plusieurs antibiotiques et antifongiques furent découverts, comme l'actinomycine (à partir de *Streptomyces antibioticus*), la streptomycine (à partir de *Streptomyces griseus*), la néomycine (à partir de *Streptomyces fradiae*), la fumigacine (à partir de *Aspergillus fumigatus*), et la clavacine (à partir de *Aspergillus clavatus*)⁴. Certains d'entre eux sont encore utilisés de nos jours. En outre, la streptomycine a révolutionné le traitement de la tuberculose et est toujours active contre les souches multirésistantes de la tuberculose⁵. A partir des années 1980s, d'autres antibiotiques ont été découverts et synthétisés dont les sulfonamides, les quinolones et les céphalosporines.

La découverte des antibiotiques est considérée comme une des grandes avancées médicales qui a permis de réduire les grandes épidémies et de sauver les millions de vies à l'échelle mondiale. Ces molécules peuvent être classées selon leur origine, leur spectre d'activité ou encore leur mécanisme d'action.

1.2. Bactéries et mécanismes d'action des antibiotiques

Afin d'analyser le mécanisme de la résistance aux antibiotiques, il est important de comprendre la structure des cellules bactériennes (figure 1) ainsi que les modes d'action des antibiotiques.

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes. Elles sont formées d'un cytoplasme qui renferme le matériel génétique sous forme d'un chromosome bactérien, associé ou non, à des minichromosomes circulaires appelés plasmides. Le cytoplasme est entouré d'une membrane plasmique autour de laquelle se trouve une paroi bactérienne. Cette dernière peut être fine dans le cas des bactéries à Gram négatif, ou épaisse chez les bactéries à Gram positif (figure 2). Le composant principal de la paroi bactérienne est le peptidoglycane⁶. Certaines bactéries sont généralement entourées par une capsule bactérienne qui permet de protéger la bactérie de la phagocytose des cellules de l'hôte, d'adhérer à des surfaces et d'augmenter la virulence en rendant la bactérie plus difficile à éliminer par le système immunitaire de l'hôte⁶.

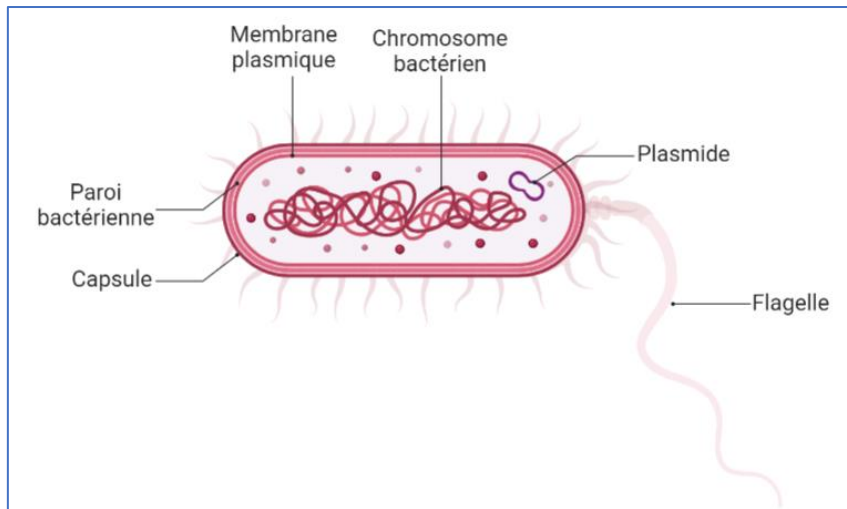


Figure 1 : Structure d'une cellule bactérienne (dessin réalisé avec l'outil Biorender).

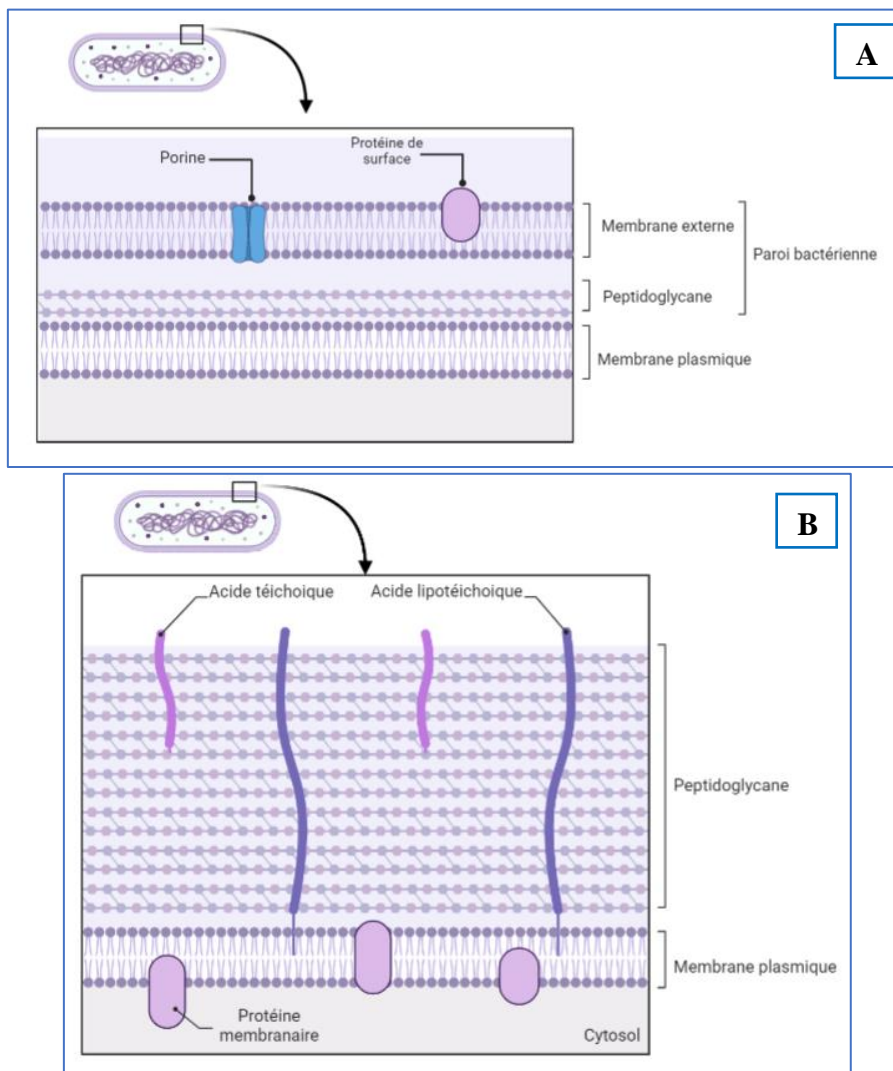


Figure 2 : Différence de la structure de la paroi cellulaire des bactéries
A : Bactérie à gram négatif. **B** : bactérie à gram positif. (Schémas réalisés avec Biorender)

Les antibiotiques peuvent agir sur différentes cibles (figure 3) ⁷ :

- La paroi bactérienne : les beta-lactamines, les glycopeptides et les carbapénèmes inhibent la synthèse d'éléments essentiels pour la paroi, ce qui entraîne la lyse bactérienne.
- La membrane plasmique : les polymyxines agissent au niveau de la membrane plasmique afin d'inhiber la synthèse d'éléments nécessaires à la survie bactérienne.
- Les protéines : les aminosides, les tétracyclines et les macrolides participent à l'inhibition de la synthèse protéique. Les sous-unités ribonucléoprotéiques 30S et 50S constituent les deux composants du ribosome 70S bactérien. Le composant 30S ou 50S du ribosome bactérien est la cible de ces antibiotiques.
- Le matériel génétique bactérien : Certains antibiotiques ont la capacité de bloquer la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN. Ce processus concerne généralement la famille des quinolones.

Ci-dessous, la figure 3 récapitule sous forme de schéma, les différents mécanismes d'action des antibiotiques décrits.

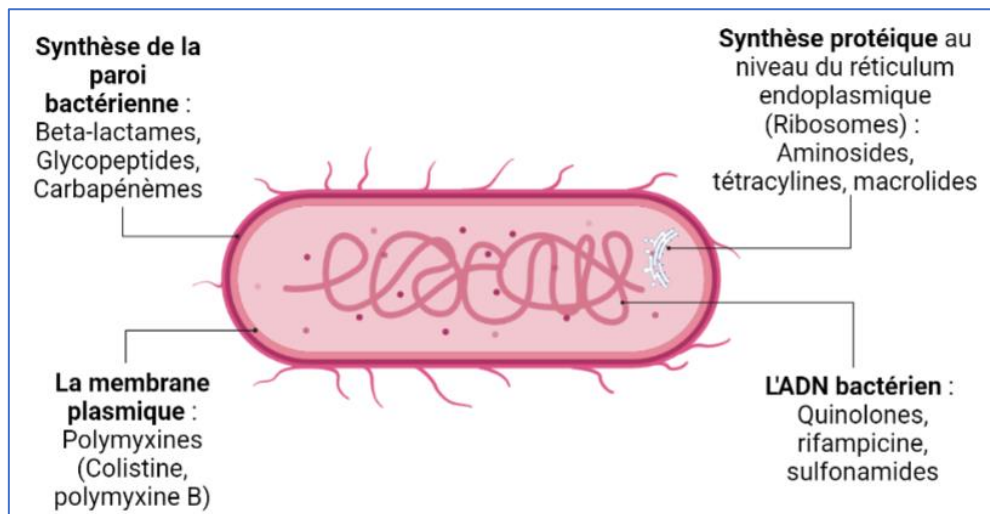


Figure 3 : Les principaux mécanismes d'action des antibiotiques.

2. Antibiorésistance

2.1. Définition

Depuis leur découverte, les antibiotiques sont devenus des outils efficaces pour traiter différentes maladies infectieuses. Cependant, plusieurs facteurs dont leur utilisation excessive en médecine humaine, a permis au monde bactérien de s'adapter aux antibiotiques et d'entraîner des résistances (figure 4) ². Selon l'OMS, la résistance aux antibiotiques constitue l'une des plus grandes menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement.

Le phénomène de la résistance est aussi observé chez les virus, les champignons et aussi les cellules humaines, dans le cas des traitements contre le cancer ou le diabète. On définit la résistance aux antibiotiques d'une bactérie comme la capacité des bactéries à survivre et à se développer en présence d'un antibiotique.

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques ; la résistance intrinsèque ou naturelle et la résistance acquise ⁸.

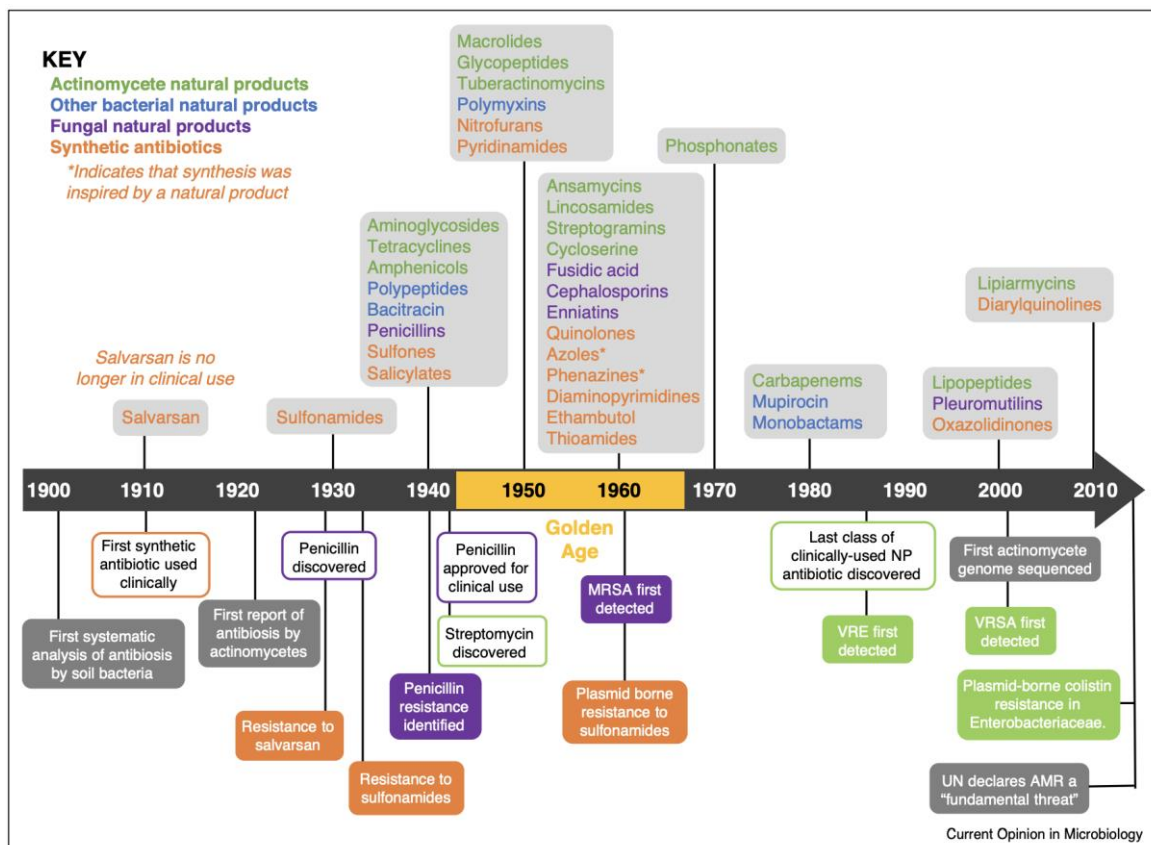


Figure 4 : Une chronologie de l'évolution des antibiotiques. Les antibiotiques sont colorés selon leur source ; vert : actinomycètes, bleu : autres bactéries, violet : champignons et orange : synthétiques. Au bas de la frise chronologique figurent les dates clés relatives à la découverte des antibiotiques et à la résistance de chacun, notamment les premiers rapports sur les souches résistantes aux médicaments : S. aureus résistant à la métilcilline (MRSA), entérocoques résistants à la vancomycine (VRE), S. aureus résistant à la vancomycine (VRSA) et résistance à la colistine transmise par plasmide chez les entérobactéries ². Avec les abréviations ; AMR : Antimicrobial resistance, NP : Natural products, UN : United nations organization.

2.1.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle est due à la présence de gènes communs à toutes les bactéries d'une même espèce. Ces gènes peuvent présenter des particularités différentes, structurales ou métaboliques.

2.1.2. La résistance acquise

Les bactéries font preuve d'une étonnante plasticité génétique, ce qui leur permet de s'adapter à un large éventail de facteurs de stress environnementaux, notamment la présence

d'antibiotiques qui menacent leur survie. L'acquisition de la résistance aux antibiotiques est due à des modifications génétiques et à l'acquisition de nouveaux gènes exogènes. Les bactéries ont développé des méthodes anciennes pour tolérer la présence d'une molécule antibiotique nuisible. Pour s'adapter, elles utilisent deux stratégies génétiques de base :

- Des mutations dans le ou les gènes liés à la cible d'un antibiotique ou aux transporteurs de cet antibiotique qui se traduisent par des modifications structurales pouvant entraîner une imperméabilité à un ou plusieurs antibiotiques⁹.
- L'acquisition d'un ADN extra-chromosomique, généralement un plasmide. Ce dernier est un fragment d'ADN qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Il peut être transmis d'une bactérie donneuse à une bactérie dite receveuse. Contrairement à la mutation de l'ADN chromosomique, cette méthode permet l'acquisition rapide de la résistance et même de multirésistance selon trois mécanismes alternatifs ; la transduction (utilisation d'un bactériophage comme vecteur), la transformation (où la bactérie capture l'ADN) et la conjugaison (transfert du plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'une espèce différente par contact *via* les pili sexuels)⁹.

2.2. Mécanismes de l'antibiorésistance

Il existe quatre mécanismes par lequel la bactérie résiste à un antibiotique :

- Modification de la cible de l'antibiotique.
- Inactivation enzymatique de l'antibiotique.
- Imperméabilité.
- Pompes à efflux.

La figure 5 récapitule les différents mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

10.

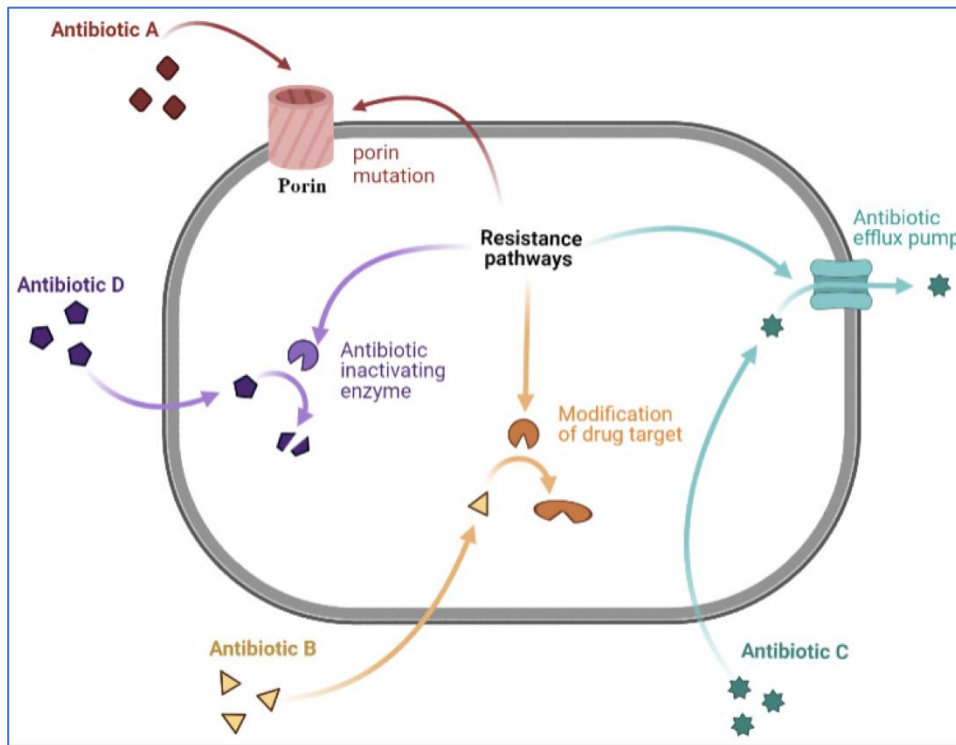


Figure 5 : Illustration représentant les différents mécanismes de l'antibiorésistance.

L'antibiotique A correspond au mécanisme de l'imperméabilité ; B à la modification de la cible ; C au système de pompes à efflux ; et D à l'inactivation par les enzymes bactériennes.

2.2.1. Modification de la cible de l'antibiotique

Les variations naturelles ou les changements acquis dans les cibles des antibiotiques qui empêchent leur liaison constituent un mécanisme courant de la résistance. Les modifications de la cible résultent souvent de la mutation d'un gène bactérien sur le chromosome. Par exemple, une altération de la sous unité ribosomale peut atténuer les effets des macrolides qui ne peuvent pas se lier. Cette altération entraîne une inhibition de la synthèse protéique ¹¹.

2.2.2. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Certaines bactéries ont la capacité de produire une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique. Il existe trois principales enzymes qui inactivent les antibiotiques, à savoir les β -lactamases, les enzymes modifiant les aminoglycosides et les chloramphénicol acétyltransférases ⁷. *Staphylococcus aureus*, par exemple, fait partie de ces bactéries productrices d'enzymes inhibitrices. Elles sont susceptibles de produire des beta-lactamases transmises par des plasmides et d'inhiber l'action des pénicillines ou les céphalosporines. Les entérobactéries, en particulier, produisent une large gamme de beta-lactamases.

2.2.3. Imperméabilité

Les bactéries à Gram négatif sont munies d'une enveloppe, la paroi externe, qui sert de barrière et protège les protéines de liaison aux pénicillines ('penicillin-binding proteins', PBP) du milieu externe. Les nutriments doivent traverser cette paroi afin de pénétrer à l'intérieur de la bactérie. Le passage se fait par diffusion passive à travers des canaux appelés les porines. L'imperméabilité se produit par la diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site suite à une modification de la membrane externe ou interne de la bactérie. Une altération par exemple des porines présentes dans la paroi des bactéries à Gram négatif, peut réduire ou bloquer le passage de l'antibiotique et donc sa pénétration jusqu'à sa cible ¹¹.

2.2.4. Pompes à efflux

Les protéines membranaires qui exportent les antibiotiques hors de la cellule et maintiennent leurs faibles concentrations intracellulaires sont appelées pompes d'efflux. Avant que les antibiotiques n'atteignent leur cible, le mécanisme d'efflux les pompent à nouveau au même rythme qu'ils sont entrés dans la cellule. Contrairement aux porines qui sont situées dans la paroi bactérienne, ces pompes se trouvent dans la membrane cytoplasmique. Tous les types d'antibiotiques, à l'exception des polymyxines, peuvent provoquer l'activation des systèmes d'efflux ⁷. Parmi les bactéries d'importance clinique munies d'une pompe à efflux comme mécanisme de résistance, on trouve *E. coli* et *Shigella spp.* *S. aureus* peut également comporter une pompe à efflux lui permettant d'acquérir une résistance aux macrolides ¹¹.

2.3. Stratégies de lutte contre l'antibiorésistance

Les antibiotiques ont été une avancée majeure dans le domaine médical afin de combattre les infections bactériennes et de sauver des vies. Cependant, la résistance aux antibiotiques menace leur efficacité. Dans cette perspective, la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques sont cruciaux pour faire face à cette problématique.

La mauvaise utilisation, l'usage abusif, ou l'utilisation de posologies insuffisantes augmentent la probabilité qu'une bactérie développe une résistance. Le tableau 1 ci-dessous résume les différentes stratégies pour prévenir ou retarder la résistance bactérienne aux antibiotiques ¹².

Tableau 1 : *Stratégies de prévention de l'antibiorésistance selon l'approche multidisciplinaire* ¹²

Stratégies	Moyens	Effets
Lutte contre les infections	Vaccination	Prévenir l'infection et la réduction de l'utilisation des antibiotiques.
Diagnostic adéquat et traitement efficace des infections	Utilisation de nouvelles technologies afin d'identifier le pathogène comme des tests rapides de diagnostic. Déterminer le choix de l'antibiotique à utiliser. Évaluer la sensibilité (antibiogramme) afin de déterminer la posologie adéquate.	Réduction du risque de l'émergence des antibiotiques.
Utilisation judicieuse des antibiotiques	Définir et mettre en œuvre des directives institutionnelles ou relatives au système de prestation de soins de santé pour les principaux types d'utilisation d'antimicrobiens.	Prévenir l'usage abusif des antibiotiques à large spectre.

La découverte de nouveaux antibiotiques implique une bonne compréhension des mécanismes de résistance bactérienne et l'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs recherches menées à ce jour ont pour objectifs d'améliorer l'activité des antibiotiques existants ou de trouver de nouvelles voies thérapeutiques afin de combattre les maladies infectieuses. Quelques exemples de nouvelles voies thérapeutiques sont décrites ci-dessous.

2.3.1. Huiles essentielles

Pendant des siècles, les huiles essentielles ont joué un rôle essentiel dans les pratiques médicinales anciennes et les applications thérapeutiques. Au-delà de leurs utilisations traditionnelles, les industries alimentaires modernes exploitent leur potentiel aromatique ¹³. Dans une étude approfondie menée par Calo et al (2015), la composition complexe des huiles essentielles comprend des terpènes, terpénoïdes, esters, alcools, acides, aldéhydes et cétones ¹⁴. Comprendre leur activité antibactérienne est souvent délicat en raison de la complexité de leur composition.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les actions des composés chimiques contenus dans les huiles essentielles ¹⁴. L'action antimicrobienne des huiles essentielles pourrait être attribuée à leur capacité à pénétrer à travers les membranes bactériennes et à exercer une activité inhibitrice sur les propriétés fonctionnelles de la cellule. La propriété hydrophobe des

huiles essentielles et de leurs constituants leur permet d'interagir avec et de perturber les lipides présents dans les membranes cellulaires bactériennes et les mitochondries, fragilisant les membranes, ce qui les rend plus susceptibles aux dommages ou à la destruction ¹⁴.

Plusieurs études ont mis en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites de diverses sources végétales. Hriouech et al (2020) ont réalisé une étude ayant pour objectif de tester l'effet du 1,8-cinéole, appelé aussi l'eucalyptol, qui est le principal constituant de l'huile d'*Eucalyptus globulus*, contre les souches de *Staphylococcus aureus*, seul ou en combinaison avec de l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) et de la gentamicine. Les résultats *in vitro* ont montré que la combinaison des deux antibiotiques avec l'eucalyptol avait un effet synergique. Ainsi, *in vivo*, une réduction significative du nombre de colonies dans la moelle osseuse a été observée lorsque des lapins ont été traités avec l'AMC associé soit au 1,8-cinéole soit à la gentamicine par rapport aux lapins traités avec l'AMC, la gentamicine ou le 1,8-cinéole seul ¹⁵. Dans la même directive, l'étude d'Akhmouch et al (2022) vise à évaluer l'action synergique de l'AMC associé au 1,8-cinéole sur des isolats cliniques de souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*, extrêmement productrices de beta-lactamases ESBL (Extended-spectrum beta-lactamases), ainsi qu'à déterminer l'effet de cette association sur le mécanisme de résistance enzymatique des ESBL. Les résultats du test enzymatique ont montré que l'association de l'AMC avec le 1,8-cinéole influence notamment la résistance enzymatique en diminuant l'affinité de l'antibiotique beta-lactame, l'AMC, pour l'enzyme beta-lactamase. Tous les résultats obtenus suggèrent que l'association AMC/1,8-cinéole pourrait être employée en thérapie pour surmonter la résistance bactérienne à l'AMC tout en réduisant la prévalence de la résistance ¹⁶. Il sera probablement nécessaire de déterminer le mécanisme d'action de telles associations avant d'envisager leur utilisation thérapeutique.

Les interactions antibiotiques-huiles essentielles ne sont pas toujours positives. Tetard et al 2021 ont évalué les effets du citral, principal composant de l'huile de citronnelle, sur la sensibilité *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques. Ils ont montré que de faibles concentrations de citral (2 ou 4 mg/mL) augmentaient l'expression des gènes codant pour les systèmes d'efflux responsables de la résistance aux multi-drogues, appelés *MexEF-OprN* et *MexXY/OprM*, ainsi qu'à la résistance bactérienne aux antibiotiques anti-pseudomonas, notamment l'imipénème, la gentamicine, la tobramycine, la ciprofloxacine et la colistine ¹⁷.

2.3.2. Vectorisation d'antibiotiques

Une approche prometteuse qui permet de surmonter la perméabilité de la paroi cellulaire des bactéries et de réduire l'accumulation intracellulaire consiste à lier un antibiotique à un sidérophore ¹⁸. Ces derniers sont des molécules organiques ayant une grande affinité pour le fer. Cet élément est nécessaire à tous les organismes vivants en tant que cofacteur dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux et essentiels tels que le transfert d'électrons, la respiration cellulaire et le métabolisme des superoxydes ¹⁹. Leurs poids moléculaires varient entre 150 et 2000 Da ¹⁸. Ces conjugués de sidérophores-antibiotiques, pénètrent dans les cellules bactériennes par les voies d'absorption spécifiques et délivrent une molécule toxique ²⁰. Ainsi, le pathogène absorbera l'antibiotique en même temps que le fer. Ces conjugués sont appelés des sidéromycines ²¹. Quelques sidéromycines naturelles ont été identifiées, comprenant les albomycines, les ferrimycines, les danomycines, les salmycines et certaines microcines ²¹. Ces conjugués sidérophores-antibiotiques naturels sont transportés dans la bactérie ciblée par des voies d'absorption du fer dépendant du sidérophore. Ce transport couplé à l'énergie à travers les membranes bactériennes augmente considérablement l'efficacité antibiotique des sidéromycines ²¹.

Zhanel et al (2019) ont montré l'efficacité d'un conjugué synthétique entre la céphalosporine et un dérivé de sidérophore, conjugué qui a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 2019. Il s'agit du Cefiderocol, qui présente une puissance antibactérienne accrue par rapport aux céphalosporines analogues de troisièmes et quatrièmes générations telles que la ceftazidime et la céfépime. Le Cefiderocol utilise le transport du fer pour absorber les agents pathogènes à Gram négatif. Il induit une sensibilité et une élimination accrue des souches d'agents pathogènes à Gram négatif résistantes aux antibiotiques, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii* et *Enterobacteriaceae* ²².

2.3.3. La phagothérapie

Les bactériophages sont des virus spécifiques de bactéries. La phagothérapie consiste à utiliser des bactériophages afin de traiter certaines infections bactériennes. Elle a été découverte par Félix d'Hérelle en 1917, bien avant la découverte de la pénicilline en 1928²³.

Les phages se divisent en deux catégories : lytiques ou virulents et lysogéniques ou tempérés²⁴. Dans le cycle lytique, l'ADN de l'hôte (bactérie) est dégradé et diverses protéines sont produites, telles que la protéine de la capsid. De nouveaux bactériophages sont ensuite générés à l'intérieur de la cellule bactérienne en utilisant la machinerie synthétique de l'hôte. Environ 50 à 200 bactériophages sont produits, exerçant une pression sur la paroi cellulaire bactérienne pour provoquer sa rupture et libérer les phages. Cette interaction est décrite comme une relation maître-esclave. Dans le cycle de vie lysogénique, l'ADN du bactériophage s'intègre à l'ADN de l'hôte, où il est répliqué, restant ainsi sous forme d'entités cryptiques. L'ADN de bactériophage intégré est connu sous le nom de prophage. Les gènes lytiques sont également présents dans les bactériophages tempérés mais ne s'expriment pas pour des raisons inconnues. Ce type d'interaction est appelé relation hôte-invité²⁴.

Les bactériophages se révèlent être des agents très efficaces contre diverses infections bactériennes, notamment grâce à la production d'endolysines, des protéines qui contribuent à la dégradation de la couche de peptidoglycane dans la paroi cellulaire bactérienne. Initialement utilisées pour la pénétration dans l'hôte, ces endolysines agissent en rompant les liaisons entre les composants du peptidoglycane, altérant ainsi la structure de la paroi cellulaire. Ces enzymes, présentes naturellement dans les bactériophages, démontrent une efficacité contre tous types de bactéries²⁴.

Deux protocoles de phagothérapie sont utilisés en pratique clinique : soit par administration d'un cocktail de bactériophages, soit par l'utilisation d'un phagogramme (similaire à un test de sensibilité aux antibiotiques). L'avantage du mélange de phages est de cibler un spectre large de bactéries²³.

Seuls trois pays dont la Géorgie, la Pologne et la Russie utilisent la phagothérapie de manière régulière. L'approbation et la mise en œuvre dans d'autres pays sont encore en attente²⁵. Ceci est probablement dû aux :

- différences des propriétés biologiques entre les phages et les antibiotiques classiques.
- nombreux isolats de phages (cocktails) à utiliser, en raison de la grande spécificité des phages pour un traitement plus efficace²⁵.

2.3.4. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) ont été découverts pour la première fois en 1922 et sont des polypeptides constitués de 12–50 aminoacides endogènes, synthétisés par voie ribosomale. Les AMPs présentent un large spectre d'action et une stratégie de défense contre plusieurs types de bactéries, de champignons et de virus ²⁶. Ils ont diverses fonctions dont ²⁶ :

- L'activation des cellules immunitaires sur un site d'infection afin d'accélérer la guérison des plaies.
- Le contrôle des réponses immunitaires du système contre un micro-organisme particulier.

Le premier AMP mis au point a été le pexiganan, un analogue synthétique de la magainine 2 (obtenu à partir de la grenouille africaine, *Xenopus laevis*), qui a été administré sous forme de crème pour applications topiques, appelée Locilex™, dans le traitement des ulcères du pied chez les patients diabétiques. Cependant, il n'a pas été approuvé par la FDA en raison du manque d'efficacité dans les essais cliniques de phase II ²⁷.

Actuellement, parmi les AMP acceptés/approuvés par la FDA, nous citons ²⁸ ; la gramicidine D qui a été approuvée par la FDA en 1955 en tant que composant de Neosporin®, une pommade antibiotique triple destinée à traiter la conjonctivite bactérienne. La colistine, connue aussi sous le nom de polymyxine E, a été approuvée par la FDA en 1962 et est active contre plusieurs bactéries Gram-négatives, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter spp.* ²⁸. Elle est administrée par voie parentérale sous la forme de méthanesulfonate de colistine, une prodrogue indiquée dans le traitement de la septicémie dans la mucoviscidose, des infections cutanées, urinaires et respiratoires causées par *Pseudomonas aeruginosa* ²⁹. Ainsi, la daptomycine, approuvée en 2003, est un lipopeptide anionique (un peptide associé à une structure lipidique, ce qui lui confère une activité thérapeutique contre les bactéries et les champignons) produit naturellement par *Streptomyces roseosporus*. Il est utilisé pour traiter les infections de la peau et des muqueuses causées exclusivement par des bactéries à Gram positives ³⁰.

Les AMPs peuvent être associés à des antibiotiques, agissant comme une antibiothérapie combinée. Cette synergie est due au fait que ce groupe thérapeutique innovant provoque une perturbation de la membrane cellulaire bactérienne, augmentant ainsi sa perméabilité aux antibiotiques et facilitant leur pénétration dans le cytoplasme bactérien ³¹.

2.3.5. Autres perspectives

- **ARN interférents**

Une autre stratégie consiste à utiliser de courts fragments d'ARN synthétiques, appelés ARN interférents (ARNi). Le principe est de trouver certains sites dans l'ADN d'une bactérie qui contrôlent la synthèse des protéines responsables de la résistance aux antibiotiques, comme les gènes qui codent pour les bêta-lactamases par exemple ³².

- **Anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux sont des molécules ayant une grande spécificité pour leur cible. Ils représentent des outils indispensables dans la recherche, le diagnostic et la thérapie. Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans diverses applications telles que la cytométrie en flux, les dosages immunologiques ou les approches thérapeutiques ³³. Les traitements par des anticorps monoclonaux sont bien établis dans le domaine de l'oncologie et pour la prise en charge des maladies auto-immunes. A présent, aucun anticorps monoclonal n'a été décrit dans la thérapie bactérienne. Pourtant, les anticorps peuvent présenter une sélectivité élevée pour différentes cibles bactériennes, telles que les toxines ou les facteurs de virulence ³⁴. Par exemple, le bezlotoxumab est un anticorps monoclonal présentant une affinité élevée pour la toxine B de *Clostridioides difficile* et est le principal agent étiologique de la diarrhée nosocomiale chez les patients sous antibiothérapie³⁴.

Plus récemment, des anticorps chimiques, partageant les mêmes critères en termes d'affinité et de spécificité que les anticorps mais avec des avantages, ont été décrits sous l'appellation d'aptamères. Ils pourraient être utilisés comme nano-vecteur d'une molécule thérapeutique. Ceci est détaillé au chapitre 3 du manuscrit.

- **Nanoparticules de métal**

Des recherches récentes ont démontré des propriétés antibactériennes des constituants des nanoparticules comme l'argent (Ar), l'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde de cuivre (CuO) et l'oxyde ferrique (Fe₂O₃), contre les bactéries à Gram positif comme *S. aureus* et *Bacillus subtilis* et contre les bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* et *E. coli* ^{35,36}. Une autre étude récente a démontré que la résistance aux antibiotiques de type fluoroquinolone peut être combattue en réduisant la perméabilité de la membrane et en augmentant l'efflux lorsque des nanoparticules contenant de la fluoroquinolone sont utilisées. Cette étude a montré que les nanoparticules à base d'ofloxacin (une fluoroquinolone) présentent une efficacité antibactérienne supérieure contre plusieurs souches bactériennes dont *E. coli*, *S.*

aureus, *Pseudomonas vulgaris*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, par rapport à l'ofloxacine seule³⁶.

- **Liposomes**

Il s'agit de nanoparticules, constituées de bicouches lipidiques concentriques simples ou multiples fabriquées principalement à partir de phospholipides et de cholestérol encapsulant un environnement aqueux. De nouvelles formes galéniques d'antibiotiques ont été mises au point, sous forme de liposomes³⁷. Aujourd'hui, plusieurs nano-antibiotiques sont approuvés cliniquement pour un usage humain. Par exemple, AX-Tobra™ est une tobramycine sous forme de liposome, inhalable et basée sur la technologie des Fluidosomes®. Elle est indiquée pour le traitement des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* des patients atteints de mucoviscidose et est commercialisée par Axentis Pharma (Zurich, Suisse)³⁸.

Ainsi, de nouvelles solutions commencent à émerger pour lutter contre ce défi de la résistance aux antibiotiques. Cependant, quelle que soit la solution trouvée, il devient également évident que les bactéries sauront comment y résister. C'est la raison pour laquelle il est important d'alimenter continuellement un réservoir de solutions potentielles. Les pharmacopées anciennes pourraient être une piste pour alimenter ce réservoir ; piste que j'ai appréhendé durant mon doctorat.

CHAPITRE 2

Introduction des sciences Médico-pharmaceutiques Arabo-musulmanes

Chapitre 2 : Introduction des sciences Médico-pharmaceutiques, arabo-musulmanes

« On ne connaît pas complètement une science tant qu'on n'en sait pas l'histoire ». **Auguste Comte** (1798-1857)

1. Thérapies naturelles à base de plantes

Les composés naturels (dérivés d'insectes, d'animaux, de plantes ou de minéraux, par exemple) ont été utilisés pour guérir et prévenir diverses maladies infectieuses, depuis des millénaires. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 65 % de la population mondiale continue de s'appuyer sur des systèmes à base de plantes pour ses soins de santé ³⁹.

Depuis l'Antiquité, les plantes ont pris une grande importance et ont été considérées comme ayant un fort potentiel médical, que ce soit dans l'alimentation ou dans les usages médicaux afin de combattre certaines maladies infectieuses. L'étude des activités liées aux plantes remonte à des centaines d'années, depuis la Mésopotamie, qui décrit plus de 1000 plantes et leurs produits dérivés, comme les espèces Cedrus ou Commiphora, jusqu'au papyrus égyptien Ebers, qui à son tour comprend plus de 700 plantes, comme les espèces d'Aloe et surtout l'*Aloe vera*, en passant par les Grecs et les Romains. La médecine greco-romaine est d'ailleurs considérée comme la base de la médecine arabo-islamique. Plusieurs produits naturels ont été identifiés, avec un focus sur la médecine basée sur les plantes ⁴⁰. Ensuite, les savants arabo-islamiques comme Ibn Sina, Al Rhazi, Ibn Al Baytar et bien d'autres, ont introduit de nombreuses nouvelles idées et ont actualisé les connaissances sur les plantes et leur efficacité pharmacologique potentielle. Chacun de ces savants a détaillé un chapitre d'ethnopharmacologie comprenant plusieurs remèdes ou drogues à base de plantes. Les avancées permises au cours de cette période, considérée comme un Age d'Or pour la médecine antique, ainsi que la rationalité de la démarche scientifique et les perspectives que peuvent offrir l'étude de cette période sont détaillées dans une revue que je présente dans la première partie des résultats.

Le tableau 2 ci-dessous présente quelques-unes des plantes utilisées à l'époque médiévale arabe, leurs principales utilisations quotidiennes ou médicales et leurs activités thérapeutiques. Il est important de noter que certaines de ces plantes sont encore utilisées de nos jours dans les systèmes de médecine traditionnelle pour les soins de santé ⁴¹⁻⁴⁴.

Les herboristes arabes ont mis au point plusieurs méthodes pour préparer différentes formes de drogues. Ils utilisaient généralement soit la plante entière, soit une partie de celle-ci, comme les

feuilles, les fleurs, les graines ou les racines. Les drogues pouvaient être prises sous forme d'extraits de plantes, en particulier d'extraits alcooliques, de tisanes, de sirops, de pommades et de baumes, de pilules ou de comprimés. Ainsi, pour chaque forme recherchée, une méthode de préparation spécifique est appliquée afin d'obtenir les constituants bénéfiques de la plante utilisée. Les drogues, une fois préparées, peuvent être utilisées pour une administration orale ou pour des usages externes. Le tableau 3 ci-dessous présente les différentes techniques de préparation de remèdes à base de plantes ⁴¹.

2. Thérapies naturelles à base de métaux

Les métaux ont été largement utilisés dans de nombreuses pharmacopées depuis l'antiquité ⁴⁵. Les thérapies comprenant des métaux ont été utilisées par les Égyptiens, les Romains, les Grecs et les praticiens arabes afin de fabriquer des récipients, de purifier l'eau et les aliments pour guérir certaines maladies. Les métaux et les minéraux sont des composants importants des produits naturels ; par exemple, Hippocrate a nommé 9 minéraux et 6 métaux, qui représentent environ 6% de toutes les substances utilisées ⁴⁵.

Les différents métaux utilisés depuis l'antiquité dans différentes cultures à travers le monde peuvent être divisés en deux catégories. Certains exercent des fonctions vitales pour les cellules comme le fer (Fe), le cuivre (Cu) ou le zinc (Zn), mais qui, à des concentrations élevées, peuvent devenir toxiques. Et, d'autres sont toxiques même à faible concentration comme l'argent (Ag), l'or (Au) ou le mercure (Hg) ⁴⁶.

Le tableau 4 ci-dessous présente les médicaments à base de métaux, utilisés à l'époque médiévale arabe pour le traitement de diverses maladies, et leurs activités thérapeutiques.

Tableau 2 : Description de quelques plantes utilisées à l'époque médiévale arabe et leurs effets thérapeutiques.

Plante	Nom habituel	Partie de la plante utilisée	Principales utilisations dans l'âge médiéval arabe	Principales activités biologiques évoquées dans la littérature
<i>Allium cepa</i> (<i>Alliaceae</i>)	Oignon	Feuilles ou jus	Les maladies des yeux et de la peau, le diabète, et les maladies du foie, les troubles urinaires, les maladies cardiovasculaires, et la prévention du cancer (cancer du côlon) ⁴⁷ . Selon Avicenne, un collyre de graines en poudre avec du miel est utile pour l'opacité de la cornée et est également utilisé pour traiter la rétention urinaire ⁴⁸ .	Activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antidiabétiques et antimicrobiennes, dues à de nombreux composés comme les acides phénoliques, les flavonoïdes (quercétine et ses conjugués), les anthocyanes (cyanidine et péonine), les thiosulfates, les saponines ⁴⁹ .
<i>Allium sativum</i> (<i>Alliaceae</i>)	Ail	Bulbe	Troubles intestinaux, toux et rétention urinaire. Avicenne recommandait l'utilisation de l'ail contre les maladies infectieuses ⁵⁰ .	Effets anticancéreux, antimicrobiens, antifongiques, antiprotozoaires et anti-inflammatoires. Il contient 33 composés de soufre tels que l'allicine, qui est le principal constituant de l'ail, 17 acides aminés et des minéraux tels que le sélénium ^{51,52} .
<i>Aloe sp.</i> (<i>Alliaceae</i>)	Aloe	Feuilles ou gel	Maladies des yeux et de la peau.	Des activités antimicrobiennes, antioxydantes, antivirales, antiseptiques, antitumorales et anti-inflammatoires. Certains exemples de composés bioactifs de l' <i>Aloe sp.</i> sont l'aloïne, l'aloésine, l'aloénine, l'aloeresine, l'aloemodin et le chrysophanol ^{53,54} .
<i>Astragalus sarcocolla</i> (<i>Leguminosae</i>)	Sarcocolle	Résine	Maladies des yeux, aphrodisiaques (pour la faiblesse sexuelle)	Propriétés antirhumatismales, anthelminthiques, antimicrobiennes, apéritives et émoullientes ⁴⁹ . Seuls les composés phytochimiques responsables de l'activité antimicrobienne sont connus à ce jour, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les stéroïdes ⁵⁵ .

<i>Cannabis sativa</i> (<i>Cannabaceae</i>)	Cannabis	Feuilles, graines	Maladies des yeux, traitement de l'épilepsie, maux de tête sévères.	Propriétés diurétiques, antiémétiques, antiépileptiques, anti-inflammatoires, antidouleur et antipyrétiques. Le composé principal est le tétrahydrocannabinol ^{43,56} .
<i>Commiphora myrrha</i> (<i>Burseraceae</i>)	Myrrhe	Résine	Maux d'estomac et du foie. Traitement du rhume et de la toux. Dans les cosmétiques ; pour les parfums ou les soins de la peau.	Effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens et antiprolifératifs ⁵⁷ . Parmi ses principaux métabolites, on trouve des terpénoïdes, des stéroïdes, des flavonoïdes, des lignanes, des glucides et des alcools aliphatiques à longue chaîne ⁵⁸ .
<i>Coriandrum sativum</i> (<i>Apiaceae</i>)	Coriandre	Toute la plante	Maladies des yeux, des maux de tête. Aphrodisiaque.	Antioxydant, diurétique, antidiabétique, sédatif, antimicrobien, anticonvulsivant, hypnotique, anthelminthique, et anti-mutagène. La plante a montré une riche composition en flavonoïdes comme la présence d'apigénine, de lutéoline, d'hespéridine, d'hyperoside, de diosmine, de vicénine, et de certains acides aminés comme l'asparagine, la glutamine et l'arginine ⁵⁹ .
<i>Crocus sativus</i> (<i>Iridaceae</i>)	Safran	Stigmate floral	Maladies des yeux et de la peau, estomac, foie, maux de tête. Utilisation cosmétique.	Cicatrisation des plaies, antvieillessement, antioxydant, antidépresseur, anticancéreux, antispasmodique et anti-inflammatoire. La crocine, la crocétine et le safranal sont les principaux constituants bioactifs du safran ⁶⁰ .
<i>Curcuma longa</i> (<i>Zingiberaceae</i>)	Curcuma	Rhizome	Maladies des yeux et de la peau, difficultés menstruelles et traitement des hémorroïdes.	Anti-diabétique, anti-inflammatoire, anti- diarrhéique, hépato-protecteur et neuroprotecteur, antiasthmatique, et anticancer ⁶¹ . La curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine sont les principaux composés actifs ⁶² .

<i>Lawsonia inermis</i> (<i>Lythraceae</i>)	Henne	Feuilles	Maladies de la peau, problèmes dentaires et utilisation cosmétique. Ibn Baytar a dit que dans le cas de la variole, mettre du henné sur les pieds de l'enfant peut empêcher la propagation de la maladie aux yeux ⁶³ .	Effets antioxydants, antimicrobiens, antiparasitaires, anti-inflammatoires et immunomodulateurs. La plante est riche de nombreux métabolites différents, dans les feuilles ou la plante entière. Cela inclut les xanthones, les flavonoïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les naphthoquinones ^{64,65} .
<i>Lens culinaris</i> (<i>Fabaceae</i>)	Lentilles	Graines	Maladies des yeux et de la peau, maux de tête.	Antioxydant, antifongique, antibactérien, anticancéreux, antidiabétique et anti-sciatique. Les lectines extraites des graines de lentilles ont montré un effet bactériostatique contre <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> ^{66,67} . En outre, les lentilles contiennent des nutriments et des micronutriments essentiels comme le fer, le zinc et d'autres éléments ⁶⁸ .
<i>Musa paradisiaca</i> (<i>Musaceae</i>)	Banane	Fruits, feuilles	Maladies du foie et de la rate.	Les extraits éthanoliques des feuilles ont exercé des activités antioxydantes, anticancéreuses, antiulcéreuses, antidiabétiques et antimicrobiennes contre <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> ^{69,70} . L'analyse phytochimique a montré la présence de nombreux composés bioactifs tels que des alcaloïdes, des tanins, des terpénoïdes, des glycosides, des flavonoïdes, des saponines et des phénols ⁷¹ .
<i>Olea europaea</i> (<i>Oleaceae</i>)	Olive	Fruit, huile et feuilles	Maladies des yeux et de la peau, contre les vomissements et le gonflement.	Effets antiprolifératifs sur les cellules leucémiques, activités antimicrobiennes. Les feuilles d'olivier ont montré une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du sein humain, effets antiviraux (VIH), activités antifongiques et gastroprotectives. Les

				principaux composés présents dans les feuilles d'olivier sont les oleuropéosides, les flavones, les flavanols et les phénols ⁷² .
<i>Papaver somniferum</i> (<i>Papaveraceae</i>)	Opium	Latex, graines et huile	Douleurs, fièvre, troubles du sommeil.	Activités antioxydantes, antimicrobiennes, antimutagènes et anticancéreuses ⁷³ , mais il doit être utilisé avec beaucoup de précautions car il peut induire des effets toxiques allant jusqu'à la mort ⁷⁴ . Il contient des alcaloïdes et de nombreux autres constituants tels que des sucres, des sulfates ou des acides organiques, mais l'opium se compose principalement d'alcaloïdes de type protopine et hydrocotarnine ⁷³ .
<i>Phoenix dactylifera</i> (<i>Arecaceae</i>)	Datte	Fruit	Soins de la peau. Aphrodisiaque. Troubles nerveux et instabilité de la mémoire.	Riche en substances phytochimiques comme les phénols, les stérols, les caroténoïdes, les anthocyanes, les procyanidines et les flavonoïdes qui peuvent exercer de nombreux effets bénéfiques tels que des activités antioxydantes, antivirales, antifongiques, anti-inflammatoires et anticancéreuses ⁷⁵ .
<i>Punica granatum</i> (<i>punicacees</i>)	Grenade	Fruit, graine, fleur	Maladies pulmonaires, problèmes hépatiques, rhumes et toux, fièvre. Mémoire accrue.	Propriétés antimicrobiennes, antidiarrhéiques, antioxydantes, anti-péroxydation lipidique, anti-inflammatoires et anticancéreuses. La plante contient une variété de métabolites tels que des sucres, des acides organiques, des polyphénols, des flavonoïdes, des vitamines, des acides gras polyinsaturés et des acides gras essentiels ⁷⁶ .

<i>Vitis vinifera</i> (<i>Vitaceae</i>)	Raisins	Fruit, vin	Maladies des yeux, dans le cas des diarrhées. Aphrodisiaque. Morsures de serpent.	Activités antioxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes et anti-inflammatoires, par la présence de nombreux actifs dont des flavonoïdes, des polyphénols, des anthocyanines et des dérivés de stilbène récemment découverts ⁷⁷ .
<i>Zingiber officinale</i> (<i>Zingiberaceae</i>)	Gingembre	Rhizome	Nausées, froid, maux de tête, arthrite et maux d'estomac.	Les composés phénoliques (gingérols, shogaols, quercétine...) et terpéniques (α -curcumène, zingiberène...) sont responsables de plusieurs propriétés telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, anticancéreuses et neuroprotectrices ⁷⁸ .

Tableau 3 : Les différentes formes et méthodes utilisées pour préparer les médicaments à base de plantes ⁴⁰.

Formes de drogues utilisées	Méthodes de préparation	Mode d'administration
<i>Plante entière</i>	Forme séchée sous forme de poudre, de jus frais ou de feuilles fraîches	Orale
<i>Tisanes</i>	Extraits de plantes à l'eau chaude, comme la camomille, la sauge, etc...	Orale
<i>Macérats</i>	Les plantes sont hachées, ajoutées à de l'eau froide, puis laissées au repos pendant 7 à 12 heures.	Orale
<i>Sirops</i>	Un mélange de 65 parts de sucre et 35 parts d'eau est réalisé avec les plantes, puis passé à ébullition et macéré pendant 3 semaines.	Orale
<i>Inhalation</i>	La plante est bouillie puis inhalée. On l'utilise pour combattre l'infection des sinus ou la toux, ou pour nettoyer la peau en profondeur.	Nasale
<i>Extraits</i>	Les extraits liquides sont obtenus en utilisant une distillation sous vide combinant l'eau et l'alcool. Les extraits secs sont le résultat de l'évaporation d'une matière végétale en une masse sèche. Ils peuvent ensuite être condensés en capsules ou en comprimés.	Orale
<i>Huiles essentielles</i>	Elles sont obtenues par distillation à la vapeur ou par hydrodistillation et généralement diluées dans des huiles pour ne pas nuire à la peau, comme l'huile d'olive ou une autre huile de qualité alimentaire qui peut être utilisée sans danger.	Usage externe/local
<i>Baumes, crèmes et lotions</i>	Les herbes sont trempées dans l'huile pendant une longue période (des semaines à des mois), afin de favoriser l'extraction de certains ingrédients dans l'huile. L'huile peut être transformée en lotions, crèmes ou baumes et peut ensuite être utilisée localement.	Usage externe/local
<i>Cataplasmes et compresses</i>	Des parties des plantes sont écrasées et mélangées à de l'eau chaude pour former une pâte ou un emplâtre médicamenteux. Le mélange obtenu est appliqué sur les plaies, les brûlures, les piqûres d'insectes et d'animaux, les éruptions cutanées ou les irritations dermatologiques.	Usage externe/local

Tableau 4 : Médicaments à base de métaux utilisés à l'époque médiévale arabe

Métal / Minéral	Nom	Symbole chimique	Principales utilisations dans l'âge médiéval arabe	Activités thérapeutiques évoquées dans la littérature
Argent	Argent et ses résidus	Ag	Plaies et maladies de la peau	Effets anti-inflammatoires, antibactériens et antiviraux. Il est important de noter que des études montrent que les ions Ag peuvent être capables de tuer des bactéries résistantes aux antibiotiques, ce qui indique le potentiel des métaux en tant que nouveaux médicaments ⁷⁹ .
Arsenic	Arsenic, sulfure rouge d'arsenic ou sulfure jaune d'arsenic	As ₄ S ₄ As ₂ S ₃	Maux d'estomac, troubles du sommeil, cosmétiques	Une étude montre que certains composés de l'arsenic étaient utilisés comme anticancéreux, notamment dans le traitement de la leucémie aigüe ⁸⁰ , mais ses utilisations restent limitées ou inconnues en raison de ses effets nocifs et toxiques.
Bismuth	Bismuth	Bi	Diarrhée, ulcère gastrique	Médicaments antitumoraux obtenus à partir de sels de bismuth, activité antibactérienne et antifongique des composés de bismuth ou du complexe bismuth-antibiotique ⁸¹ .
Cuivre	Sulfate de cuivre (appelé vitriol bleu à l'époque médiévale), acétate de cuivre (vert-de-gris ou vitriol vert), oxyde de cuivre.	CuSO ₄ Cu(CO ₂ CH ₃) ₂ ou FeSO ₄ Cu ₂ O	Maladies des yeux, blessures des oreilles et de la peau, et cosmétiques	Agents antipaludéens, antifongiques et antibactériens. Récemment, le cuivre est utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer en raison de son action neuroprotectrice, et comme médicament potentiel pour combattre la maladie de Parkinson ⁷⁹ . Les nanofilms de cuivre sont efficaces pour prévenir certaines infections nosocomiales ⁸² .
Fer	Hématite	Fe ₂ O ₃	Maladies des yeux et les soins dentaires.	Le fer est l'un des éléments les plus importants pour de nombreux processus biologiques des cellules, comme l'apport d'oxygène aux organes, la production d'énergie et le renforcement de l'immunité. Les vitamines ferriques orales sont et restent recommandées pour les personnes présentant une carence en fer ⁸³ .
Mercur	Sulfure de mercure (cinabre), ou certains de ses minéraux extraits par le feu	Hg	Maladies de la peau, syphilis.	Les composés organiques du mercure sont utilisés pour conserver la fraîcheur des gouttes ophtalmiques. Le mercure était employé comme désinfectant et pour traiter la syphilis. Dans la restauration dentaire, on utilisait une combinaison de mercure, de cuivre et d'argent ⁸⁴ .

Or	Or ou résidus d'or	Au	Maladies des yeux, notamment la cataracte, plaies de la peau, utile pour moduler les battements cardiaques dans certains cas, et utilisation cosmétique.	Effets anti-inflammatoires des nanoparticules d'or, dans le traitement de la leishmaniose, de la malaria et de la tuberculose ⁷⁹ . Une étude montre que les complexes d'Au (III) pourraient inhiber la réplication du VIH ⁸⁵ .
Plomb	Plomb, litharge (plomb rouge), carbonate de plomb (céruse), sulfure de plomb (khôl)	Pb PbO (PbCO ₃) ₂ ·Pb (OH) ₂ PbS	Maladies des yeux et de la peau, bénéfique pour les morsures de certains animaux.	Sa toxicité n'a jamais été un mystère puisqu'elle a été utilisée pendant des siècles en administration topique à de faibles concentrations.
Soufre	Soufre	S	Blessures et maladies de la peau, morsures d'animaux, maladies mentales.	Le soufre est un constituant chimique courant dans le corps humain, avec le calcium et d'autres éléments. On peut le trouver dans des aliments tels que l'ail ou les oignons qui présentent des effets thérapeutiques bénéfiques décrits dans le tableau 2.
Zinc	Oxyde de zinc	ZnO	Maladies des yeux et de la peau.	Le zinc est un élément essentiel à la croissance et au développement des cellules. Le ZnO présente une activité antibactérienne et antifongique, antioxydante et anti-inflammatoire ^{86,87} .

Les plantes, les insectes, les animaux, les minéraux et plusieurs produits naturels constituent une source exceptionnelle de molécules bioactives depuis l'antiquité. Ils ont suscité une attention considérable et continuent de fournir à l'humanité de nouvelles sources de médicaments. Avec le développement des techniques moléculaires, il est possible aujourd'hui de déterminer et identifier les différents composants responsables d'une activité biologique d'une plante ou d'une composition issue des traitements anciens. Pour diminuer les effets secondaires de ces différents éléments, il serait nécessaire de les diriger vers un foyer bactérien. Pendant mon doctorat, j'ai évalué le potentiel des aptamères en tant que molécules de ciblage des bactéries.

CHAPITRE 3

Stratégie de ciblage à base d'aptamères

Chapitre 3 : Stratégie de ciblage à base d'aptamères

1. Généralités

L'objet de ce chapitre est de présenter une stratégie de ciblage à base d'aptamère à acides nucléiques, basée sur la reconnaissance aptamère-cible.

En raison de leur grande spécificité et de leur facilité de synthèse, les aptamères sont de plus en plus utilisés dans une variété d'applications et sont un outil prometteur dans les domaines de recherche. Par exemple, les aptamères peuvent être utilisés comme agents de diagnostic pour détecter la présence de molécules cibles dans les échantillons biologiques tels que le sang ou l'urine. Ils peuvent également être utilisés comme agents thérapeutiques soit car ils ont une action directe sur leurs cibles et activent/répriment des cascades de réaction, soit pour délivrer des molécules (drogues), spécifiquement aux cellules cancéreuses, virus ou bactéries qu'ils ciblent. En raison de leur grande spécificité et de leur facilité de manipulation, les aptamères offrent de nombreuses possibilités pour la recherche médicale et la biotechnologie ⁸⁸.

Les acides nucléiques sont un élément essentiel à la cellule, avec les glucides, les lipides et les protéines. L'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique) sont des molécules présentes dans toutes les cellules des êtres vivants pour lesquelles des groupes fonctionnels nucléotidiques sont greffés sur un squelette polymère pentose-phosphate. La structure de l'ADN comporte quatre nucléotides distincts : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). La thymine (T) est remplacée par l'uracile (U) dans la molécule d'ARN (figure 6) ⁸⁹.

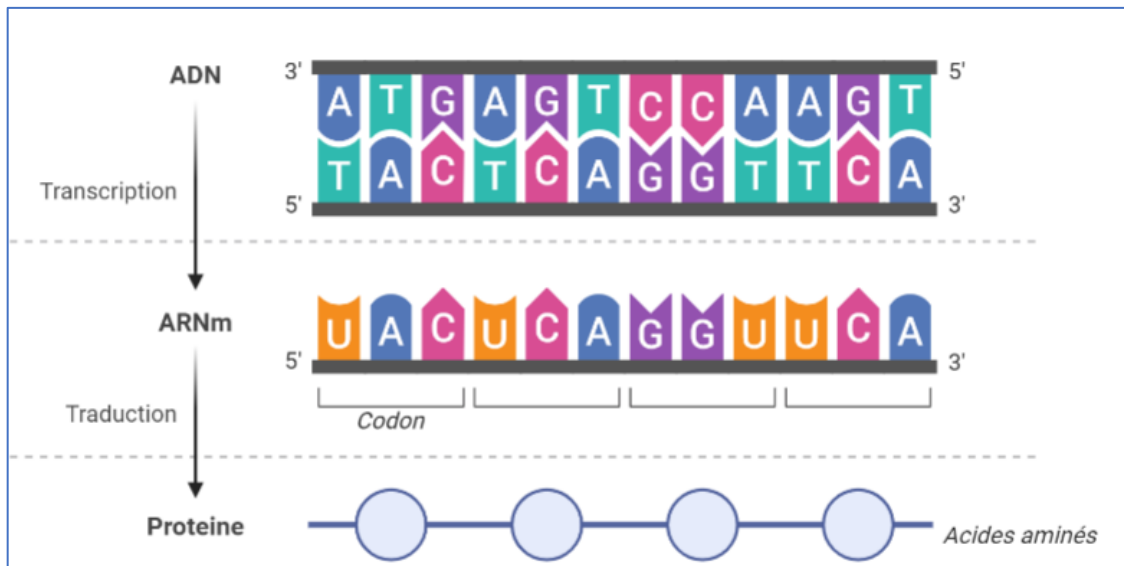


Figure 6 : Schéma illustrant le processus de la transcription de l'ADN double brin en ARNm simple brin. La synthèse protéique se fait par la traduction de l'ARNm en acides aminés, qui par enchainement produisent une protéine.

Ces macromolécules ont différentes fonctions physiologiques :

- Elles sont porteuses du patrimoine génétique et sont principalement responsables de la production des protéines intervenant dans le fonctionnement d'une cellule. La figure 6 présente schématiquement le processus de transcription de l'ADN en ARN messenger, puis la traduction en protéines. La synthèse protéique débute par la transcription d'une section fonctionnelle de l'ADN (un gène) en ARNm, par l'action de l'enzyme ARN polymérase. Cet ARNm est dit codant car il contient des parties qui vont coder des protéines. Les ARN non codants comme l'ARN de transfert (ARNt), l'ARN ribosomique (ARNr), les petits ARN interférent (ARNsi) n'ont pas de mission à coder des protéines mais assurent d'autres fonctions. Les ARNt assurent l'association d'un codon de trois nucléotides à un acide aminé déterminé par le code génétique. Les ARNr sont des ARN formant les ribosomes. Les micro-ARN et les ARNsi jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Le ribosome, qui comprend une centaine de protéines, est impliqué dans le mécanisme de transcription de l'ARNm en protéines ⁹⁰.
- Ces éléments régulateurs ont servi de bases conceptuelles pour le développement d'ARN synthétiques, comme sondes d'affinité ou éléments de reconnaissance moléculaire, dans un certain nombre d'applications à visée diagnostique pour par exemple la détection spécifique d'un foyer bactérien, ou à visée thérapeutique comme la vectorisation de médicaments à action localisée. Les aptamères, que je décrirai ci-dessous, sont des acides nucléiques synthétiques.
- Les acides nucléiques peuvent être utilisés pour des applications thérapeutiques. Nous n'en citerons que quelques-unes. L'un des exemples sont les vaccins à ARNm, qui

utilisent généralement l'ARNm viral pour produire des protéines virales et permettre au système immunitaire de le combattre le virus ⁹¹. Les vaccins à base d'acides nucléiques présentent plusieurs avantages dont la stimulation de l'immunité à médiation cellulaire et humorale, la facilité de conception et production, ainsi que l'adaptabilité rapide aux souches pathogènes mutantes ⁹². Plusieurs vaccins à ARNm sont déjà développés, notamment de la Covid-19 comme ceux de *Pfizer* et *Moderna*, et d'autres qui sont en cours d'études contre diverses maladies, notamment le virus Zika, certains cancers... Parmi les médicaments qui ont été approuvés par la China Food and Drug Administration (CFDA), la gendicine a été mis sur le marché en 2003. Il s'agit d'un adénovirus exprimant le gène p53 (codant pour un suppresseur de tumeur), indiqué dans le traitement de cancers de la tête et du cou ⁹³.

2. Aptamères

2.1. Définition et caractéristiques

Les aptamères sont des oligonucléotides ARN ou ADN simple brin, de poids moléculaire compris entre 6 et 30 kDa ⁹⁴. Ils sont appelés également 'anticorps chimiques', puisque leur fonction est semblable à celle des anticorps en termes de reconnaissance et liaison de l'antigène et parce qu'ils peuvent/pourraient être utilisés comme les anticorps, en tant qu'agents pour le diagnostic, l'imagerie ou la thérapie. Les aptamères se lient à leur cible avec une grande affinité et spécificité. Cette affinité est déterminée par une constante de dissociation K_d qui correspond à la force d'interaction entre la molécule cible et l'aptamère. Elle est de l'ordre de nanomolaire (nM) au picomolaire (pM) ⁹⁵. Les aptamères peuvent être générés contre des cibles de natures diverses, telles que des petites molécules organiques (par exemple des molécules thérapeutiques comme des antibiotiques tels que les tétracyclines), des peptides, des protéines, des acides nucléiques, ou des enzymes ⁹⁶. Les aptamères peuvent également cibler des macromolécules, ou même des bactéries, des virus et des tissus humains tumoraux... ⁹⁵. La chaîne simple brin d'un aptamère est repliée en une structure 3D. La structure repose sur une variété d'appariement de bases et de leur empilement dans un micro-environnement spécifique (figure 7) ⁹⁷. Elle est hiérarchisée en structure primaire simple brin correspondant à la séquence d'aptamère, qui par des repliements intramoléculaires résultent en structures secondaires et tertiaires.

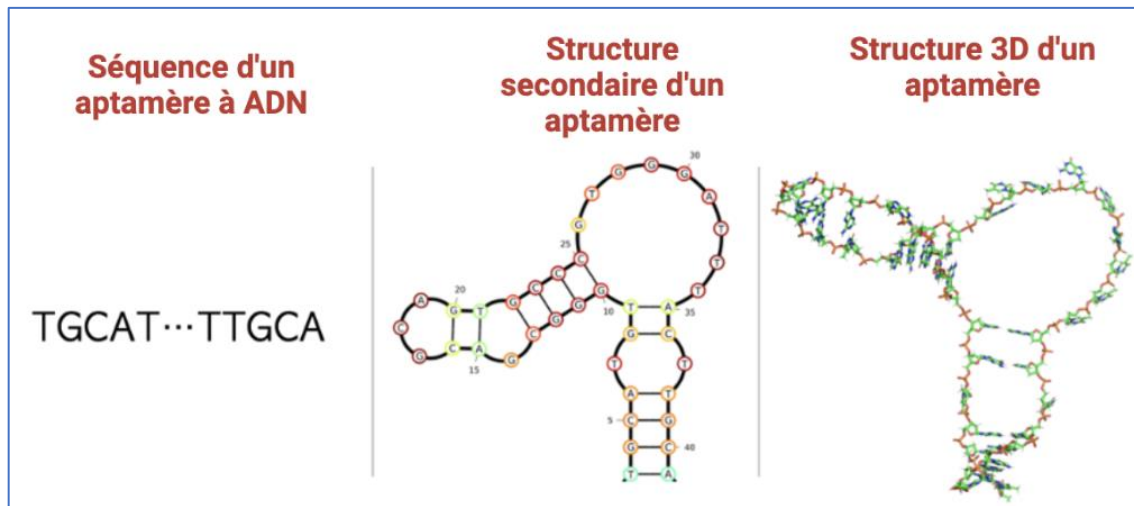


Figure 7 : Illustration schématique des différentes structures d'aptamères ⁹⁷. (Adapté de Kilgour et al 2022).

Les aptamères sont peu connus et beaucoup moins utilisés que les anticorps, mais ils sont considérés comme des outils intéressants, alternatifs aux anticorps, parce qu'ils présentent plusieurs avantages (tableau 5). Les aptamères sont synthétisés chimiquement. Leur synthèse est donc plus rapide et moins onéreuse que la production d'anticorps. D'autre part, cette synthèse ne nécessite pas d'animaux. Les aptamères semblent peu immunogènes, et non toxiques. Leur taille, plus petite que celle des anticorps, leur permet de pénétrer plus profondément dans les tissus ⁹⁸. Ils sont stables même à des températures élevées, et peuvent retrouver leur structure après dénaturation thermique, ce qui facilite leur mode de conservation et transport.

Tableau 5 : Comparaison de différentes propriétés entre les aptamères et les anticorps.

Critère	Aptamères	Anticorps
Composition	Nucléotides	Acides aminés
Poids moléculaire	6-30 kDa	150 kDa
Affinité	Kd, en nano/pico molaire.	Kd, en nano/pico molaire.
Cibles possibles	N'importe quelle cible : ions, peptides, protéines, toxines, virus, bactéries, organes, molécules organiques et inorganiques...	Cibles limitées aux molécules immunogènes et non toxiques.
Mode de synthèse	<i>In vitro</i> via la méthode SELEX. 2 – 8 semaines.	<i>In vivo</i> , via un système biologique. 6 mois ou plus.
Stabilité	Stables avec une longue durée de conservation. Résistants aux températures élevées (jusqu'à 95°C).	Moins stables, avec une durée de conservation limitée.
Immunogénicité	Faible immunogénicité	Immunogènes

2.2. Technique de SELEX

Les aptamères sont isolés par une technique combinatoire d'évolution *in vitro*, appelée SELEX (Evolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel), décrite pour la première fois en 1990⁹⁹ et dont le principe est décrit ci-dessous

Le processus du SELEX consiste à réaliser plusieurs cycles (n cycles) successifs de sélection contre une cible d'intérêt et d'amplification, jusqu'à l'identification de molécules nommées aptamères ayant les propriétés requises de liaison à la cible. Le schéma représenté en figure 8 est un exemple du processus de SELEX permettant d'identifier des aptamères ciblant des bactéries. La méthode se résume en 4 étapes ; (1) la préparation de la banque d'oligonucléotides et l'incubation avec la cible, (2) la sélection des séquences liées, (3) l'éluion des séquences liées et l'élimination des séquences non liées et enfin (4) l'amplification des séquences reconnaissant la cible, qui seront l'objet d'un produit de départ du cycle suivant¹⁰⁰.

(1) Le point de départ d'un processus SELEX est une banque aléatoire d'oligonucléotides (ADN simple brin ou ARN) synthétisée chimiquement, constituée d'environ 10^{13} à 10^{15} séquences différentes¹⁰⁰. Les oligonucléotides de la banque initiale sont constitués d'une région centrale de séquence et taille variable (comprise généralement entre 20 et 50 nucléotides), flanquée de deux séquences fixes. Ces dernières permettent de lier les amorces d'extrémités nécessaires à l'étape d'amplification.

(2) La sélection consiste à mettre en contact la cible avec la banque de séquences d'oligonucléotides ADN ou ARN ; on parle d'une sélection positive. Plusieurs techniques peuvent être utilisées dont la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse sur gel ou capillaire et l'utilisation de billes magnétiques pour lier la cible ⁸⁸.

(3) Une partie des séquences de la banque va se fixer sur la cible et l'autre partie non liée à la cible sera éliminée. Après avoir éliminé les séquences non liées, les oligonucléotides liés sont élués de la cible pour les étapes suivantes du processus. Les méthodes d'éluion des aptamères peuvent être des méthodes dénaturantes comme le traitement thermique ou l'ajout de substances détergentes, d'urée, de SDS ou d'EDTA ¹⁰⁰.

(4) A l'issue de ces étapes, l'étape d'amplification permet d'obtenir un grand nombre de copie des séquences liées à la cible, qui vont servir de produit de départ pour un prochain cycle, par la réaction en chaine par polymérase PCR, dans le cas d'une banque d'ADN simple brin, ou à la transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR) dans le cas d'une banque d'ARN. Une amorce sens (comprenant une extension à l'extrémité contenant la séquence du promoteur T7 pour la synthèse d'ARN) et une amorce anti-sens sont nécessaires pour convertir la banque d'ADN simple brin (ADNsb) en ADN double brin (ADNdb) par PCR. Les deux brins sont séparés pour obtenir une nouvelle banque d'ADN simple brin (ADNsb).. Dans le cas de sélection d'aptamères à ARN, l'étape de transcription suit une réaction par RT-PCR.

Une sélection négative (ou contre-sélection) est souvent réalisée soit juste avant ou après la sélection positive. Cette étape consiste généralement à exposer la banque d'oligonucléotides avec une molécule ou cellule différente de la cible d'intérêt en éliminant les oligonucléotides qui s'y lient, dans le but d'augmenter la spécificité de la banque à la cible d'intérêt.

Les séquences enrichies sont ensuite analysées par séquençage.

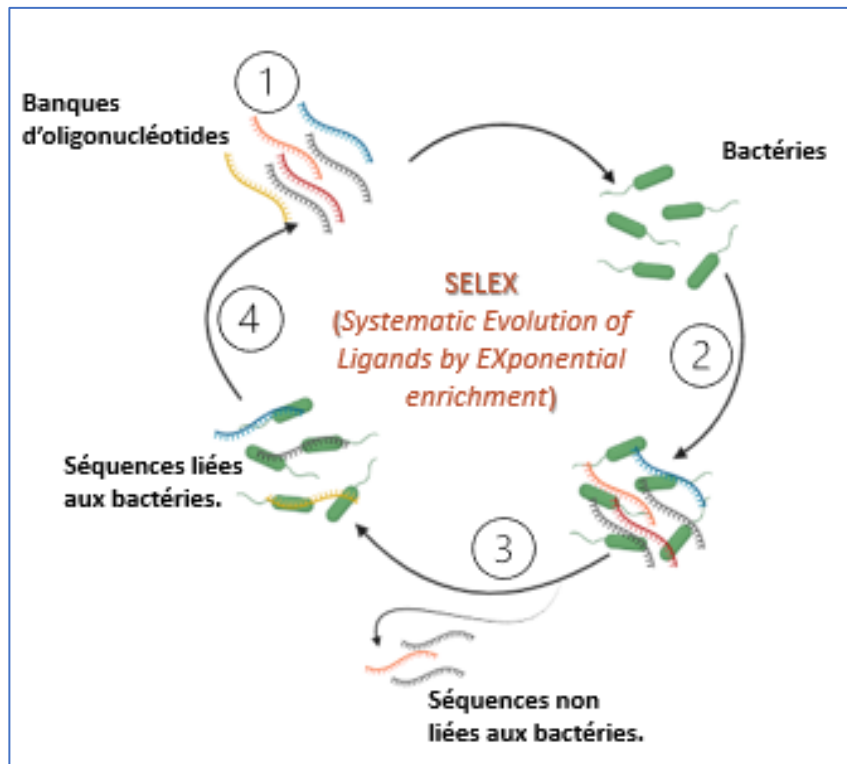


Figure 8 : Schéma illustrant le processus d'un SELEX d'aptamères ciblant des bactéries.

Le SELEX est une méthode de sélection d'aptamères. 1) Synthèse d'une banque d'oligonucléotides. 2) Étape de sélection qui consiste à incuber la banque avec les bactéries cibles. 3) Étape d'éluion qui consiste à éliminer les séquences non liées à la cible. 4) Étape d'amplification qui consiste à amplifier les séquences liées qui vont servir à un produit de départ pour un suivant cycle de SELEX.

Nous ne décrivons ci-dessous brièvement que les deux méthodes utilisées au sein du laboratoire de bio imagerie et pathologies (LBP, UMR 7021 – Université de Strasbourg). Ce sont les méthodes principales qui permettent l'identification d'aptamères ciblant des molécules de surface cellulaire.

2.2.1. Protein-SELEX

La technique protein-SELEX ou SELEX classique est une technique qui utilise des molécules (ici des protéines) entières ou tronquées comme cibles. Elles sont souvent exprimées sous forme de protéines recombinantes auxquelles sont attachées des étiquettes pour faciliter leur purification et/ou la sélection grâce à leur fixation sur des colonnes d'affinité. De nombreuses protéines subissent des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, méthylation, acétylation...) modifiant leur conformation. Cela pourrait être une explication au fait que certains aptamères sélectionnés par cette approche n'ont pas permis de détecter leur cible dans leur contexte cellulaire^{101–103}.

2.2.2. Cell-SELEX

Pour cibler un récepteur membranaire dans son environnement cellulaire ou pour cibler une cellule, des procédures SELEX plus complexes ont été conçues.

Les lignées de cellules cancéreuses sont l'une des cibles les plus étudiées pour le Cell-SELEX et plusieurs aptamères contre diverses cellules cancéreuses ont été identifiés jusqu'à présent ¹⁰⁴. Si la cible moléculaire n'est pas identifiée, un cell-SELEX peut être réalisé dans l'objectif d'identifier de nouveaux biomarqueurs tumoraux. Si une cible moléculaire, généralement un récepteur de surface cellulaire, est identifié, alors un cell-SELEX peut être réalisé sur des cellules sur-exprimant cette cible. La figure 9 représente trois schémas illustrant 3 types de cell-SELEX, établie par Mercier et al (2017) ¹⁰¹.

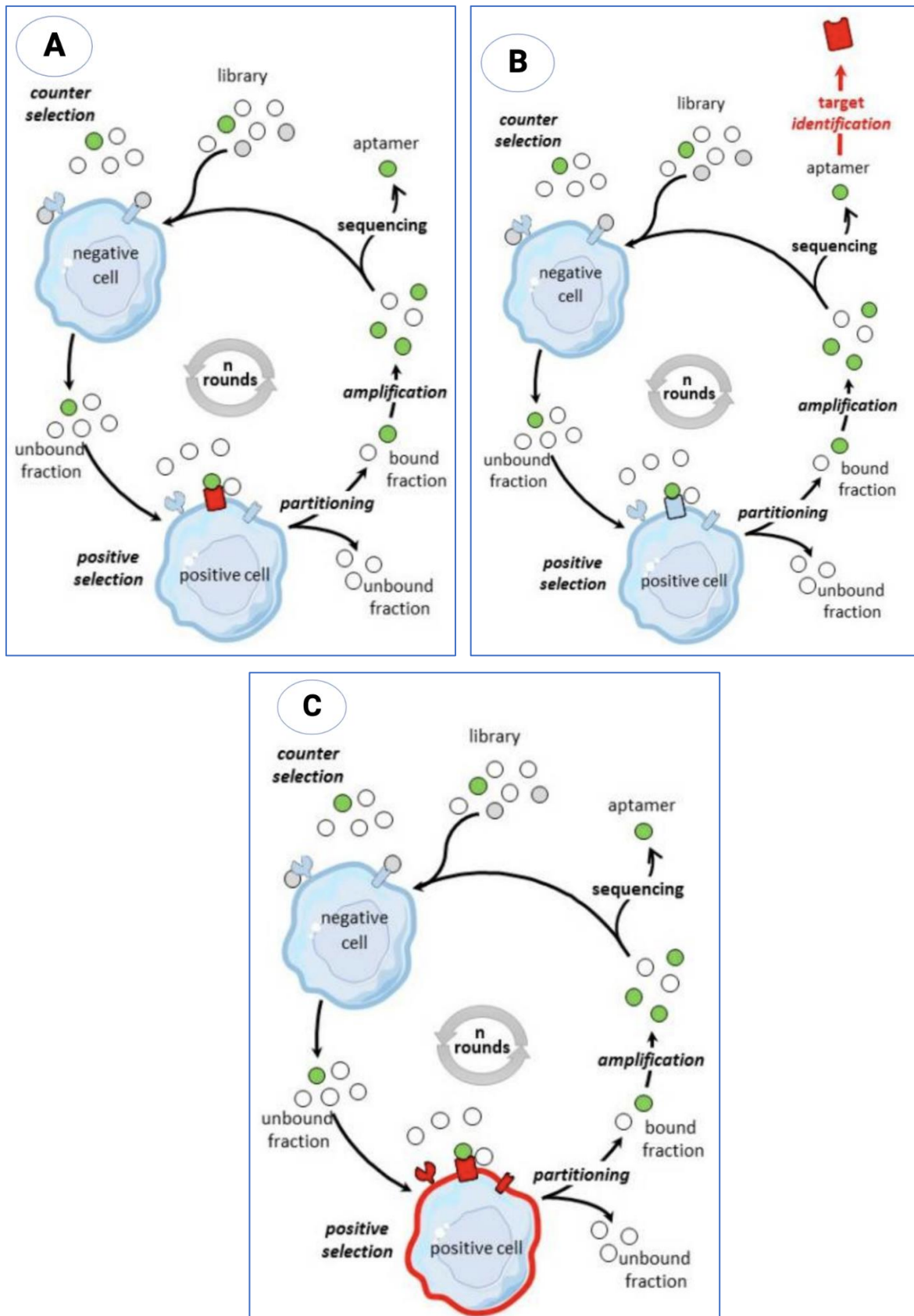


Figure 9 : Schémas illustrant le cell-SELEX. **A** : cell-SELEX sur un biomarqueur de surface de cellule tumorale pré-identifié, coloré en rouge. **B** : cell-SELEX sur un biomarqueur de surface de cellule tumorale post-identifié à la fin du processus SELEX, et coloré en rouge. **C** : cell-SELEX sur cellule tumorale pour laquelle aucun biomarqueur de surface cellulaire particulier n'est pré-identifié. Les aptamères sélectionnés seront spécifiques de la signature moléculaire de la cellule. La cellule entière est utilisée pour la sélection positive et est colorée en rouge ¹⁰¹ (Par Mercier et al 2017).

Les aptamères peuvent être utilisés en tant que sondes moléculaires, par exemple pour le diagnostic du cancer lorsqu'ils sont marqués avec des fluorophores (par exemple l'isothiocyanate de fluorescéine et les cyanines) et qu'ils reconnaissent des biomarqueurs tumoraux ¹⁰⁵.

En ce qui concerne les maladies infectieuses, plusieurs études ont montré l'identification d'aptamères spécifiques à des souches bactériennes, à des virus, à des champignons. Par exemple, Chen et al (2007) ont identifié l'aptamère NK2 qui se lie à la souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* avec une affinité de l'ordre du micromolaire avec : $K_{1d} = 5,4\mu\text{M}$, et $K_{2d} = 0,1\mu\text{M}$ ¹⁰⁶. Ces données déterminées par titrage calorimétrique isotherme (ITC) suggèrent qu'il existe deux sites de liaison à l'aptamère NK2 à la surface de la bactérie. Afin de déterminer la cible moléculaire de l'aptamère, Chen et al (2007) ont traité *M. tuberculosis H37Rv* avec des protéinases telles que la trypsine et la protéinase K pendant une courte période avant d'ajouter l'aptamère. L'aptamère NK2 a perdu sa liaison aux bactéries après 10 minutes de traitement avec la trypsine ou la protéinase K. Les sites de liaison de l'aptamère NK2 ont été éliminés par ces traitements, concluant ainsi que les molécules cibles étaient très probablement des protéines membranaires ¹⁰⁶. Les auteurs ont également montré que l'aptamère NK2 améliore la production d'IFN-gamma par les cellules CD4+T en bloquant certaines protéines membranaires à la surface de H37Rv ¹⁰⁶, ce qui améliore la réponse immunologique protectrice contre *M. tuberculosis*.

Une autre utilisation fascinante du Cell-SELEX est la génération d'aptamères qui se fixent aux cellules infectées par un virus. L'insertion des protéines virales à la surface de la cellule hôte modifie la composition de la membrane, générant ainsi des cibles virales d'intérêt. Des aptamères ciblant ces molécules virales peuvent ainsi servir de sondes moléculaires en se liant aux cellules infectées par le virus ¹⁰⁷.

2.3. Stabilité des aptamères

Les acides nucléiques naturels (i.e. non modifiés) sont rapidement dégradés par des nucléases en quelques minutes voire quelques secondes, dans le plasma, en fonction de leur structure et de leur composition chimique ^{108,109}. Les aptamères sont des molécules synthétisées chimiquement, de manière automatique et bien contrôlée. Des modifications chimiques peuvent être introduites afin d'obtenir des aptamères moins sensibles aux nucléases et plus stables *in vivo*. Ces modifications peuvent avoir lieu sur différents sites : le sucre ribose, le lien phosphate ou encore la base nucléique. Elles peuvent être introduites directement dans les banques utilisées pour le SELEX (modifications pré-SELEX) ou après le SELEX, c'est-à-dire qu'une fois les aptamères sont identifiés (modifications post-SELEX).

2.3.1. Modifications pré-SELEX

Les modifications chimiques pré-SELEX doivent être acceptées par les enzymes utilisées pendant le processus de sélection. Parmi les modifications pré-SELEX possibles, nous citons :

- Des modifications au niveau de la position 2' du sucre (désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN) en 2' Amino, 2' Fluoro ou 2' OMéthyle (figure 10) ¹¹⁰.
- Cas des Spiegelmers : c'est une classe particulière d'aptamères, appelés également aptamères en miroir, qui ont été conçus en utilisant des oligonucléotides ayant une configuration en miroir de leurs homologues naturels ¹¹¹. Les aptamères adoptent généralement une configuration chirale droite (D-nucléotides) similaire à celle de l'ADN et de l'ARN ¹¹¹. Les Spiegelmers sont composés d'oligonucléotides ayant une configuration chirale gauche (L-nucléotides). Cette modification confère aux Spiegelmers une résistance à la dégradation par les nucléases (figure 11).

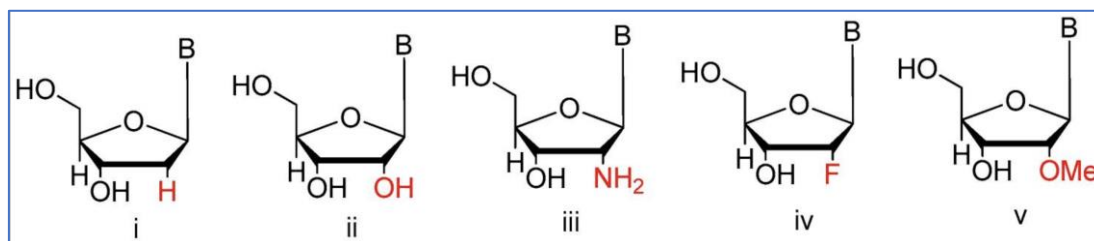


Figure 10 : Les différentes modifications au niveau de la position 2' du sucre. Les substitutions utilisées du sucre désoxyribose ou le ribose (i et ii) au niveau de la position 2' de l'aptamère afin d'améliorer leur stabilité, par les groupements 2'-Amino (iii), 2'-Fluoro (iv) ou 2'-Ométhyle (v) ¹¹¹. (Illustration adaptée de Ni et al 2017).

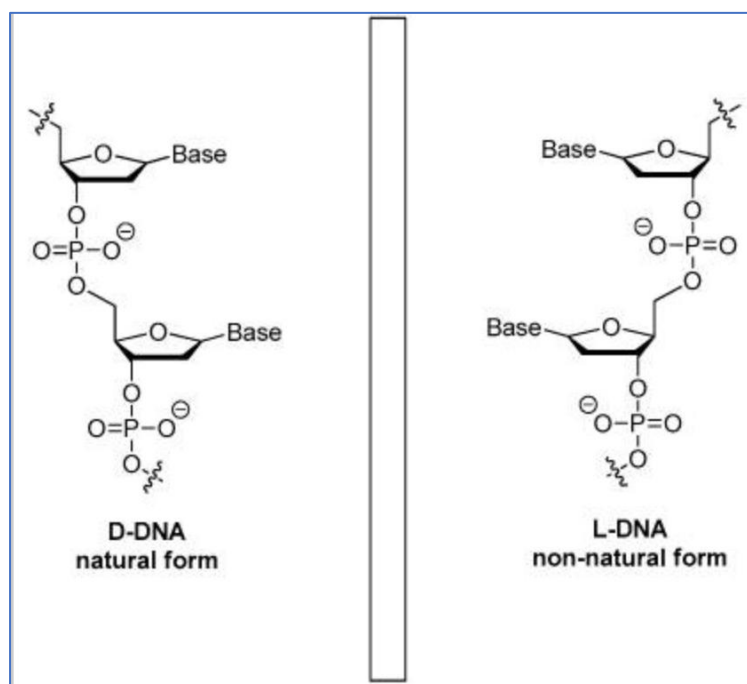


Figure 11 : Structure des aptamères miroirs, appelés *Spiegelmers*, avec *L*-désoxyribonucléotide (*L*-ADN) ¹¹¹.

Les modifications du sucre ribose peuvent également être introduites post-SELEX, mais il est préférable que ce soit avant le processus du SELEX, car les effets de ces modifications apportées après le SELEX peuvent être difficiles à prévoir et pourraient avoir un effet sur la fonction de l'aptamère 109.

2.3.2. Modifications post-SELEX

D'autres modifications post-SELEX permettent de stabiliser les aptamères identifiés et éventuellement d'améliorer les propriétés d'hybridation des aptamères. Les aptamères sont facilement soumis à la clairance rénale en raison de leur taille. Le glomérule rénal a un seuil de masse moléculaire de 30-50 kDa. Les aptamères peuvent être protégés à leurs extrémités par l'ajout de groupements volumineux, tels que le polyéthylène glycol (PEG) qui est le plus couramment utilisé, ou des groupes cholestérols, au niveau de l'extrémité 5' ou 3' des aptamères. En conséquence, la taille des aptamères est augmentée et leur clairance rénale est diminuée ^{111,113}. Les acides nucléiques verrouillés LNA (*locked nucleic acids*) sont formés à partir d'un sucre bicyclique en liant l'oxygène en 2' avec le carbone en 4' via un groupement méthylène. En raison de sa grande résistance aux nucléases et de sa thermostabilité accrue, cette modification est utilisée pour générer des acides nucléiques plus stables ¹¹⁴.

La figure 12 montre les structures des LNA et acides nucléiques couplés au PEG.

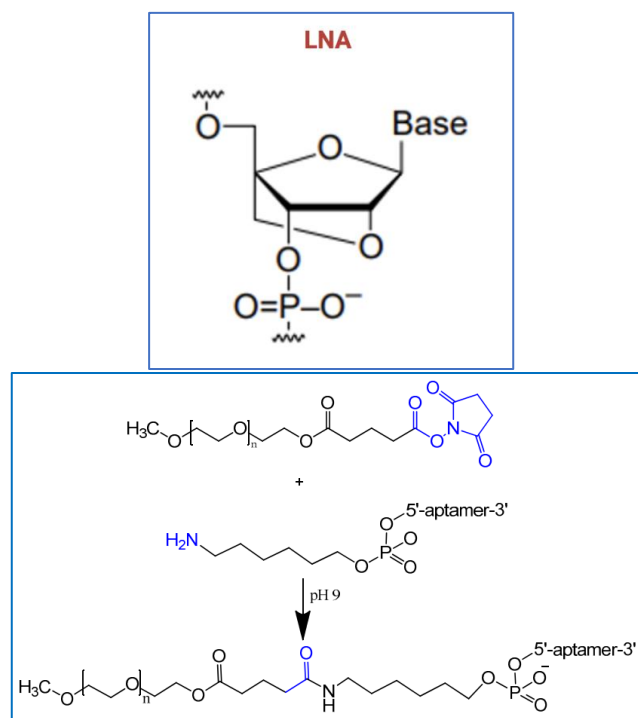


Figure 12 : Structures chimiques des LNA (figure du haut) et schéma réactionnel de la conjugaison de l'aptamère à un polyéthylène glycol (PEG) de 40 kDa à l'extrémité 5' de l'aptamère (figure du bas), par Petersen et al (2003) et Odeh et al (2020) respectivement ^{114,115}.

Le Macugen (pegaptanib sodium, figure 13) est un aptamère avec un squelette d'ARN qui a été approuvé par la FDA. Il a été chimiquement modifié en post-SELEX permettant ainsi d'augmenter sa résistance aux nucléases. Ainsi, au niveau de l'extrémité 5', la molécule du PEG de 40kD a été ajoutée pour accroître sa durée de vie dans les tissus ¹¹⁶. Étant le premier à être utilisé en thérapie, il est détaillé davantage au niveau de la partie « aptamères comme outils thérapeutiques ».

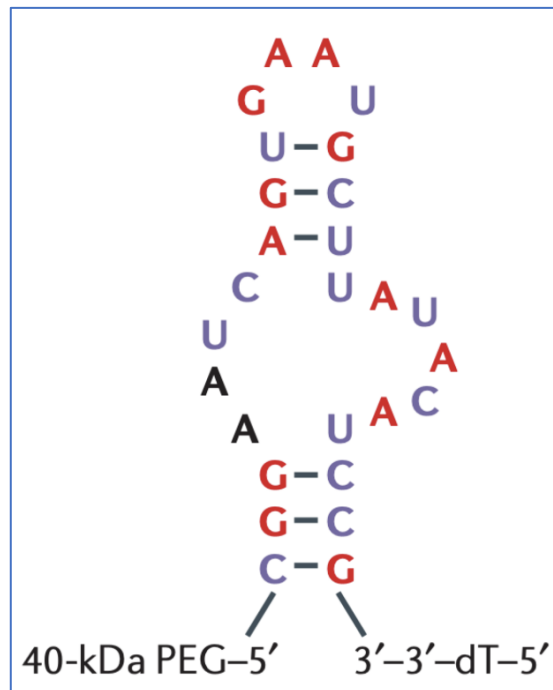


Figure 13 : *Séquence du pegaptanib et structure secondaire prédite.* Les purines 2'-O-méthylées sont représentées en rouge, les pyrimidines 2' fluorées sont représentées en bleu et les ribonucléotides non modifiés sont représentés en noir. Le site de fixation d'une fraction de polyéthylène glycol de 40 kDa est indiqué ¹¹⁶.

L'ajout de groupes fonctionnels comme la biotine, des groupements amines sont également utiles pour l'immobilisation, et la conjugaison de de molécules fluorescentes est utile pour la détection

100.

2.4. Applications

Ci-dessous sont répertoriées certaines applications thérapeutiques et diagnostiques des aptamères.

2.4.1. Aptamères comme outils thérapeutiques

Les aptamères pourraient à l'avenir être utilisés pour traiter les infections bactériennes ou virales, tout comme dans le traitement des troubles immunologiques et du cancer. Tels les anticorps, ils peuvent agir comme antagonistes pour bloquer l'interaction des cibles associées à une maladie, comme les interactions protéine-protéine ou récepteur-ligand ⁹⁴. Ils peuvent agir comme agonistes pour activer la fonction des récepteurs cibles, ou en tant que vecteur pour délivrer des agents thérapeutiques aux cellules ou tissus cibles ⁹⁴.

Plusieurs aptamères ont fait l'objet d'essais cliniques, dont principalement deux exemples sont cités ci-dessous.

Le pegaptanib. En 2004, la FDA a approuvé le premier médicament à base d'aptamère pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Le pegaptanib est un aptamère d'ARN de longueur de 28 nucléotides (figure 13). Il cible le facteur de croissance vasculaire (VEGF) et inhibe son interaction avec ses récepteurs qui se trouvent principalement sur les cellules endothéliales vasculaires. Il se vend sous le nom de Macugen® ¹¹⁷. Cet aptamère a été modifié en post-SELEX pour une meilleure efficacité. Il a été conjugué au PEG afin de réduire sa vitesse de distribution dans les tissus. Il a également été coiffé à l'extrémité 3' d'un nucléotide inversé afin de réduire la dégradation par la 3'-exonucléase ¹¹⁸.

L'ASI411. Anciennement AGRO001, il s'agit d'un oligodéoxynucléotide qui ne contient que des guanines et des thymine. Il a été découvert dans le cadre d'un criblage d'oligonucléotides antisens pour la recherche d'activité antiproliférative. L'aptamère ASI411 induit ses effets thérapeutiques par son interaction avec la nucléoline ¹¹⁸. Cette dernière est une protéine nucléaire, mais dans plusieurs cellules cancéreuses, elle est présente à la surface cellulaire ¹¹⁹. D'autres exemples d'aptamères qui sont en cours d'essais ou ont été approuvés pour une utilisation clinique, sont décrits dans le tableau 6 suivant ¹²⁰.

Tableau 6 : Quelques exemples d'aptamères en cours d'essais cliniques ¹²⁰.

Aptamère	Statut clinique	Cible	Modifications chimiques	Affection
ARC1905 (Zimura)	Phase I achevée, phases II et III en cours	C5	2'fluoropyrimidines 2'-O-méthyl purines 3'-T inversé 40 kDa PEG	Maladie oculaire
E-10030 (Fovista)	Phase II	PDGF	2'-O-méthyl purines 3'-dT inversé 40kDaPEG	Maladie oculaire
Pegaptanib sodium (Macugen)	Approuvé	VEGF	2'fluoropyrimidines 2'-O-méthyl purines 3'-dT inversé 40 kDa PEG	Maladie oculaire
NOX-A12	Phase II	CXCL 12	PEGylé ARN-L	Oncologie
NOX-H94 (Ilexaptetid pegol)	Phase I et II	Hepcidin peptide hormone	ARN-L 5' avec PEG 40 kDa	Anémie
REG1	Phase I et II achevées	Facteur IXa de coagulation	2'-ribo purine ou 2'fluoropyrimidine 40kDaPEG	Maladies coronariennes

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. *C5* : Complément 5. *PDGF* : Facteur de croissance dérivé des plaquettes. *CXCL12* : Chimiochine impliquée dans la signalisation cellulaire, la migration cellulaire et la régulation de divers processus biologiques.

Les aptamères ciblant les récepteurs de surface cellulaire sur-exprimées en condition pathologique, sont particulièrement intéressants principalement pour la détection et le ciblage thérapeutique en cancérologie. Ces protéines de surface sont des biomarqueurs d'intérêt thérapeutique pour le ciblage actif car de telles cibles sont les 'portes d'entrée' cellulaires. Divers aptamères spécifiques d'un récepteur de surface cellulaire ont été conjugués avec des agents thérapeutiques, tels que les ARN interférents ou des médicaments ¹²¹, directement (molécules chimères) ou via l'utilisation de nanoparticules.

a. Aptamère conjugué à des ARNsi et ARNmi

L'utilisation d'oligonucléotides tels que les ARNsi ou les ARNmi, comme outils efficaces pour inhiber l'expression de transcrits ARN complémentaires est utilisée comme une nouvelle classe thérapeutique pour lutter contre des maladies telles que le cancer et le VIH ¹²¹. Les aptamères ont récemment été utilisés pour la délivrance d'oligonucléotides. L'avantage d'utiliser des aptamères conjugués à des ARNsi ou des ARNmi est leur facilité de synthèse. Ces constructions sont connues sous l'acronyme AsiCs pour 'aptamer-siRNA conjugates' ou AmiC pour 'aptamer-miRNA conjugates'. Ces molécules chimères combinent deux acides nucléiques non codants aux fonctionnalités distinctes ¹²¹.

b. Aptamère conjugué aux nanoparticules (NP)

Les NP sont une catégorie de matériaux dont les dimensions varient de 1 à 100nm ¹²². Elles sont de plus en plus utilisées dans plusieurs domaines dont la médecine, pour leurs fonctions de délivrance de traitement vers des cellules infectées ou d'outil de diagnostic ¹²³. Plusieurs études montrent le potentiel de l'utilisation des aptamères conjugués à des NP, notamment dans le domaine de la thérapie du cancer. Par exemple, l'équipe de Zhao et al (2013) a synthétisé une nano sphère d'or creuse (HAuNS) qui a été conjuguée à l'aptamère ARN (39-mer) spécifique du récepteur CD30 (un biomarqueur du lymphome de Hodgkin et du lymphome anaplasique à grandes cellules). Le médicament doxorubicine (cytotoxique) est quant à lui, chargé par la force des charges électrostatiques à la surface du complexe aptamère-HAuNS. Le complexe conjugué obtenu (Apt-HAuNS-Dox) est stable à un pH biologique de 7,4. Après internalisation et à faible pH de 5,0 dans les lysosomes, l'aptamère libère la doxorubicine qui permet l'élimination sélective des cellules tumorales exprimant CD30 ¹²⁴.

2.4.2. Aptamères comme outils de diagnostic et de bio-imagerie

Les aptamères ont été décrits pour identifier les maladies d'origine bactérienne, parasitaire ou virale, ainsi que le cancer. Généralement, ils sont utilisés pour identifier les agents pathogènes infectieux, les antigènes/toxines des bactéries, ou les biomarqueurs des cancers ¹²¹.

a. Diagnostic du cancer

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde. Les chercheurs visent à trouver non seulement de meilleurs médicaments, mais aussi des technologies de détection précoce. Les aptamères pourraient compléter l'arsenal diagnostique en étant des outils d'imagerie et de détection du cancer dans les échantillons biologiques, en raison de leur affinité élevée pour plusieurs biomarqueurs¹⁰¹. Ces derniers peuvent être des récepteurs membranaires, généralement des protéines présentes au niveau de la membrane externe tels que MUC1 (mucine 1), HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) et les récepteurs des œstrogènes ¹²⁵. Ainsi, des biomarqueurs solubles liés aux tumeurs, notamment l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et l'antigène spécifique de la prostate (PSA) ^{126,127} et la détection de cellules cancéreuses telles que les cellules de cancer du sein MCF-7 et les cellules de leucémie CCRF-CEM qui ont été développées récemment ^{128,129}.

Les quantum dots ou points quantiques (QD) semblent être des outils prometteurs pour l'imagerie et le diagnostic du cancer, en raison de leur couplage facile aux acides nucléiques. Lee et al (2015) ont décrit un ciblage simultané de deux marqueurs moléculaires du cancer : la tenascine-C et la nucléoline. Deux QD différents, QD605 et AD655, ont été conjugués à l'aptamère de la tenascine-C (TTA-1) et à l'aptamère AS1411, respectivement ¹³⁰. L'aptamère TTA-1 avait été décrit par Hicke et al (2001) comme spécifique à la tenascine-C, une protéine de la matrice extracellulaire surexprimée dans les cellules tumorales ¹³¹. L'aptamère AS1411 a été décrit précédemment dans la partie des aptamères comme outils thérapeutiques (au niveau de la partie 2.4.1). Il cible la nucléoline dans les membranes plasmiques des cellules cancéreuses ¹¹⁸. Les conjugués QDs-aptamères ont été incubés avec des lignées cellulaires tumorales puis analysés en microscopie confocale. Les résultats montrent que le complexe QD-TTA-1 présente un niveau élevé d'intensité de fluorescence dans les trois lignées cellulaires cancéreuses dont DU145 (cancer de la prostate), U-87 MG (glioblastomes) et A549 (adénocarcinomes). Cependant, l'intensité de fluorescence de QD-AS1411 est plus élevée dans la lignée cellulaire humaine de glioblastome-astrocytome que dans la lignée cellulaire du carcinome pulmonaire.

Ces résultats indiquent que les biomarqueurs du cancer sont exprimés et distribués différemment selon la lignée cellulaire étudiée, et qu'ils peuvent être détectés grâce à des aptamères ¹³⁰. D'autre part, cette technologie pourrait être utilisée pour la localisation intracellulaire ou l'identification de biomarqueurs du cancer, ainsi que pour l'imagerie multiplex de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ou tissus.

Zhang et al (2009) ont été parmi les premiers à utiliser des sondes à base d'aptamères fluorescents dans la recherche sur le cancer, en utilisant un aptamère ARN conjugué au fluorophore Cyanine (Cy5) à son extrémité 5'. Cet aptamère est spécifique du récepteur CD30, une protéine surexprimée dans les lignées cellulaires de lymphome. Deux techniques différentes (cytométrie en flux et microscopie à fluorescence) ont été utilisées pour établir la liaison spécifique de l'aptamère aux cellules de lymphome. Alors que les anticorps anti-CD30 sont utilisés aujourd'hui dans la détection du CD30, cette étude implique que les aptamères CD30 pourraient être utilisés en combinaison avec les anticorps CD30 pour améliorer la détection et le diagnostic des lymphomes ¹³².

Au sein du laboratoire de bio imagerie et pathologies de l'UMR7021-Strasbourg (LBP), Fechter, Cruz da Silva et al (2019) ont sélectionné et caractérisé un aptamère ARN, nommé H02, qui cible les glioblastomes exprimant les intégrines $\alpha 5\beta 1$ ¹³³. Ces dernières sont des récepteurs de la fibronectine, une protéine présente dans la matrice extracellulaire. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle important dans la progression de divers cancers. Une dérégulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est associée à différentes tumeurs malignes ¹³⁴. L'aptamère H02 est capable de se lier aux cellules des glioblastomes expriment l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec une affinité de $277,8 \pm 51,8$ nM ¹³³. Cet aptamère est également capable de détecter des xénogreffes de tumeurs exprimant $\alpha 5\beta 1$ ¹³³. J'ai participé à une autre étude au laboratoire, pour laquelle l'aptamère H02 a été testé simultanément avec l'aptamère E07 qui cible le récepteur d'EGF, (EGFR récepteur du facteur de croissance épidermique) dans le diagnostic des glioblastomes ¹³⁵. Le marquage multiplexe simultané des deux aptamères avec des spécificités différentes sur des coupes de patients atteints de glioblastome a permis de révéler en une seule étape, non seulement l'hétérogénéité inter-tumorale des glioblastomes (différences au niveau de la population) mais aussi l'hétérogénéité intra-tumorale (différences entre les cellules au sein des tumeurs individuelles) ¹³⁵. L'article scientifique est présenté dans l'annexe 3.

b. Diagnostic des maladies infectieuses

Plusieurs études ont montré que les aptamères sont capables de reconnaître des bactéries pathogènes. Par exemple, Marton et al (2016) et Kim et al (2013) ont identifié des aptamères

nommés P1231 et E2, reconnaissant *Escherichia coli* ATCC25922 et *Escherichia coli* KCTC 2571, respectivement^{136,137}. Ces aptamères ont montré une grande affinité, K_d (P1231) = 87.03 ± 17.32 nM, K_d (E2) = 25,2 nM pour les souches utilisées. Ils pourraient être intéressants de les utiliser en diagnostic afin de distinguer les souches pathogènes des souches non virulentes^{136,137}.

Les toxines bactériennes sont des composants majeurs des facteurs de virulence des bactéries pathogènes et leur détection est importante pour le diagnostic d'une maladie bactérienne. Huang et al (2014) ont identifié l'aptamère A15 spécifique à l'entérotoxine A sécrétée par *Staphylococcus aureus* avec une forte affinité, $K_d = 48.57 \pm 6.52$ nM¹³⁸.

En virologie également, plusieurs études ont été menées dans le but de développer des techniques de diagnostic rapides et fiables. Avec la pandémie que le monde a connue début 2020, plusieurs études ont été menées dans l'objectif d'identifier des aptamères ciblant le SARS-CoV2. Dans PubMed, plus de 200 articles sont référencés depuis les 30 derniers mois en indiquant 'COVID and aptamer'. Par exemple, Song et al (2020) ont publié une étude décrivant le développement d'aptamères qui reconnaissent le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine spike S. Deux aptamères à base d'ADN ont été sélectionnés, ayant une affinité pour leur cible du même ordre de grandeur : $K_d = 5,8$ nM et $K_d = 19,9$ nM¹³⁹. Liu et al (2021) ont développé également des aptamères d'ADN spécifiques du SARS-CoV-2, qui révèlent une liaison à la protéine spike S ou au domaine de liaison au récepteur (RBD) avec une affinité de 6,05 nM¹⁴⁰. En juillet 2021, une étude a été lancée pour des essais cliniques parrainés par Achiko AG (Suisse) en collaboration avec l'hôpital universitaire Udayana en Indonésie¹⁴¹. Cette étude se concentre sur un nouveau test salivaire d'aptamères d'ADN pour détecter le COVID-19. Cette initiative est particulièrement importante car jusqu'à présent, aucun essai clinique portant sur l'utilisation d'aptamères antiviraux n'avait été répertorié. Ainsi, le dispositif a été accepté par l'union européenne des dispositifs médicaux de la recherche et a été mis sur le marché sous le nom AptameX¹⁴². Il s'agit d'un produit basé sur la technologie d'aptamères d'ADN développée par Achiko qui utilise des nanoparticules d'or pour cibler la protéine S1 présente à la surface du SARS-CoV-2¹⁴¹, et qui pourrait être utilisé dans des zones disposant d'une infrastructure limitée, sans nécessiter de procédures invasives pour la collecte d'échantillons (un simple examen salivaire).

Les aptamères peuvent aussi être utilisés en tant que biocapteurs (aptasenseurs). Ils ont fait l'objet de nombreux articles dans la littérature, se sont avérés rapides et précis. Un biocapteur est constitué de deux parties : un élément de reconnaissance biologique (bio récepteur) et un transducteur qui transforme la réponse biologique en un signal mesurable qui utilise des principes

électrochimiques, massiques, optiques ou thermiques. Les enzymes, les anticorps, les pathogènes et les acides nucléiques peuvent être utilisés en tant que biocapteurs moléculaires. Les aptamères constituent une nouvelle classe prometteuse de biocapteurs en raison de leur grande sélectivité, sensibilité et stabilité ¹⁴³. Le premier biocapteur basé sur un aptamère a été développé pour détecter l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine générée par diverses espèces de champignons *Aspergillus* et *Penicillium*. De nombreuses cultures agricoles, dont le blé par exemple, ont été infestées par des champignons qui créent de l'OTA, cancérigène et neurotoxique, engendrant ainsi des risques majeurs pour la santé des humains et des animaux ¹⁴⁴. Dans leur étude, McKeague et al (2014) ont développé une nouvelle plateforme de bio détection de la mycotoxine OTA utilisant le Syber Green comme intercalant de l'ADN. Tout d'abord, deux aptamères, nommés A08 et B08, ont été sélectionnés. L'aptamère B08 a une affinité plus forte que l'aptamère A08 pour l'OTA, avec des *Kd de 110 ± 50 et 290 ± 150 nM* respectivement. L'utilisation de ces aptamères avec le Syber Green entraîne une augmentation de l'émission de lumière verte après stimulation par les ultra-violets. Puis, l'incubation de la cible OTA avec les complexes aptamère-Syber Green provoque un déplacement du Syber Green due à une fixation préférentielle de la cible sur l'aptamère, en concurrence avec les sites de liaison du Syber Green. En conséquence, l'émission du Syber Green est réduite. Cette méthode de détection permet ainsi de quantifier l'OTA de manière rapide, sélective et sensible. ¹⁴⁴.

La tuberculose (TB) est une maladie mortelle répandue dans le monde entier. Les tests de diagnostic disponibles pour la tuberculose sont longs, coûteux ou ont une faible sensibilité ¹⁴⁵. Rotherham et al (2012) ont identifié des aptamères contre la protéine du filtrat de culture de 10 kDa (CFP-10) et la cible d'antigène sécrétée de 6 kDa (ESAT-6). Ces deux protéines sont de puissants antigènes des cellules T reconnues pour 70 % des patients atteints de tuberculose. Six aptamères ont été sélectionnés pour ces cibles, dont l'un a une affinité de $8 \pm 1.07 \text{ nM}$ et une excellente spécificité. L'étude a conclu que les aptamères peuvent être utilisés pour détecter la tuberculose active dans des échantillons biologiques humains ¹⁴⁵. Pour évaluer leur spécificité et affinité, des tests enzymatiques d'oligonucléotides (ELONA) ont été effectués¹⁴⁵.

En raison de leur faible coût, de leur grande sensibilité, de leur facilité de synthèse et de couplage, les sondes aptamères fluorescentes ont un fort potentiel pour le diagnostic par imagerie.

Pour conclure, de manière générale, la technologie des aptamères suscite un intérêt croissant ces 25 dernières années pour la thérapie et le diagnostic ⁸⁸. Des recherches supplémentaires à propos de leurs caractéristiques doivent être menées afin d'améliorer leur panel d'applications, ce qui leur promet un futur radieux dans le domaine de la santé, en particulier pour le diagnostic et le

traitement des maladies infectieuses, un domaine encore peu exploré par les spécialistes des aptamères.

Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans un contexte transdisciplinaire, à l'interface histoire/chimie/microbiologie/biotechnologie. Avec l'aide des historiens et d'experts en technologies linguistiques (Archimède UMR7044), Dr. Véronique Pitchon et son équipe, nous avons pu identifier de nombreux remèdes prescrits contre des symptômes reflétant des infections cutanées (toux, maladies urinaires, maladies de peau). Nous nous sommes intéressés aux remèdes traitant de maladies de peau tels que les furoncles, abcès... et nous avons sélectionné deux remèdes combinant des métaux et/ou des plantes, puis nous avons traduit les textes anciens en termes scientifiques.

Le premier objectif de ma thèse a été d'extraire des connaissances scientifiques de ces remèdes : quelles en sont les propriétés biologiques et chimiques ? Quelles sont les voies d'action ? Peut-on en tirer des hypothèses quant à de nouvelles stratégies de soins ? Qu'est-ce que ces connaissances nous apprennent sur la pratique médicale passée ?

Un deuxième objectif de cette thèse a été de développer des outils de vectorisation. Les connaissances extraites de ces remèdes anciens ne seront pas aussi facilement exploitables : certaines substances actives pourraient présenter une forte toxicité, une faible solubilité... Une solution pour exploiter au mieux ces nouvelles connaissances serait de véhiculer ces substances actives directement au foyer infectieux. Dans une perspective de développer des méthodes modernes de vectorisation et d'identifier de nouvelles combinaisons et/ou stratégies thérapeutiques, j'ai étudié la spécificité de reconnaissance de bactéries d'intérêt thérapeutique par des aptamères.

PARTIE EXPERIMENTALE
MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, aérobic strict. Cette bactérie est capable de se multiplier sur une large plage de température comprises entre 4 et 45°C, mais la température optimale de sa croissance reste entre 30 à 37°C. *P. aeruginosa* n'est pas un membre de la microflore normale humaine. C'est l'une des bactéries les plus souvent responsables des infections nosocomiales. Il s'agit d'une bactérie opportuniste, touchant souvent les voies respiratoires, mais également les voies urinaires, et responsable d'autres infections ¹⁴⁶. Elle n'affecte pas les individus sains mais peut être mortelle chez des patients immunodéprimés ou atteints de la mucoviscidose ; une maladie rare qui touche les voies digestives et respiratoires ¹⁴⁷. Elle est naturellement résistante aux aminoglycosides, les fluoroquinolones et les beta-lactames suite à l'imperméabilité de la membrane externe ¹⁴⁸. La souche sauvage de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PAO1) a été utilisée dans nos études.

1.2. *Staphylococcus* sp.

Les staphylocoques sont des bactéries de type coque (cocci) à coloration Gram positif, non capsulées, très résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture. Elles sont classées les premières dans la liste des infections nosocomiales, mais peuvent aussi être cause d'infections communautaires.

1.2.1. *Staphylococcus epidermidis*

Il s'agit d'une bactérie symbiote, inoffensive dans son environnement naturel. Elle fait partie du microbiote cutané de l'Homme. Cependant, quand elle envahit le corps humain, elle peut être un pathogène virulent et induire des infections nosocomiales ¹⁴⁹. Les souches de *S. epidermidis* sont souvent résistantes aux antibiotiques, notamment la pénicilline, l'amoxicilline et la méticilline. *S. epidermidis* pousse sur un milieu gélosé nutritif entre 30 et 37°C, sans aucune exigence nutritive particulière, et est aérobic-anaérobic facultatif. Nous avons étudié deux souches de *Staphylococcus epidermidis*, la première est une souche provenant des collections de l'hôpital de Strasbourg, et la deuxième est une souche de référence *S. epidermidis* ATCC35983.

1.2.2. *Staphylococcus aureus* HG001

S. aureus est la souche la plus virulente des staphylocoques. Elle est responsable d'intoxication alimentaire, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. Le traitement reste difficile en raison de l'émergence de souches multirésistantes telles que le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline). Elle peut croître dans un milieu contenant jusqu'à 10% de sel, ainsi de façon facultative, *S. aureus* peut se développer en aérobie ou anaérobie à des températures variant de 18°C à 40°C. Nous avons travaillé avec la souche *S. aureus* HG001, dérivé de *S. aureus* NCTC8325 qui a été isolée en 1960 à partir d'un patient atteint de septicémie et dont le génome a été séquencé en 2001. Elle est considérée comme un modèle de référence par la communauté scientifique ¹⁵⁰.

1.3. *Escherichia coli* MG1655

E. coli, est un colibacille à Gram négatif qui fait partie du microbiote intestinal et est responsable de plusieurs infections. *E. coli* MG1655 est la souche choisie par le groupe Blattner pour la première séquence publiée d'une souche de laboratoire de type sauvage d'*E. coli* K-12 ¹⁵¹.

1.4. *Corynebacterium striatum*

Les *Corynebacterium* sont des bacilles à Gram positif, faisant partie de l'environnement et de la flore normale de la peau. Elles ne sont pas contaminantes, cependant certaines souches peuvent être à l'origine de maladies graves dont le *Corynebacterium striatum*. Elle a été la cause de méningite, d'endocardite et de bactériémie en 1980 ¹⁵². Nous avons étudié une souche provenant des collections de l'hôpital de Strasbourg.

2. Milieux de culture et préparations

Des précultures de 5 à 10 ml sont effectuées dans des tubes falcon 50ml pendant 18 heures à 37°C sous agitation à 220rpm. Après incubation, la densité optique de la suspension bactérienne est évaluée (DO à 600_{nm}) et est ajustée en fonction des besoins

Les bactéries peuvent être conservées dans le glycérol à -80C. Pour 800 µL de suspension, un volume de 200 µL de glycérol à 85 % est ajouté puis le tube est mélangé par vortex avant d'être placé au congélateur à -80°C. Les cellules sont mises en culture jusqu'à une densité optique de 0,6. A ce stade, les bactéries sont en phase exponentielle. Les bactéries peuvent aussi être conservées à +4C dans des boîtes de Pétri pendant 3 semaines. Dans ce cas, après une culture de 16 heures en milieu liquide, l'ensemencement est réalisé en surface par stries à l'aide d'une pipette Pasteur sur un milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37° C, pendant

une nuit (ON) jusqu'à apparition de colonies séparées le long des stries. Les boîtes sont alors fermées par du parafilm puis conservées à 4°C.

2.1. Lysogeny broth Lennox

Le milieu lysogeny Broth Lennox (LB) contient 10g de peptone, 5g d'extraits de levure et enfin 5g de chlorure de sodium par litre d'eau. Il est utilisé sous sa forme gélosée dans des boîtes de Pétri en ajoutant 15g/L d'agar ou de LB lennox agar (*Euromedex*) à 35g/L. Ce milieu est utilisé pour étudier la croissance des bactéries et les conserver en boîte de Pétri ou en glycérol à -80°C. C'est également le milieu de base pour effectuer les tests d'activité antibactérienne.

2.2. Brain Heart infusion

Le milieu de Brain Heart Infusion (BHI) est un milieu liquide à usages multiples servant à la croissance d'un grand nombre d'espèces de bactéries et de champignons. Il a été principalement utilisé pour effectuer les tests antibactériens du remède 2.

2.3. Mueller Hinton II

Le milieu Mueller Hinton II Broth (MH II) contenant l'hydrolysate acide de caséine, l'extrait de bœuf, des minéraux, des vitamines, du carbone et d'autres nutriments nécessaires pour la croissance des bactéries, a été utilisé pour étudier la croissance des bactéries en présence des différents sidérophores. Il s'agit d'un milieu utilisé principalement dans les tests d'antibiogrammes.

2.4. Succinate media

Ce milieu est composé d'acide succinique 4 g/L ; phosphate du sodium dibasique Na_2HPO_4 9 g/L ; sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L et l'hydroxyde de sodium NaOH 1,52 g/L. Le Na_2HPO_4 ainsi que le NaOH, sont utilisés pour tamponner le milieu et également comme source de phosphate et de sodium pour les bactéries.

L'ensemble des composants de ce milieu provient du fournisseur BD Difco™.

3. Test de l'activité antibactérienne des remèdes anciens

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des différents ingrédients seuls ou combinés, nous avons utilisé deux méthodes ; un test qualitatif et un test quantitatif qui permettra de déterminer la concentration minimale inhibant la croissance bactérienne, ou concentration minimale inhibitrice (CMI ou MIC en anglais),.

3.1. Test qualitatif

Ce test est également appelé diffusion sur agar. Le même protocole a été utilisé pour toutes les souches étudiées. 300 μ L de cultures bactériennes cultivées toute une nuit à 37°C sont dilués au 1/100 puis étalés sur une boîte de Pétri contenant du BHI ou LB gélosé. Après 10min de séchage à température ambiante, différentes quantités des ingrédients à tester sont déposés (0.1 à 1 μ mol de CuCa et CuAc) directement sur gélose. Les boîtes de Pétri sont finalement laissées toute la nuit (18h) à 37°C. Un halo bactérien autour du dépôt révèle une activité antibactérienne.

3.2. Test quantitatif

3.2.1. Étude des remèdes de la pharmacopée médiévale arabe

Ce test quantitatif permet d'estimer la MIC en suivant la croissance bactérienne, à l'œil nu et par lecture de la densité optique DO_{600nm} par le lecteur de plaque Infinite TECAN 200/M200 Pro. Après culture de toute une nuit, la densité optique à 600nm est mesurée et est ajustée à 0,0002 pour l'ensemencement des plaques 96puits (Corning™ Clear Polystyrene 96-Well Microplates) dans la première colonne. Chaque puits contient 200 μ l au final (bactéries + extraits...).

Nous ajoutons le volume adéquat de chaque extrait testé dans la première colonne afin d'initier la gamme de concentration allant de 5mg/mL à 9 μ g/mL (figure 14). Deux contrôles négatifs sont réalisés contenant le milieu de culture et la culture bactérienne seule sans ajout d'extraits de plantes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5mg/mL	2,5mg/mL	1,25mg/mL	0,6mg/mL	0,3mg/mL	0,15mg/mL	75µg/mL	37,5µg/mL	18,8µg/mL	9µg/mL	Culture bactérienne seule	Blanc : Milieu de culture
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figure 14 : Disposition de la plaque de 96 puits pour le test des extraits des plantes sur la croissance des bactéries.

Chaque ligne, de couleur différente, correspond à un extrait de plante testé et chaque colonne correspond à une concentration de l'extrait testé. La colonne 11 correspond au contrôle positif du test où la bactérie pousse sans présence de l'extrait. La colonne 12 correspond au contrôle négatif avec le milieu de culture uniquement.

Pour tester la synergie entre chaque extrait et l'acétate de cuivre (CuAc), qui correspond au vert de gris mentionné dans la préparation 1, l'extrait de plante à tester a été ajouté selon la gamme de concentration utilisée ci-dessus, puis le volume adéquat du CuAc a été ajouté. La gamme de concentration du CuAc est de 5mM à 9µM.

3.2.2. Etude des chélateurs de fer

Les chélateurs de fer ont été testés de la même manière, avec une gamme de concentration allant de 1mM à 1,9µM (figure 15).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1mM	0,5mM	0,25mM	0,125mM	62,5µM	31,3µM	15,6µM	7,8µM	3,9µM	1,9µM	Culture bactérienne seule	Blanc : Milieu de culture seule
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figure 15 : Disposition de la plaque de 96 puits pour le test des chélateurs de fer sur la croissance des bactéries.

Nous avons testé l'efficacité antibactérienne de plusieurs chélateurs de fer, déjà étudiés pour d'autres projets au sein du laboratoire UMR7242, et dont les propriétés de chélation ont été décrites. Les quatre molécules utilisées sont : Déferoxamine, deferiprone, exjade et la nocardamine. Ces molécules sont utilisées principalement pour le traitement des troubles sanguins, notamment le traitement de la surcharge de fer.

Enfin, des mélanges entre antibiotiques et chélateurs ont été réalisés afin d'identifier d'éventuelles synergies possibles chélateur/antibiotique. La CMI des antibiotiques a été testée

sur une gamme de 100µg/mL à 195ng/mL, puis la synergie a été testée en ajoutant soit ; une concentration fixe d'antibiotique (CMI/2) et une gamme de concentrations de chélateurs (allant de 1mM à 1,9µM). Ou, une concentration fixe de chélateurs (CMI/2) et une gamme de concentrations d'antibiotiques (allant de 100µg/mL à 195ng/mL).

Les antibiotiques utilisés sont décrits dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : *Antibiotiques utilisés.*

Nom de l'antibiotique	Classe	Mode d'action
<i>Erythromycine</i>	Macrolides	Inhibition de la synthèse protéique
<i>Ofloxacin</i>	Quinolones	Inhibition de l'ADN
<i>Tobramycine</i>	Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique
<i>Céfalexine</i>	Beta-lactames	Inhibition de la paroi bactérienne

4. Test de l'apta-fluorescence sur une bactérie ou sur différentes bactéries simultanément

Les aptamères sont synthétisés par la société *Eurogentec Inc.* Chaque aptamère est conjugué à un fluorophore en 5' pour les visualiser en microscopie confocale.

4.1. Essais fonctionnels de liaison des aptamères aux bactéries

Le protocole ci-dessous a été établi après plusieurs optimisations techniques : modifications des temps de lavages, de la préparation des cultures bactériennes pour tester les mélanges bactériens (en réalisant des co-cultures de bactéries ou des cultures séparées), des temps d'incubation des aptamères avec les bactéries. Dans un premier temps, les tests de liaison ont été réalisés en utilisant un aptamère et une souche bactérienne. Puis, les aptamères ont été testés sur un mélange de souches bactériennes différents.

Les trois souches bactériennes PAO1, *S. aureus* et *E. coli* ont été utilisées pour les tests de liaison un aptamère-une bactérie. La souche PAO1 génétiquement modifiée avec l'ajout de la protéine fluorescente verte, *Green Fluorescent Protein* (GFP) a été utilisée pour les tests de liaison sur un mélange avec *E. coli*, parce qu'elles se présentent sous la même forme ; en bâtonnet ou bacilles.

- Culture des bactéries
Les bactéries (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*) sont mises en culture liquide dans du LB, jusqu'à l'obtention des bactéries en phase exponentielle de croissance. Ensuite, elles sont fixées par l'ajout du paraformaldéhyde (PFA) à 4% (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) pendant 1h30 à température ambiante. Les cellules bactériennes sont lavées deux fois avec du DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, LONZA) et sont transférées dans du tampon d'hybridation (50mM Tris HCl pH 7.4, 5mM KCl, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0,1% NaN₃) afin d'ajuster la DO_{600nm} à 1.
- Montage des bactéries sur lame
25µL de cellules bactériennes (à DO_{600nm} = 1) fixées au PFA sont déposées sur lames adhésives (Thermo Scientific™ SuperFrost Plus Slides). Cette goutte est ensuite séchée pendant 30 minutes à 37°C, puis saturée en protéines (albumine de sérum bovin, BSA) et acides nucléiques ARNt en déposant sur la goutte séchée 10µL du tampon d'hybridation + BSA (10mg/mL) (Sigma Aldrich, USA) + ARNt (1µg/mL) (Life Science Sigma USA). La lame est ensuite incubée pendant 15 minutes à température ambiante.
- Préparation des aptamères
Les aptamères en solution stock à 100µM sont dénaturés thermiquement dans un thermoblock à 95°C pendant 5 minutes, puis mis sur glace pendant 5 minutes. Ensuite, les aptamères sont dilués dans le tampon d'hybridation pour atteindre des concentrations finales variables (de 0,4 à 1,8µM) pendant 15 minutes à température ambiante.
- Dépôt des aptamères sur les bactéries fixées sur lames
20µL d'aptamères sont déposés sur les bactéries montées sur lame, puis les lames sont placées dans une chambre humide pendant 30 minutes à 37°C. Après un lavage avec de la solution tampon Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) 1X, les aptamères sont fixés avec du paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 8 minutes à température ambiante. Deux lavages avec du DPBS 1X sont ensuite effectués.
- Marquage de l'ADN bactérien au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI).
L'ADN bactérien est marqué avec du DAPI (10µg/mL) (Agilent, USA) pendant 45min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un dernier lavage est effectué avec du DPBS 1X.
- Montage entre lame et lamelle
Les lamelles sont fixées sur les lames avec le Fluoromount-G Mounting Medium d'Invitrogen (Invitrogen, USA) et scellées avec du vernis transparent. Les lames sont

ensuite conservées à l'abri de la lumière jusqu'à l'étape de visualisation au microscope confocal.

L'ensemble des préparations des tampons et solutions utilisés dans ce protocole est en Annexe 2.

- Visualisation au microscope confocal.

Les images sont obtenues par microscopie confocale à balayage laser Leica TSC-SPE (Leica Microsystems, Allemagne), en utilisant plusieurs lasers pour visualiser chaque fluorophore : $\lambda_{em}=358\text{nm}$ pour exciter le DAPI, $\lambda_{em}=495\text{nm}$ pour exciter l'isothiocyanate de Fluorescéine (FITC), $\lambda_{em}=578\text{nm}$ pour exciter l'Alexa568 et $\lambda_{em}=649\text{nm}$ pour exciter la Cy5. La figure 16 ci-dessous montre le spectre d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. L'imagerie confocale a été faite en répétition technique au minimum trois fois. Les images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ.

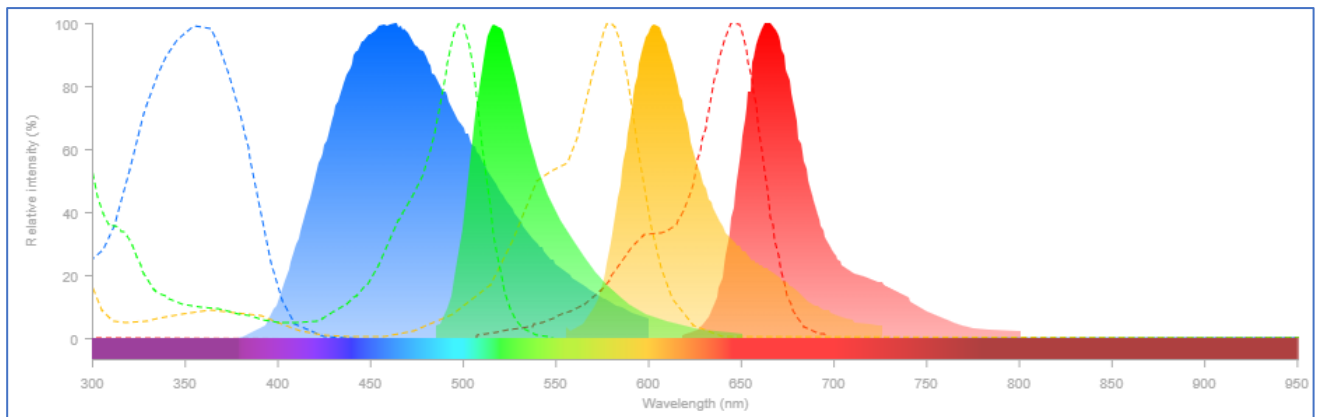


Figure 16 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence caractéristiques des fluorophores utilisés dans nos études. Les courbes en pointillées et pleines correspondent aux spectres d'absorption et d'émission, respectivement.

Le DAPI est représenté en bleu, le FITC en vert, l'Alexa568 en orange et la Cyanine 5 en rouge. Cette image a été réalisée grâce à l'outil *in silico* Fluorescence SpectraViewer de Thermo Fisher Scientific.

4.2. Essais de liaison des aptamères aux biofilms bactériens

Ce protocole est adapté à partir de Pompilio et al (2008) ¹⁵³. Des cultures de 200 µL à DO_{600nm} de 0,1 sont incubées en plaque de 96 puits (Corning™ Clear Polystyrene 96-Well Microplates). La plaque est ensuite incubée entre 24h et 48h à 37 °C, sans agitation.

4.2.1. Dosage de la production des biofilms

Le dosage de la production du biofilm est effectué selon le protocole suivant :

- Le surnageant est enlevé délicatement et le biofilm est ensuite fixé par séchage 1 h à 60°C.
- 200 µL de cristal violet (1/10) sont ajoutés délicatement dans les puits pour colorer les biofilms fixés. La plaque est incubée 5 min à température ambiante.
- Le liquide est enlevé et 3 rinçages à l'eau sont effectués.
- La plaque est séchée pendant 1 h à 37°C.
- 200 µL d'acide acétique à 33% sont ajoutés dans les puits pour solubiliser les biofilms. Incubation 15 min.
- L'absorbance du cristal violet remis en suspension est ensuite mesurée à 492 nm au lecteur de microplaque Infinite® 200 (Tecan).

4.2.2. Étude de l'effet des aptamères sur la croissance du biofilm de PAO1 et *S. aureus*

Ce test avait pour objectif de quantifier l'effet de l'aptamère sur la croissance du biofilm de PAO1 et celui de *S. aureus*. Nous avons choisi de continuer à étudier les biofilms de ces deux bactéries seulement. Nous avons effectué deux tests :

- i. Ajout de l'aptamère au moment de l'ensemencement de plaque.
- ii. Ajout de l'aptamère après 24h de croissance des biofilms.

Après préparation d'une culture de PAO1 et de *S. aureus* dans MH II, une plaque de 96 puits a étéensemencée, puis incubée à 37°C sans agitation. Pour le cas (i), différentes concentrations d'aptamères à 5µM, 2,5µM et 1,25µM ont été ajoutés au moment de l'ensemencement, et le dosage est réalisé après 24h de croissance. Pour le cas (ii), l'aptamère est ajouté aux concentrations décrites ci-dessus, après 24h de croissance du biofilm, puis le dosage est fait.

4.2.3. Étude de liaison des aptamères au biofilm de PAO1 au microscope confocal

- Préparation de culture

A partir d'une préculture de la souche PAO1 dans 10mL du milieu MH II, la DO_{600nm} est ajustée à 0,1, puis 100 μ L de la nouvelle culture sont transférés dans une plaque à 8 puits (μ -Slide 8 Well Glass Bottom, Ibidi Germany). Après incubation pendant 8 heures à 37°C, un lavage est effectué avec du PBS 1X et 100 μ L du milieu MH II sont ajoutés puis la plaque est incubée ON à 37°C sans agitation.

- Test de fluorescence :

Un lavage est effectué avec du PBS 1X et 20 μ L de PFA 4% sont ajoutés afin de fixer le biofilm, puis 20 μ L de différents aptamères (F23-Cy5, E2-A1568, A14-FITC, Cy5-Tutu-22 décrits dans la partie résultats) à 1 μ M et 5 μ M¹⁵⁴. La plaque est mise à nouveau à 37°C pendant 30 minutes. Puis, 1/1000 du DAPI (10 μ g/mL) est ajouté afin de marquer l'ADN bactérien et la plaque est incubée à l'abri de la lumière pendant 30 minutes avant la visualisation au microscope confocal. La reconstruction 3D correspond aux Z-stack des images confocales obtenues. La reconstruction d'images 3D a été réalisée à l'aide du logiciel IMARIS.

PARTIE EXPERIMENTALE
RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE 1

Exploration des remèdes anciens : Révéler des stratégies thérapeutiques potentielles contre les pathogènes résistants aux antibiotiques.

Chapitre 1 : Exploration des remèdes anciens : Révéler des stratégies thérapeutiques potentielles contre les pathogènes résistants aux antibiotiques

1. Introduction de la revue : History as a Source of Innovation in Antimicrobial Drug Discovery

L'émergence de l'antibiorésistance constitue une préoccupation majeure pour la santé mondiale, malgré les avancées de la médecine moderne. De manière intéressante, tout au long de l'histoire, les individus ont cherché des remèdes pour combattre les infections. Revisiter et exploiter les connaissances contenues dans les remèdes anciens pourrait potentiellement ouvrir la voie à une multitude de stratégies thérapeutiques et de candidats médicamenteux capables de lutter contre les pathogènes résistants aux antibiotiques. Pour cela, une revue de littérature sur l'exploration des thérapies anciennes basées sur la pharmacopée de l'âge médiéval arabe a fait l'objet d'une publication dans le Journal *Biomedical & pharmacology Journal* : Basma Abdallah, Hassan Ait Benhassou, Laila Sbabou, Régine Janel-Bintz, Laurence Choulier, Véronique Pitchon et Pierre Fechter (2023) ¹⁵⁵.

L'objectif de cette revue est de présenter des arguments en faveur de la rationalité de l'approche scientifique des médecins du passé et de la valeur scientifique de l'étude des pharmacopées anciennes. Nous nous sommes concentrés sur l'âge d'or de la médecine médiévale arabe, qui a exercé une influence profonde sur la médecine occidentale pendant des siècles. Cet âge a été une période importante dans l'histoire de la médecine ancienne. En examinant cette période historique, nous cherchons à mettre en lumière l'intégration des connaissances médicales anciennes dans des approches thérapeutiques innovantes et modernes en comblant le fossé entre le passé et le présent.

Cet article met l'accent également sur l'importance de puiser dans le passé des sources d'inspiration pour des stratégies de soins futurs. L'exploration des remèdes anciens rend non seulement hommage aux contributions ancestrales, mais valorise également leur potentiel afin d'enrichir la médecine moderne, notamment dans la lutte continue contre l'antibiorésistance.

History as a Source of Innovation in Antimicrobial Drug Discovery

Basma Abdallah^{1,2,3,4}, Hassan Ait Benhassou¹, Laila Sbabou²,
Régine Janel-Bintz⁴, Laurence Choulier³, Véronique Pitchon⁵ and
Pierre Fechter^{4*}

¹Prevention & Therapeutics Center, Moroccan Foundation for Science, Innovation & Research (MAScIR), Rabat, Morocco.

²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V Rabat, Faculty of Sciences, Rabat, Morocco.

³CNRS, UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France.

⁴CNRS, UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

⁵CNRS, UMR7044, Archéologie et Histoire Ancienne : Méditerranée- Europe, MISHA, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

*Corresponding Author E-mail: p.fechter@unistra.fr

<https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2656>

(Received: 06 January 2023; accepted: 14 March 2023)

The proliferation and prevalence of antibiotic-resistant bacteria despite modern medicine is considered as one of the most alarming threats to global health. The fear that antibiotics that work today might not work tomorrow makes it imperative to search and develop novel drugs or therapeutic strategies to fight against micro-organisms resistant to our current approaches. From many centuries, people have sought solutions to combat infections and proposed countless remedies, traces of which can be found in manuscripts preserved over the past centuries. The re-examination and exploitation of these ancient remedies might be a key to a vast pool of potential therapeutic strategies or drug candidates against antibiotic-resistant pathogens. This, however, would first require the consideration of these ancient solutions as scientifically pertinent leads for new therapies. The aim of this review is to highlight arguments in favor of a rationality in the scientific approach of these past physicians as well as of a medicinal interest in studying these ancient pharmacopeias. To narrow the scope of our research, we focused on the Arab Medieval Golden Medical Age, which inspired occidental medicine hundreds of years after its preeminence. We further highlight the possibility of integrating this knowledge into innovative, modern therapeutic approaches.

Keywords: Arab Medieval Pharmacopeia, natural remedies, pathogens, antibiotic resistance.

Pharmacy emerged from human efforts to relieve their physical suffering through remedies prepared with natural ingredients. Ancient and medieval pharmacopeias contain information on the use of medical material, that may be from plant, mineral, or animal origin. It is thus still possible

that these thousand-year-old pharmacopeias hold secrets that could contribute to nowadays medicines. Many leading drugs (anticancer, antimalarial, painkillers, etc.) are indeed derived from these ancestral traditional pharmacopeias¹. However, of the > 30,000 plants described in

traditional pharmacopeias, less than 5,000 have been studied². The question is whether and how to exploit this vast pool of potential therapeutics^{3,4}.

In the last decade, medicinal plant research has turned to old medicinal-botanical texts, to study the history and evolution of pharmacopeias, and to identify lead compounds for new drug discovery⁵⁻⁸. Despite this pivot in research focus, experiments that test the activities of entire historical remedies are rare, difficult to conduct, and the subject of much misunderstanding. This is due to several factors including:

The folkloric image associated with ancient medicines. It is difficult to evaluate remedies objectively due to the frequent intrusion of magical and sacred although their development remained rationally designed at its base. It may therefore be difficult to evaluate the biological effect of each ingredient. However, very often this interference is not constitutive, but superadded: the rational/irrational association can usually be clearly separated. Further, the diagnosis of a malady can also be complex, often involving supernatural aetiologies alongside natural causes. In contrast to modern medicine, which seeks a direct cause for a pathology, ancient systems often seek to flush out deep-seated causes. This disorganizes and devalues the care provided, which is nevertheless often rational.

The difficulty of transposing ancient practices into our present culture. This requires a huge interdisciplinary research effort alongside, a dialogue between disciplines, very well explained by Harrison and Connelly⁹. Furthermore, on the opposite to current medicines containing a single active ingredient, medieval remedies are usually preparations made from several ingredients, acting synergistically¹⁰⁻¹². It is thus possible that each ingredient taken individually does not carry a strong activity, but that the combination can bring a certain, desired effectiveness. Nonetheless, the effectiveness of a remedy, which is the sum of its multiple actions, will be more difficult to evaluate and to determine, and is not necessarily favored by current research.

The juxtaposition of two medicines, traditional and modern. While modern medicine gained power and prestige, traditional medicine felled victim to trivialization and/or the increasingly untrained bodies of people practicing it over

the course of many years. This resulted in the degradation of ancient knowledge, and a more superficial scientific approach. It is thus necessary to restore confidence and rationality in the study of traditional medicines, and to find room for dialogue between both approaches, that are ultimately rather complementary than opposed, *i.e.*¹³⁻¹⁷.

Although discredited in recent years, traditional medicines have nevertheless been marked throughout their history by a rationality, and a scientific approach that enabled the emergence of remedies that we could quite rightly consider as innovative by modern standards despite being designed millennia ago. It is important to remember that traditional practices were characterized by the seal of research, carried out by prominent scientists who led to major discoveries and developments. Ancient pharmacopoeias could again be considered as a relevant starting point for the search for new remedies. This will be illustrated through a few examples from the scientific literature. This review will focus on the medieval Arab period perceived as the golden age of ancient medicine, and through the lens of the fight against microbial infections, one of the major medical concerns of the medieval era.

Antibiotic resistance

Infections have marked human history. Today, aside from the COVID-19 pandemic, infections are considered less anxiety-provoking compared to other pathologies like cancer, but this was not always the case: at medieval times, drinking water, cutting, or injuring oneself could lead to dangerous or even fatal infections. As these infections were a daily preoccupation, physicians also developed many leading remedies to counter them⁴.

The advent of antibiotics, with Fleming's discovery of penicillin in 1928, a compound produced by the fungus *Penicillium notatum*, revolutionized the treatment of infections^{18,19}, leading to the belief that microbial infections were 'over'. The use of traditional medicines was thus no longer relevant and lost much of its prestige. This was nevertheless regardless of the ability of bacteria to resist antibiotics. If microbes can produce antibiotics (most of the antibiotics used are of microbial origin), it is indeed logical that other microbes have found ways to resist these same antibiotics. The resistances have then spread

widely with the unreasonable use of antibiotics, *i.e.*²⁰⁻²².

Bacteria strains resistant to antibiotics were detected quite quickly after their introduction to the market. This was the case for penicillin, with resistant *Staphylococcus aureus* found in the 1940s^{23,24}. *Streptococcus pyogenes* resistant to sulfonamide was also readily detected in military hospitals during the second World War²⁵⁻²⁷. *Mycobacterium tuberculosis* with streptomycin resistance was revealed as well in 1948²⁸. Resistance to multiple drugs was first observed in the late 1950s to 1960s among enteric bacteria, like *Escherichia coli*, or other from the *Shigella* and *Salmonella* genus²⁹. These resistances caused also a gradual re-emergence of pathologies like tuberculosis, since the 1980s, mainly due to multi-drug resistant strains, and was aggravated by the emergence of the human immunodeficiency virus³⁰.

As a consequence of the pervasiveness of the above bacterial strains, the emergence of antibiotic resistance has been rising rapidly all over the world. Ultimately, a new resistance appeared with every new antibiotic synthesized (Figure 1). We are therefore faced with a growing global health threat. In 2019, a study showed the involvement of antibiotic-resistant bacteria in the deaths of more than 1.2 million people³¹. This may be attributed to different factors, such as the abusive use of antibiotics, as well as a shortage of new drug development by the pharmaceutical industry, etc.³².

In the fear that antibiotics that are effective today might no longer be functional tomorrow, and with the rapid spread of antibiotic resistance, there is an important need to develop new strategies to limit the use antibiotics and to find new therapeutic solutions. Ancient societies have used and/or combined countless natural substances to treat diseases, trying, testing, and improving these strategies over the course of many centuries. Thus, ancient methodologies could serve as basis for the discovery of novel therapeutic strategies. However, the establishment of interdisciplinary consortia dedicated to the study of these remedies must be implemented, as well as the demonstration of the interest, feasibility, and future prospects of such approaches.

Rationality in the design of remedies

If different studies already highlighted

some interest in studying past remedies or highlighted antibiotic use from past records, *i.e.*³³⁻⁴⁰, the consideration of these past remedies as a reservoir of pertinent strategies to combat infection would require more complex and coordinated strategies, involving intense collaboration between art, social and experimental sciences.

A pioneering interdisciplinary consortium (Ancientbiotic, <https://ancientbiotics.co.uk/>) has been set up to study a 10th Century medical text known as 'Bald's Leechbook' containing a plentitude of remedies. From this book, a collyrae (Table 1) has been chosen to highlight the potential of these medicines to combat infections. The goal was to study the medical approaches of past physicians and to demonstrate the efficacy of an ancient remedy. By faithfully reproducing this remedy, the authors demonstrated that it drastically limited the growth of bacterial pathogens like *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Neisseria gonorrhoeae* *in vitro*, and/or on a mouse model of eye infection, with a reasonable safety profile⁴¹⁻⁴⁴.

The same study also showed that the mixture of ingredients in Bald's eye drops is more effective than the addition of each individual components. This imply that the combination of specific ingredients, none of which may have significant antibacterial activity, may enhance their bioactivity. It seems thus possible that some of the combinations developed by these physicians were designed through rational methods. It could therefore be possible to construct remedies of significant therapeutic potential from a combination of ingredients that exhibit no significant bioactivity as isolated components. The idea would be to consider these ingredients in the context of all or part of the remedies, rather than investigating each ingredient individually.

As a follow-up of this study, the consortium also developed a software to analyze the entire manuscript in order to highlight the most promising remedies. Groups of ingredients were revealed, some of them often used together, such as aloe vera and sarcocolla⁴⁵. Another recent computer analysis equally highlighted the recurring appearance of combinations of ingredients, like saffron and opium or fennel and celery seeds, when analyzing remedies for urinary tract diseases identified in different Arabic pharmacopeias spanning over

the course of more than 3 centuries⁴⁶. These re-occurring combinations point to a rational approach in the development of treatment remedies, where a base of certain ingredients would have been maintained and used as a framework for the design of new candidates. The same ingredients could produce synergistic activity if combined, and should deserve special attention. Thanks to these studies, it becomes more and more evident that the science of medicine in medieval times was the result of a very rational and scientific approach, far from the folkloric image it usually has. Further studies of remedies from other manuscripts and ancient practices will be required to confirm these initial hypotheses and/or to possibly allow the identification of innovative active principles from complex combinations or even unexpected materials^{35,47}.

While traditional remedies were developed from common ingredients, many remedies also contain toxic molecules, among which the most emblematic being heavy metals, such as lead, mercury, and arsenic. Reconsidering these remedies for future development requires to prove that ancient physicians perfectly mastered the use of these ingredients, took into account their toxicities, and did not take ill-considered risks concerning the health of their patients. For example, lead was widely used since antiquity to prepare make-up products (including kohl) or remedies. Two recent studies have analyzed these uses, based on makeup found in Egyptian tombs⁴⁸, and the reconstitution of a cutaneous remedy reported by Al Kindi (Table 1), from the medieval Arab period⁴⁹. These two studies demonstrated that ancient alchemists mastered the transformation of metals and were able to confer them different therapeutic potentials, depending on the transformation processes used. In the “khols” used for make-up, litharge was transformed into laurionite and phosgenite, with pro-inflammatory properties, which prevented infections⁴⁸. Reconstruction and analysis of the ancient remedy showed that alchemists produced soluble lead with anti-inflammatory properties, to promote healing⁴⁹. Moreover, the toxicity of lead was reported as early as antiquity [50]. As an anti-infective, it was mostly used cutaneously. This limited the diffusion of the metal in the body, restricting its action on the local site of infection. These precautions may therefore have changed the

benefit-risk balance of lead. Overall, the evidence suggests that ancient physicians knew about the inherent toxicity of toxic ingredients like metals, and handled carefully their use.

These few examples demonstrate that the study of the history of medicine combined with modern investigation could prove the rationality of the approaches followed by these physicians. One of the periods where this scientific approach was at its peak, both in terms of the variety of actors and of the scientific approach, was the medieval Arab period (Table 1). The methodology applied by these scientists could still be relevant today and will be explained in the following section.

The Arab medieval Golden age of medicine

Medicine was certainly the most studied and the most developed science studied in the medieval Arab world. This was the Golden Age of Arab medicine with considerable scientific contributions between the 9th and 13th centuries, *i.e.*⁵¹⁻⁵⁵. Many of the achievements of Arab-Muslim physicians were based on the legacy of Greek and Roman physicians^{51,56}. This effervescence of knowledge and intelligence then spread throughout the world and significantly influenced medical theory, surgical practice and other disciplines.

Origin of the Golden Age

Several factors led to this Golden Age, including religious support. Religion could indeed easily favor, delay, or condemn medical progresses. In this context, the guidelines of the Prophet clearly encouraged such studies. The extension of the Muslim Empire during this time also brought out an exchange of ideas from India to Iran, or Spain (Figure 2). Communication routes became safer, facilitating travel and trade. Alongside these developments, Arabic language was identified as an international one, which facilitated the exchange of scholarly ideas⁵⁴. The ancient manuscripts of greek, latin or even sanskrit⁵⁷ were translated in Arabic by the most competent scholars. Another significantly contribution to the Golden Age was the establishment of a paper mills in Baghdad (for a long time the nerve center of the Arab-Muslim world⁵⁸) to replace parchment (skin of animals) or papyrus (plant origin) by paper using linen. This enabled many people to gain access to books and develop their education⁵⁴. The most precious texts were stored in the House of Wisdom, founded in Baghdad in 1005 by the Caliph Al Mamun⁵⁶.

There were also significant advances in chemistry, where Arab alchemists became familiarized with plants and developed different techniques such as distillation, crystallization, calcination, *etc...*⁵⁴. An entire outgrowth of alchemy consisted in isolating and studying a broad spectrum of natural sources, minerals, and compounds, to discover a ‘magic elixir’ or a medical potion that would preserve people from all fatal diseases.

Likewise, in microbiology, plague and leprosy were considered as infective and contagious diseases. For example, Islamic practitioners introduced the concept of quarantining (XIth century) as a form of disease control. Hygienic methods were also implemented at the same time, in the form of proper sterilization, putting in place practices such as the use of alcohol prior to surgery and skin wounds treatment⁵⁴.

Developments also occurred in pharmacology. Practitioners became acquainted with herbs, introduced new drugs such as camphor, musk, sandalwood, developed excipients, created flavoring extracts, and experimented with poisons and antidote^{59,60}. The first pharmacy was established in Baghdad in 754. Four centuries later, the pharmacology science was separated from both

medicine and alchemy, these disciplines becoming independent (illustrated Figure 3).

Medical education and institution

Physicians during this era followed long training courses, often being six to seven years. This education comprised an initial theoretical training in sciences, followed by clinical training in hospitals. The medical practice was even governed by a code of ethics towards patients, colleagues, and the community^{61,62}.

Secular hospitals were established throughout the Arab world, starting in Damascus in 706. These hospitals were well equipped. Patient monitoring, drug development and clinical trials were reported and provided key records for the development of the scientific method⁶³.

Famous figures of the Arab medicine age

Among the era’s many prominent figures was Zakarya Al-Razi, known in Latin as Rhazes (Figure 2, Table 1), a pharmacologist and physician of Persian origin who headed the hospital founded in Baghdad⁶⁴. Zakarya Al-Razi devoted his life to medical research and became the founder of chemotherapy by using mineral drugs for external and internal use in cancers⁶⁴. Since his youth, he was interested in alchemy, and later he became the first to develop metal-chemical preparations such as

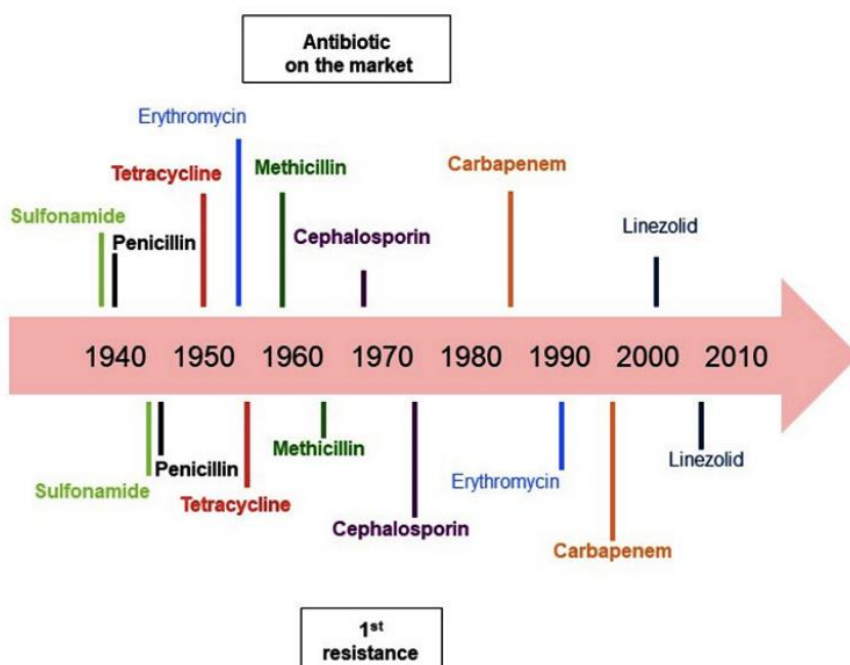


Fig. 1. A timeline of the evolution of antibiotic resistance

arsenic, copper sulfate, iron sulfate, and different forms of mercury to develop novel drugs⁶⁵. He went on to write his famous book *Al-Hawi*, a 30 volumes encyclopedia that provides a general description of disorders, fevers, plagues, and skin diseases, accompanied with a complete pharmacopeia, tables

of terminology, weights, and measures⁶⁵. He was the first to administer opium as an anesthetic after testing it on animals⁶⁴.

One of the most famous Muslim scientists is Abdu Ali Ibn Husayn ibn Abdullah Ibn Sina, also known as Avicenna (Figure 2, Table 1). Of Persian

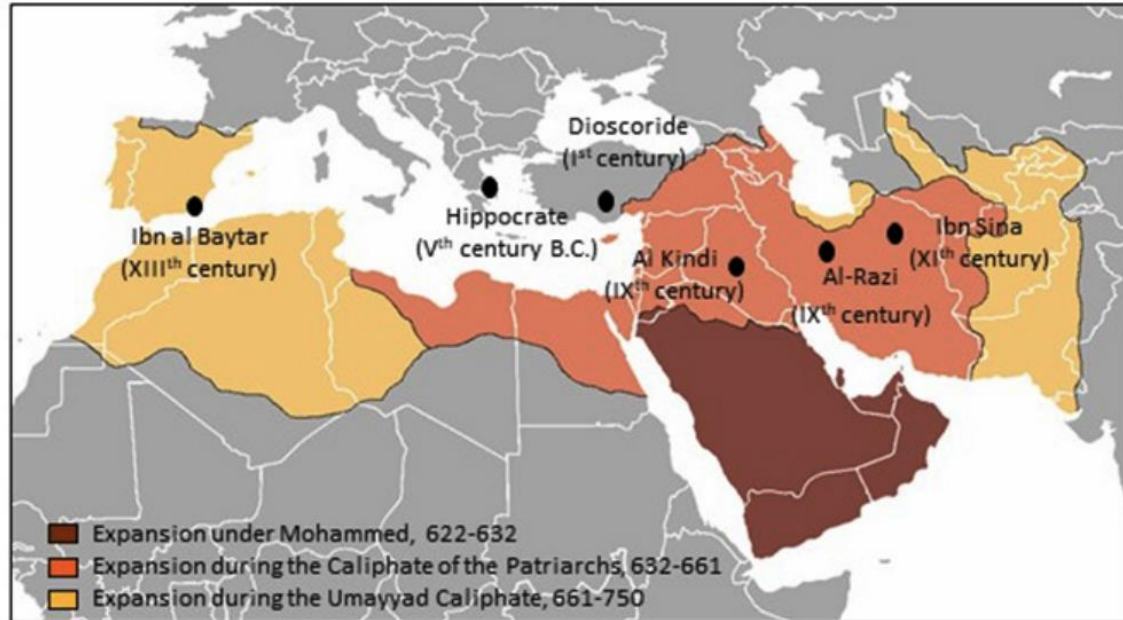


Fig. 2. A map of the Arab Empire in Medieval times. The name of famous scientists cited in the text, the time and place of birth are provided.



Fig. 3. Illustration of the preparation of a remedy. Folio from a dispersed manuscript of an Arabic translation of the *Materia Medica* of Dioscorides [56,82]

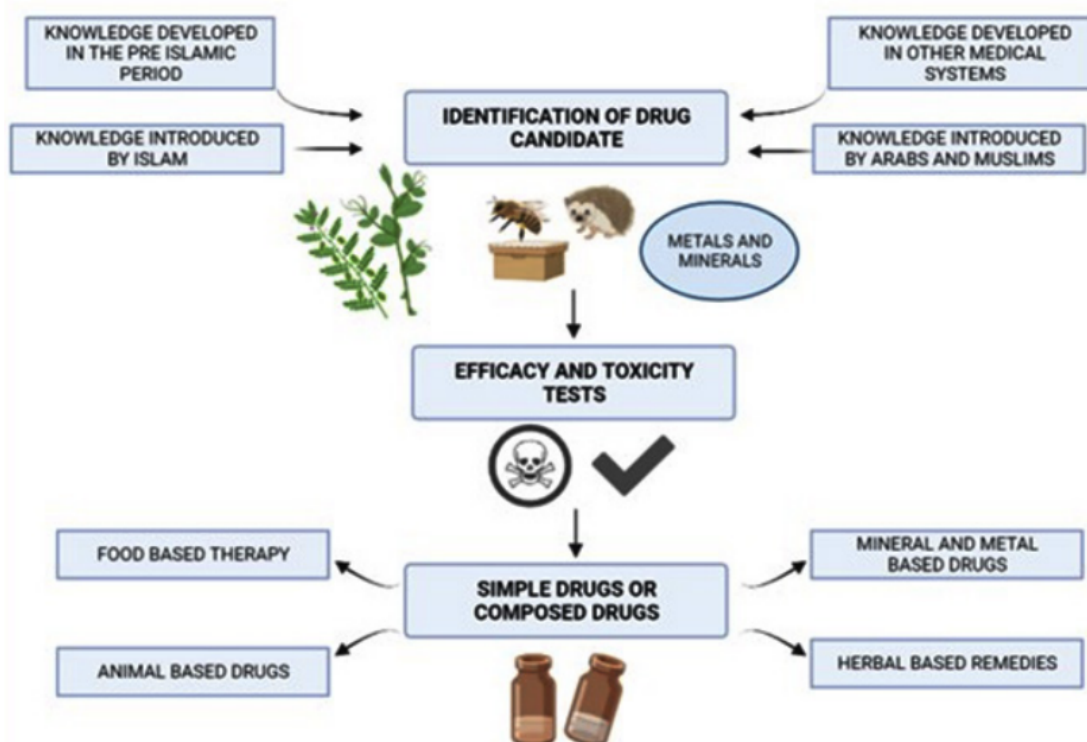


Fig. 4. Drug development process during the Arab medieval age, adapted from [74,83]

origin, from Rayy, he was known as the Prince of medicine and developed a methodological approach that would be taught in European universities until the 19th century⁶⁴. His book *Al-Qanun fi al-Tibb -Canon of Medicine-* represented the first pharmacopeia, including medicinal, chemical, and physical properties of more than 600 herbal drugs⁶⁶. In addition to these accomplishments, Avicenna was the first to describe many different microbiological diseases such as anthrax and tuberculosis, and emphasized the crucial role of hygiene and dietetics⁵⁴. He stressed the need to study new drugs before releasing them to the patients by setting rules to test their effectiveness⁶⁴.

Another interesting figure in the history of medieval science is Abu Yusuf Yaaqub Ibn Ishaq Al Kindi (Figure 2, Table 1), considered as the Father of Arab philosophy. He was interested in a many fields including metaphysics, philosophy and logic to optics and pharmacology⁶⁷. Among his many medical writings, the most reputable and well-known might well be the medical formulary "*Aqrabadhin*". This term is derived

from the Greek word for 'list'. The book details the pharmaceutical preparations derived from botanical, animals, and minerals sources, in the form of lists of medications^{67,68}. He also wrote a treatise *Risala fi ma' rifat quwwat al-adwiya al-murakkaba*, translated as *De gradibus*, and exploited mathematical rules to quantify the strength of drugs⁶⁹.

Diya al-Din Abu Muhammad Abdallah Ibn Ahmad Ibn al Baytar (Figure 2, Table 1) is another famous Arab scientist, a Muslim botanist and pharmacologist of the Medieval era. His knowledge and passion for natural sciences was inspired by his father Ahmad Ibn Abd-al Malik⁷⁰. He studied the Galenic pharmacopeia, based on the identification of the active principles of medicinal plant extracts. His most accomplished work, entitled, *Kitab al-Gami' li-mufradat al-adwiya wa-l-agdiya* translated as 'Collection of simple remedies and food'⁶⁹ is considered as his seminal work. It was based on Dioscorides, Galien, Al-Razi and Ibn Sina, on which he applied his own observations and corrections and mentioned simple

Table 1. Glossary of terms and names used in the review

Family term	Name	Description
Infection	Present definition	Development in a living being of micro-organisms that can cause injury by multiplying and possibly secreting toxins or spreading through the bloodstream
	Past definition	Infections are described by the symptoms they cause. Their description should inform us on the nature of the infection with today standards. This usually demands a broad-ranging, interdisciplinary approach, to study the manuscript, understand the description of the disease, symptoms, the curative ingredients and infer from these descriptions a plausible causing agent, that is not without difficulties [84-86].
Professionals	Physician	A person able to practise medicine, from diagnosis to treatment (except surgery)
	Alchemist	A person who practises alchemy, the medieval forerunner of chemistry, concerned with the transformation or transmutation of matter, through distillation, crystallization
	Pharmacist	A person who can prepare and sell certain drugs by prescription only. They were aware of the importance of raw materials, botanic and the importance of the preparation protocol precision
	scholar	A person who is highly educated or has an aptitude for studying.
Time period	Antiquity	30th century BC -5th century
	Medieval time	5-15th century
	Arab medical golden age	9-13th century
Famous figures	Hippocrate	Born around 460 BC in Cos and died in 377 BC in Larissa, was a Greek physician of the Periclean century, but also a philosopher, traditionally considered as the father of medicine
	Dioscorides	Born between 20-40 in Anazarbe and died around 90. He was a Greek physician, pharmacologist and botanist whose work was a major source of knowledge about plant, animal or mineral based remedies during the 1500s. He is the author of the treatise 'De materia medica'.
	Zakarya Al-Razi	Born in 865 in the town of Clay, died around 925 in Tehran was a Persian multidisciplinary scholar who made important contributions to medicine, alchemy and philosophy
	Abu Yusuf Yaaqub Ibn Ishaq Al Kindi	Born in 801 in the town of Koufan, died in 873 in Bagdad. As an encyclopedic mind, he sought to synthesize, organize and evaluate all the knowledge of his time (philosophy, mathematics, astronomy, physics, chemistry, technology...)
	Abdu Ali Ibn Husayn Ibn Abdullah Ibn Sina	born in 980 in Ravi, died in 1037 in Hamadan, philosopher and physician, author of reference works in medicine and philosophy

	Diya al-Din Abu Muhammad Abdallah Ibn Ahmad Ibn al Baytar	born around 1197 in the province of Malaga and died in 1248 in Damascus, an Arab-Andalusian physician, who published several works in which he brought together the pharmaceutical knowledge of his time
Remedies	collyrae from the Bald's Leechbook	Make an eye salve against a wen: take equal amounts of an Allium species and garlic, take equal amounts of wine and ox gall, mix with the alliums, put in a brass vessel, let stand for nine nights, clarify well, put in a horn and at night apply to the eye with a feather [44]
	Lead-based cutaneous remedy from Al Kindi.	1 part of quicklime (CaO) and 1 part of litharge (PbO) are passed through a clay. They are covered with wine vinegar. Olive oil is added and also sheep fat. It is boiled together and stirred with a rod until it is mixed and almost black. The heating is renewed until the viscosity is like thick honey [49]

nutrients and about 1400 drugs based on plants, animals, and mineral⁷⁰.

Drug development during the Arab Medieval ages

During the Medieval ages, Arabs significantly contributed to health and medicine. During this time, the use of drugs still relied upon scientific hypotheses introduced by the Greeks, related to 'the theory of bodily humors'. Essentially, this theory states that humans fall sick due to imbalances of bodily humors⁷¹. Hippocrates (Figure 2, Table 1) stated that the human body is made up of four substances: yellow bile, black bile, water, and blood. Arab physicians agreed with this theory⁷² and affirmed that physical and spiritual wellbeing was essential, and that a disease should be viewed as an opportunity to purify and balance emotional and physical feelings through rest, healthy food, breathing fresh air, and practicing proper hygiene⁷³. Even if this theory was proven incorrect, the development of drugs still adhered to scientific standards, and was further framed by ethical rules⁷⁴.

The origin of drug development was founded on the accumulated knowledge from pre-Islamic periods, such as that of the Egyptian or Chinese medical systems, even if the Greek and Roman legacies still remained the basis of the developed knowledge throughout the Arab Medieval ages. Arab physicians improved this knowledge, and enhanced the concept of trials which is at the core of the scientific approach

used today. Once a remedy was identified, either based on plants, animals, metals and/or minerals, its efficiency and toxicity was tested. Then, the administered remedy could be either a simple diet, a simple drug based on plants, minerals and metals, or a mixture of one or more of the aforementioned (Figure 4)^{74,75}.

Ibn Sina extensively studied the nature and qualities of simple drugs in vol. 2 of the *Canon*. He then set rules to respect in the drug development process. This remained the basis of testing drugs⁷⁴:

- The drug must be cleaned from any foreign substances/impurities.
- Drugs must be tested on two different diseases to be sure of the effects.
- The mechanism of action must be evaluated.
- The drug must be tested on animals and then on human, to prove their efficacy.

Altogether, the Arab physicians developed a scientific method based on experimentation, evidence-based knowledge, clinical trials, animal and/or human trials, concepts that are also found in the contemporary scientific method.

CONCLUSIONS

Health care systems have always been deeply embedded in economic, religious, and societal beliefs, and are therefore the reflection of their perspective eras. When the era is religious, an inter-relationship between medicine and belief is widely found, through different forms, disturbing

the perception and relevance of the medical and pharmacological advances of these periods. Nonetheless, these inter-relations did not prevent the rational development of medicine. All great civilizations developed a wisdom, an art of health and healing that is, empirically solid with proofs of effectiveness. It is this rationality that encourages to re-investigate ancient practices and pharmacopeias. Modern technological advances may enable to re-exploit these ancient remedies more easily [76–78].

The greatest benefit of history is its ability to integrate past and present knowledge to improve future understanding. Since ancient times, plants, insects, animals, minerals, turned out to be an exceptional source of bioactive molecules: they have already provided humans with new first-class remedies [79]. In comparison to isolated ingredients, these pharmacopeias provide remedies with synergistic combination of action. These remedies have enhanced therapeutic effects through the combination of ingredients that would be of little medicinal interest if isolated. These studies are nevertheless complex and require the establishment of important interdisciplinary networks, including history, biology, chemistry and pharmacology. Recognition of these networks and the valorization of their added value remain a challenge.

The Arabic Golden Age was an important period in the history of ancient medicines and paved the foundations for a modern scientific approach. Their knowledge largely inspired Western medicine from the Middle Ages to the Renaissance. The numerous manuscripts found allowed to collect a large amount of information on medical practices and pharmacopeias, and to follow these practices in time and space. By focusing mainly on remedies preserved over a wide geographical or temporal scale, ingredients of interest with the highest potential may be selected.

This approach is well suited for the search of antibacterial solutions, in the context of bacterial resistance to antibiotics. Infections were a daily concern in the Middle Ages, and the solutions proposed were numerous: we thus have access to a vast repertoire of potential solutions. These ancient pharmacopeias contain a vast array of information on both innovative molecules and synergistic strategies making it more difficult for bacteria to develop resistance, while potentially

reducing the impact on the surrounding microbiota (bactericidal molecules taken individually being less deleterious). Thus, history holds a vast repertoire of remedies that might lead to medical innovation. In addition, some ancient remedies preserved throughout history, are still utilized today in the traditional Arab pharmacopeia. If their efficacy could be validated historically and by using today's scientific methodology, they could even be adopted in the context of integrated healthcare.

Medical systems are constantly evolving. Novel medical systems are introduced when an old is challenged. This evolution often results in an interweaving of innovations and old practices, although the integration of ancient practices usually comes with parsimony or defiance [80]. This has always been the case, and is still true today, a time when we are witnessing a crisis in health care related to inadequate delivery and adaptation to changing patient expectations. This crisis amplifies the growing demand for complementary and alternative medicines, which have their origins in ancient and/or traditional practices. This is reflected in the growing number of patients (over 70% according to the WHO) who are already turning to these practices. Despite the complementarity between modern and traditional medicines, it is their connection that seems to be problematic today. The differences in the way health and pathology are defined, studied and perceived, could also be at the source of the difficulties in uniting them. Therefore, it is imperative to study the cultures and societies that laid the foundations of ancient medicine [81]. Characterizing the scientific approach by which medicine and pharmacopeias were developed, and understanding how the different health systems have intertwined with each other over time could help to rationalize the debate, and ultimately, why not, lay the foundations for a modern conception of a common medicine?

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Cody Bowens for critical reading of the manuscript and Mutale Joan Chanda for her diligent proofreading of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This project was financially supported by the French Ministry of Europe and Foreign Affairs, Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the French Institute of Rabat (PHC TOUBKAL 2019, Grant Number: 41520SE; PHC MAGHREB 2022 Grant No 47455NH; by the University of Strasbourg (projet Interdisciplinaire - Emergence) Grant Number CF/PN/CB/N°2017-974-3, and by the program METALLO-MIX of CNRS - Grant Number 21887. B. Abdallah was financed by the Mascir Foundation (Rabat), and by the PHC TOUBKAL.

REFERENCES

- Pan S-Y, Litscher G, Gao S-H, Zhou S-F, Yu Z-L, Chen H-Q, *et al.* 2014. Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 525340.
- Porras G, Chassagne F, Lyles JT, Marquez L, Dettweiler M, Salam AM, *et al.* 2021. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chem Rev* 121: 3495–3560.
- Krishnaprabu DS. 2020. Therapeutic potential of medicinal plants: A review. *J Pharmacogn Phytochem* 9: 2228–2233.
- Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P. 2010. Therapeutic Potential of Plants as Antimicrobials for Drug Discovery. *Evid Based Complement Alternat Med* 7: 283–294.
- Dal Cero M, Saller R, Weckerle CS. 2014. The use of the local flora in Switzerland: A comparison of past and recent medicinal plant knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 151: 253–264.
- Lardos A, Heinrich M. 2013. Continuity and change in medicinal plant use: The example of monasteries on Cyprus and historical iatrosophia texts. *Journal of Ethnopharmacology* 150: 202–214.
- Staub PO, Casu L, Leonti M. 2016. Back to the roots: A quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (ex Matthioli, 1568). *Phytomedicine* 23: 1043–1052.
- Touwaide A, Appetiti E. 2013. Knowledge of Eastern materia medica (Indian and Chinese) in pre-modern Mediterranean medical traditions: A study in comparative historical ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 148: 361–378.
- Harrison F, Connelly E. 2019. *Could Medieval Medicine Help the Fight Against Antimicrobial Resistance?* De Gruyter.
- Caiazza I. 2019. Le mélange et la complexion chez les médecins du XIIe siècle. *De l'homme, de la nature et du monde.* 225–240.
- Zhou X, Seto SW, Chang D, Kiat H, Razmovski-Naumovski V, Chan K, *et al.* 2016. Synergistic Effects of Chinese Herbal Medicine: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Front Pharmacol* 7: 201.
- Yarnell E. 2015. Synergy in Herbal Medicines. *Journal of Restorative Medicine* 4: 60.
- Christie VM. 1991. A dialogue between practitioners of alternative (traditional) medicine and modern (western) medicine in Norway. *Social Science & Medicine* 32: 549–552.
- Drakulich A. 2018. Challenges Faced When Implementing an Integrative Care Model. Available from <https://www.practicalpainmanagement.com/meeting-summary/challenges-faced-when-implementing-integrative-care-model>. Accessed Jul. 27, 2022.
- Inserm pressroom. 2020. Artemisia miracle plant, really? Available from <https://presse.inserm.fr/en/artemisia-miracle-plant-really/40111/>. Accessed Jul. 27, 2022.
- Lampiao F, Chisaka J, Clements C. 2019. Communication Between Traditional Medical Practitioners and Western Medical Professionals. *Frontiers in Sociology* 4.
- Roth AD. 2016. A Dialogue on Traditional Medicine: East Meets West. *China Media Research* 12: 58–92.
- Gaynes R. 2017. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis* 23: 849–853.
- Ligon BL. 2004. Penicillin: its discovery and early development. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15: 52–57.
- Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, *et al.* 2021. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 771510.
- Llor C, Bjerrum L. 2014. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* 5: 229–241.
- McEwen SA, Collignon PJ. 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6.
- Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 2: 641–644.
- Lobanovska M, Pilla G. 2017. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons

- for the Future? *Yale J Biol Med* 90: 135–145.
25. Damrosch DS. 1946. Chemoprophylaxis and sulfonamide resistant streptococci. *J Am Med Assoc* 130: 124–128.
 26. Hamburger M, Mattman LH. 1946. Susceptibility to sulfadiazine of hemolytic streptococci recovered in Army camps. *Am J Med* 1: 23–27.
 27. Sköld O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* 3: 155–160.
 28. Crofton J, Mitchison DA. 1948. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J* 2: 1009–1015.
 29. Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 27: 87–115.
 30. Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122–S129.
 31. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, *et al.* 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399: 629–655.
 32. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. 2014. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front Public Health* 2: 145.
 33. Al-Snafi AE. 2015. Therapeutic properties of the medicinal plants: a review of their antibacterial activity (Part 1). *International Journal of Pharmacy Review & Research* 5: 328–337.
 34. Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR. 1980. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* 209: 1532–1534.
 35. Behroozian S, Svensson SL, Davies J. 2016. Kisameet Clay Exhibits Potent Antibacterial Activity against the ESKAPE Pathogens. *mBio* 7: e01842-15.
 36. Brennessel B, Drout MDC, Gravel R. 2005. A reassessment of the efficacy of Anglo-Saxon medicine. *Anglo-Saxon England* 34: 183–195.
 37. Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicioli A. 2016. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res* 192: 130–141.
 38. Gabbay GB and J. 2009. Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. Available from <https://www.eurekaselect.com/93409/article>. Accessed Oct. 26, 2020.
 39. Photos-Jones E, Keane C, Jones AX, Stamatakis M, Robertson P, Hall AJ, *et al.* 2015. Testing Dioscorides' medicinal clays for their antibacterial properties: the case of Samian Earth. *Journal of Archaeological Science* 57: 257–267.
 40. Wagner CS, De Gezelle J, Robertson M, Robertson K, Wilson M, Komarnytsky S. 2017. Antibacterial activity of medicinal plants from The Physicians of Myddvai, a 14th century Welsh medical manuscript. *J Ethnopharmacol* 203: 171–181.
 41. Anonye BO, Nweke V, Furner-Pardoe J, Gabriliska R, Rafiq A, Ukachukwu F, *et al.* 2020. The safety profile of Bald's eyesalve for the treatment of bacterial infections. *Sci Rep* 10: 17513.
 42. Fuchs AL, Weaver AJ, Triplet BP, Ammons MCB, Teintze M, Copié V. 2018. Characterization of the antibacterial activity of Bald's eyesalve against drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 13: e0208108.
 43. Furner-Pardoe J, Anonye BO, Cain R, Moat J, Ortori CA, Lee C, *et al.* 2020. Anti-biofilm efficacy of a medieval treatment for bacterial infection requires the combination of multiple ingredients. *Sci Rep* 10: 12687.
 44. Harrison F, Roberts AEL, Gabriliska R, Rumbaugh KP, Lee C, Diggle SP. 2015. A 1,000-Year-Old Antimicrobial Remedy with Antistaphylococcal Activity. *mBio* 6.
 45. Connelly E, Del Genio CI, Harrison F. 2020. Data Mining a Medieval Medical Text Reveals Patterns in Ingredient Choice That Reflect Biological Activity against Infectious Agents. *mBio* 11.
 46. Braud A, Dolques X, Fechter P, Lachiche N, Ber FL, Pitchon V. 2021. Analyzing the composition of remedies in ancient pharmacopeias with FCA, p 9. . Strasbourg.
 47. Pitchon V, Aubert E, Vonthron C, Fechter P. 2022. Chapter 14 - How history can help present research of new antimicrobial strategies: the case of cutaneous infections' remedies containing metals from the Middle Age Arabic pharmacopeia, pp 459–478, In Chassagne F (ed.), *Medicinal Plants as Anti-Infectives*. . Academic Press.
 48. Tapsoba I, Arbault S, Walter P, Amatore C. 2010. Finding Out Egyptian Gods' Secret Using Analytical Chemistry: Biomedical Properties of Egyptian Black Makeup Revealed by Amperometry at Single Cells. *Anal. Chem.* 82: 457–460.
 49. Abdallah B, Seguin C, Aubert E, Ait BenHassou H, Sbabou L, Choulier L, *et al.* 2022. Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 71: 126926.
 50. Lanoë C. 2002. La céruse dans la fabrication

- des cosmétiques sous l'Ancien Régime (XVIe-XVIIIe siècles). *Techniques & Culture. Revue semestrielle d'anthropologie des techniques*.
51. Ahmed S, Hasan M. 2016. Muslim heritage in medicine: A concise review on Greco-Arabic contribution. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5: 273–283.
 52. Anawati GC 1905-1994. 1974. Les Médicaments De L'Oeil Chez Hunayn Ibn Ishāq. *Arabica* 21: 232.
 53. Bachour HT. 2002. The Contributions Of Arabs Physicians in Dermatology. *JISHIM* 2: 43–45.
 54. Falagas ME, Zarkadoulia EA, Samonis G. 2006. Arab science in the golden age (750–1258 C.E.) and today. *The FASEB Journal* 20: 1581–1586.
 55. Théodoridès J. 1955. La Parasitologie et la Zoologie dans l'œuvre d'Avenzoar. *Revue d'histoire des sciences* 8: 137–145.
 56. Hajar R. 2013. The Air of History Part III: The Golden Age in Arab Islamic Medicine An Introduction. *Heart Views* 14: 43–46.
 57. Kahl O. 2019. On the Transmission of Indian Medical Texts to the Arabs in the Early Middle Ages. *Arabica* 66: 82–97.
 58. Hannawi AA. 2012. The Role of the Arabs in the Introduction of Paper into Europe. *MELA Notes* 14–29.
 59. Bos G, Käs F, eds. 2021. *Ibn al-Jazzâr's Zâd al-musâfir wa-qût al-%â ir. Provisions for the Traveller and Nourishment for the Sedentary: Book I&II*. Brill.
 60. Hooper D, Field H. 1937. *Useful plants and drugs of Iran and Iraq / by David Hooper. With notes by Henry Field*. Chicago,.
 61. Haddad FS. 1993. Arab contribution to medicine. *Bull Soc Liban Hist Med* 21–33.
 62. Pitchon V. 2016. To feed and to care according to the dietetics orinciples: preparation and distribution of food and medicine in an Arabic hospital during the medieval period. *Food and History* 14: 13–33.
 63. Kahl O. 2004. Fragments of an anonymous old dispensatory in ar-Razi's Kitab al-Şawi. *Journal of Semitic studies* 49: 289.
 64. Masic I, Skrbo A, Naser N, Tandir S, Zunic L, Medjedovic S, *et al.* 2017. Contribution of Arabic Medicine and Pharmacy to the Development of Health Care Protection in Bosnia and Herzegovina - the First Part. *Med Arch* 71: 364–372.
 65. Behbehani AM. 1984. Rhazes: The Original Portrayer of Smallpox. *JAMA* 252: 3156.
 66. Colgan R. 2012. *Advice to the Healer: On the Art of Caring*. 2nd ed. 2013 edition. Springer, New York.
 67. Pioreschi P. 2002. Al-Kindi, A Precursor Of The Scientific Revolution. *JISHIM* 2: 17–20.
 68. Erdemir AD. 2018. Abu Yusuf Yaquub ibn Ishaq ibn al-Sabbah al-Kindi (Alkindi, Alchindi)'nin (803-873) Ýslam Týp Tarihindeki Yeri ve Bazý Orijinal Sonuçlar. *Türkiye Klinikleri J Med Ethics* 26: 23–34.
 69. Ahmed, O, Moulay, S. 2004. *L'apport scientifique arabe à travers les grandes figures de l'époque classique*. Unesco.
 70. Cabo Gonzalez AM, Lanly C. 1997. Ibn al-Baytâr et ses apports à la botanique et à la pharmacologie dans le Kitâb al-Ðâmî. *Médiévales* 16: 23–39.
 71. Kalachanis K, Michailidis IE. 2015. The Hippocratic View on Humors and Human Temperament. *European Journal of Social Behaviour* 2: 1–5.
 72. Ormos I. 1987. The theory of humours in Islam (Avicenna). *Quaderni di Studi Arabi* 5/6: 601–607.
 73. AlRawi SN, Fetters MD. 2019. Traditional Arabic and Islamic Medicine Primary Methods in Applied Therapy. *GJHS* 11: 73.
 74. Saad B, Said O. 2011. *Greco arb and islamic herbal medicine*. Wiley.
 75. Saad B, JadAllah R, DaraghmeH H, Said O. 2009. Medicine and methods of therapy in teh arab and islamic world. Available from <https://www.aaup.edu/publication/harbi.darghmeh/article/medicines-and-methods-therapy-arab-and-islamic-world>. Accessed Jul. 26, 2022.
 76. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. 2015. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* 14: 111–129.
 77. Qaraghuli MMA, Alzahrani AR, Niwasabutra K, Obeid MA, Ferro VA. 2017. Where Traditional Drug Discovery Meets Modern Technology in the Quest for New Drugs. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics* 2: 1061.
 78. Salam AM, Quave CL. 2018. Opportunities for plant natural products in infection control. *Curr. Opin. Microbiol.* 45: 189–194.
 79. Veeresham C. 2012. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Technol Res* 3: 200–201.
 80. Petri RP, Delgado RE, McConnel K. 2015. Historical and Cultural Perspectives on Integrative Medicine | Medical Acupuncture. *Medical Acupuncture* 27: 309–317.
 81. Green MH. 2009. Integrative Medicine: Incorporating Medicine and Health into the Canon of Medieval European History. *History Compass* 7: 1218–1245.
 82. Dioscorides Pedanius, Osbaldeston TA, Wood RPA. 2000. *De materia medica: being an herbal with many other medicinal materials: written in*

- Greek in the first century of the common era: a new indexed version in modern English.* IBIDIS, Johannesburg.
83. Ahmed S, Siddiqui MUA, Mallick IA, Hasan MM. 2021. Zootherapeutics (Animal-based remedies) for urolithiasis: History, current scenario and future dimensions. *J Pharmacogn Phytochem* 10: 08–11.
84. Crawford S, Lee C. 2014. *Social dimensions of medieval disease and disability / edited by Sally Crawford, Christina Lee.* Archaeopress, Oxford, England.
85. Müller R, Roberts CA, Brown TA. 2015. Complications in the study of ancient tuberculosis: non-specificity of IS6110 PCRs. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research* 1: 1–8.
86. Tu Y. 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* 17: 1217–1220.

2. Études des thérapies naturelles sélectionnées

Depuis des millénaires, l'homme utilisait des produits naturels à sa disposition afin de soulager ses souffrances. En collaboration avec le Dr. V. Pitchon, le premier objectif était de retrouver à travers des manuscrits anciens des préparations pour lutter contre des symptômes qui pourraient être reliés à des infections bactériennes : la toux, des affections urinaires, cutanées, ou respiratoires. A partir de 4 pharmacopées, une centaine de préparations a ainsi pu être identifiée, dont une vingtaine contre des affections cutanées (furoncles, abcès...) ¹⁵⁶. Ces dernières préparations contenaient très souvent des métaux. Nous nous sommes intéressés à ces derniers remèdes, les combinaisons plantes-métaux étant l'un de nos critères de sélection. En effet, les métaux étaient souvent utilisés en deuxième intention, lorsque les préparations à base de plantes seules ne suffisaient pas. Et donc elles pouvaient potentiellement être plus efficaces. Cette démarche est précisée dans les revues Pitchon *et al* (2022) ¹⁵⁶, et Abdallah *et al* (2023) ¹⁵⁵.

Les scientifiques Arabes ont montré leur grand intérêt à l'étude de la peau qui représente un élément particulier du corps humain, car elle remplit plusieurs fonctions importantes pour le maintien de la santé ¹⁵⁶. Elle est considérée comme la première barrière de protection du corps contre les agressions externes, telles que les rayons UV, les bactéries... Trois classifications ont été établies pour ce domaine d'étude ¹⁵⁶. Les tumeurs, les ulcères, les pustules, la lèpre et d'autres infections sont considérées comme des troubles internes et sont incluses dans la première catégorie. La deuxième ne concerne que les infections cutanées comme le vitiligo et autres. La troisième catégorie comprend les maladies affectant les appendices de la peau, comme les cheveux et les ongles, et est organisée selon un système unique connu sous le nom de *Al-Zina*, parfois appelé cosmétologie ¹⁵⁶.

Deux préparations ont été sélectionnées sur la récurrence de l'utilisation de leur ingrédient. La 1^{ère} préparation est simple, composée essentiellement de métaux. La 2^{ème} est plus complexe puisqu'elle combine plantes et métaux. Ces deux préparations ont été décrites par Al-Kindi, un médecin du IX^{ème} siècle ¹⁵⁷. La sélection de ces deux remèdes devait répondre à plusieurs critères ; les traitements devaient cibler des symptômes d'origine bactériennes (comme la toux, infections cutanées, infections urinaires...), et contenir au moins un élément métallique. Les plantes devaient être les plus fréquemment utilisées dans les pharmacopées étudiées.

2.1. Introduction à l'article 1 : Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential

Les métaux jouent un rôle crucial en tant qu'éléments essentiels. Ils ont été utilisés depuis l'Antiquité en tant qu'agents antimicrobiens, prescrits lorsque les remèdes à base de plantes se révélaient inefficaces. Ces remèdes anciens pourraient cacher des secrets prometteurs pouvant conduire à la découverte de nouvelles combinaisons thérapeutiques intéressantes.

L'objectif de ce premier travail était de mettre en place la méthodologie d'étude, et d'entamer nos études sur l'intérêt des métaux dans des préparations contre des symptômes cutanés. La source de cette étude est un manuscrit écrit en langue arabe il y a plus de 1000 ans par Al-Kindi (IXe siècle). Depuis, la langue, le nom des ingrédients, la manière de décrire le protocole... ont évolué. C'est la raison pour laquelle nous sommes intéressés en premier lieu à une préparation 'simple', ne contenant pas de plantes. L'objectif n'est pas forcément de valider une pratique ancienne, notamment lorsqu'il s'agit d'utiliser des métaux comme le plomb, mais d'en tirer des leçons pour concevoir des stratégies antibactériennes innovantes et/ou pour comprendre la pratique médicale ancienne.

Pour atteindre cet objectif, nous avons reproduit le 1^{er} remède composé essentiellement de métaux : le plomb et la chaux. Le tableau 8 décrit la composition du remède. Nous avons analysé le rôle de chaque ingrédient. Puis, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice contre trois bactéries pathogènes ; *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Enfin, nous avons étudié les effets toxiques et inflammatoires du remède sur les macrophages murins.

Tableau 8 : Composition de la préparation du remède 1 sélectionné.

Préparation 1	Quantité
Chaux tamisée (CaO)	1 part
Litharge (PbO)	1 part
Vinaigre du vin	
Huile d'olive	
Graisse de mouton	

La préparation de ce remède est décrite comme suit dans le texte d'Al-Kindi (après traduction) : « La préparation de ce remède est considérée comme efficace et éprouvée. Elle nécessite 1 part de chaux vive et 1 part de litharge, chacune d'entre elles étant soigneusement filtrée dans de l'argile. Les deux substances sont ensuite imprégnées du meilleur vinaigre de vin.

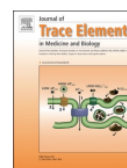
On ajoute ensuite une quantité suffisante d'huile d'olive et de graisse de mouton, dans une mesure équivalente à la moitié de chaque ingrédient. Le mélange est bouilli et remué avec une baguette jusqu'à ce qu'il soit bien mélangé et presque noir. Ensuite, on le laisse reposer. On réchauffe ensuite le mélange jusqu'à ce qu'il atteigne une viscosité similaire à celle du miel épais. Enfin, on applique ce remède sur la plaie. Cette préparation a été testée et est considérée comme efficace avec l'aide de Dieu ».

Le fruit de ce travail a été publié : Basma Abdallah, Cendrine Seguin, Elora Aubert, Hassan Ait Benhassou, Laila Sbabou, Laurence Choulier, Catherine Vonthron, Isabelle J. Schalk, Gaetan L.A. Mislin, Sylvie Fournel, Véronique Pitchon, Pierre Fechter (2022). *Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 126926 ¹⁵⁸.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb

Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential

Basma Abdallah^{a,b,c}, Cendrine Seguin^d, Elora Aubert^{c,e}, Hassan Ait BenHassou^a, Laila Sbabou^f, Laurence Choulier^b, Catherine Vonthron^e, Isabelle J. Schalk^c, Gaetan L.A. Mislin^c, Sylvie Fournel^d, Véronique Pitchon^{g,*}, Pierre Fechter^{c,*}

^a Medical Biotechnology Center, Moroccan Foundation for Science, Innovation & Research (MAScIR), Rabat, 10100, Morocco

^b CNRS, UMR 7021, Laboratoire de Biométrie et Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401, Illkirch, France

^c CNRS, UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg, 67400, Illkirch-Graffenstaden, France

^d CNRS, UMR 7199, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401, Illkirch, France

^e Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT) UMR CNRS 7200, LabEx Medalis, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^f Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V Agdal, Faculty of Sciences, Rabat, 10100, Morocco

^g CNRS, UMR7044, Archéologie et Histoire Ancienne: Méditerranée- Europe, MISHA, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Antimicrobial
Inflammation
Wound healing
Metals
Past pharmacopeia

ABSTRACT

Background: Metals are trace elements, vital in some instances or toxic in others. Due to this toxicity, they have been used since ancient time as antimicrobials, and prescribed when plant-only remedies were not efficient enough. These remedies could still contain secrets that may lead to the discovery of new therapeutically interesting combinations. The objective of this study was to give a proof of concept that such remedies combining metals and plants are worth studying again.

Methods: We exploited 4 medical formularies (*aqrabādīn*), from three Arab authors from the 9-12th century. We reproduced a remedy, and analyzed the role of each ingredient. We further looked for the minimum inhibitory concentration against three pathogenic bacteria, and we analyzed toxic and inflammatory effects of this remedy on macrophages.

Results: Even if plants were extensively used (almost 80 % of all ingredients), more than 36 different minerals have been found in these 4 *aqrabādīn*. When it came to remedies against infections that could be applied externally, the use of metals grew to 70 %. We focused on a remedy, containing mainly metals. We have been able to attribute a role for each ingredient, to show that this skin remedy helped to combat the infection and to resorb the wound, and to highlight the mastering of metal transformation by these physicians.

Conclusions: With a very simple recipe, mainly composed of metals, these past physicians designed a complete and synergistic remedy to combat abscesses, while restricting the toxic effect of metals to the site of infection. It is a first example showing that different metal manufactures were evolved to improve their therapeutic potentials. The knowledge acquired by these physician should deserve more attention, and unexpected features, original organo-metallic compounds or therapeutic synergy could still be found from such research.

1. Introduction

Some metals are fundamental for many cellular functions in all living organisms. About half of the proteins are dependent on metals for structure, function, electron transfer, catalysis properties [1,2]. These essential metals are lethal to any organism when present in excess, mostly due to the generation of reactive oxygen species (ROS), or their

competition with other essential metals. Furthermore, some metals like gold (Au), silver (Ag), mercury (Hg), lead (Pb), arsenic (As) are extremely poisonous to most organisms, including bacteria even at low concentration. Because of their toxicity, these metals have been used since ancient time as antimicrobial agent, to preserve food or liquid. For example, vessels made of copper (Cu) and Ag have been used for centuries to disinfect water or preserve food. Metals have also been widely

* Corresponding authors.

E-mail addresses: pitchon@unistra.fr (V. Pitchon), p.fechter@unistra.fr (P. Fechter).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126926>

Received 17 February 2021; Received in revised form 13 December 2021; Accepted 4 January 2022

Available online 5 January 2022

0946-672X/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

utilized since Antiquity in remedy, as anti-infective molecules. The Edwin Smith Papyrus, an ancient Egyptian medical text dating back to 1,600 B.C., is one of the first written works that documents the use of a Cu salt as an astringent [3,4]. Many applications of Ag in medicine have been documented, to treat gonococcal ocular infection [5], repair vaginal tears after childbirth [6], prevent infection of surgical wounds etc. Physicians have also used tellium (Te), As oxides, Cu or Hg salts to treat diseases such as leprosy, tuberculosis, gonorrhea and syphilis [7–11]. Pb has been used for centuries in remedies, food preservation, sweetening, as well as in make-up [12,13]. The use of metals has been abandoned after the discovery of penicillin by Alexander Fleming in 1920. Since then, antibiotics were preferred as they were powerful, their mode of action well described and their toxicity better handled. Certain unfortunate and inappropriate use of metals have further largely contributed to the current mistrust concerning their use in medicine [14–17]. However, the spread of resistant strains and limitations in the development of new antibiotics has led to a renewed interest in the use of metals [18]. Due to their constant use over centuries, their anti-microbial properties are proven and admitted and they could become attractive again as long as their effect on patients are scientifically validated. Studies on past use of metals could provide some valuable informations concerning their use, precautions to be taken or warning on contraindications. Indeed, even if metals were widely employed, they were neither used randomly, nor without transformation or mastering their sources, their purity and their formulation.

The Middle Age Arabic period corresponds to a golden scientific apex with crucial innovations in medicine. The knowledge of the Arab physicians was not based on a form of empiricism but anchored in a thousand-year-old theory, the theory of humor which was current until the advent of molecular medicine beginning of the 19th century. The theory of humor is a world of its own, well organized, in which everything has a place and an explanation. Numerous studies show the effectiveness of ancient drugs and this medicine was based on strong knowledge of the properties of natural elements, such as plants, minerals or animal materials made available to humans to treat their fellow human beings [19–22]. The Arabs developed an advanced system of care characterized by particularly rich and abundant sources, which exist under different types of documents including medical formularies or *aqarābādīn* listing hundreds of drug preparations (illustrated Fig. 1).

The challenge of this multidisciplinary research based on the study of ancient knowledge is to find out whether these ancient pharmacopoeias may contain solutions that could be implemented for the design of tomorrow's anti-infectious drugs.

The objective of this study was to give a proof of concept that these past physicians did not choose metals randomly, took into account their toxicity in their practises, and mastered sufficiently the transformation of these metals to confer them specific properties, depending on the disease to treat. Through a historical survey, we listed the metals used in the past, and highlighted the ones used to cure different affections referring to symptoms related to infections. By exploring this historical literature, it appeared that metals were frequently used in this pharmacopoeia for cutaneous infections and rarely ingested. We then focused on one simple remedy, an ointment that was used to cure abscesses. This remedy contained litharge (PbO), and although the choice of this metal for the development of an application nowadays seems inappropriate due to its well-known toxicity, some scientific arguments still plaid for its study as a proof of concept. Due to its wide use in the past, it may represent a good illustration of the ability of past physicians to handle the sources, the transformation, the properties, the use and the toxicity of metals. We have been able to reproduce this remedy, identified the steps important to get the ointment, and studied its biological activity by looking for its anti-bacterial properties and its effect on the inflammation system. It appeared that this simple combination of metals might enable to combat the infection, and to resorb the wound. Further, our results showed that by mastering the transformation of litharge, physicians could confer specific and different properties to metals according



Fig. 1. Text from Qanu'n, Ibn Si'na, Folio 10v, BNF, Ms Ar. 6454.

to the recommended use, and were able to restrict their toxic effects.

2. Materials and methods

2.1. Selection of sources

We exploited 4 *aqarābādīn* i.e. medical formulary, from three authors, using double editions in translated versions or Arabic-written versions. The authors of the Arabic manuscripts lived from the 9th and the beginning of the 12th century. Their biographies are briefly described hereafter:

- Sābūr ibn Sahl *aqarābādīn* exists in two versions, the small dispensary [23] which is a smaller version of an extended manuscript prepared for use by pharmacists at Adudi Hospital in Baghdad [24]. He was one of the first doctor to write a pharmacopoeia text to the intention of doctors exercising in an hospital, describing a wide variety of drugs and measures to be taken to cure ailments. He became a doctor at the court of Caliph al-Mutawakkil (847–869) and his successors until his death in 869 (date uncertain).
- Al-Kindī (800-870 A.D.) wrote an *aqarābādīn* [25] He was born at the beginning of the 9th century in Kufa. In the pharmaceutical field, for the first time he established mathematical rules to determine the final effect of a compound remedy, starting from the quantity and the degrees of quality of each ingredient, thus becoming "the father of dosage".
- Al-Tilmīdh (Baghdad, 1073 – 1165 A.D.) is a doctor of Baghdad. He was notably at the service of the Abbasid caliphs al-Muqtafi and al-Mustanjid, chief of the doctors of Baghdad, head of the hospital 'Adudi. His experience in this establishment led him to write a twenty-chapters *aqarābādīn* compiled according to the author from a number of other *aqarābādīnāt* [26].

2.2. Chemicals, bacterial strains, eucaryotic cell lines, and growth conditions

For the reproduction of the remedy, litharge (Pb^{II}O) has been

purchased from Strem Chemicals, Celite 545 from VWR Chemicals, red vinegar, olive oil, sheep fat, quicklime (CaO) from commercial market. Tobramycin was purchased from Sigma. The bacterial strains tested were *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692; *Escherichia coli* MG1655; *Staphylococcus aureus* HG001. These strains were routinely grown in LB (Difco) at 37 °C. When Succinate Medium (SM) was used (per liter: K₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, succinic acid 4 g, pH adjusted to 7.0), the bacteria were first grown overnight at 30 °C in LB broth and were then washed, re-suspended and cultured overnight at 37 °C in SM medium. The cells were then pelleted by centrifugation and re-suspended in fresh medium, and the resulting suspension was diluted to the OD₆₀₀ nm required. RAW 264.7 mouse macrophages (ATCC® TIB-71TM) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (DMEM High Glc) containing stabilized glutamine, supplemented with 5 % (v/v) of fetal bovine serum (FBS), Penicillin (1000 U/mL) and Streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C in 5 % CO₂, 95 % humidity. Media and culture supplements were from Sigma/Merck (Darmstadt, Germany). For ICP-AES, TraceMetal grade HNO₃ 67–69 % was purchased from Fischer Chemical, and element standards were purchased from CPI international.

2.3. Preparation of the remedy

10 g of celite 454 were placed in a syringe plugged with cotton. Then, 1 g of quicklime and 1 g of litharge were added. Vinegar was then poured onto the syringe until 50 mL of filtrate was obtained (as shown in Fig. 2, top), the filtrate was recovered in a round-bottom flask. 50 mL of olive oil was added as well as 4 g of sheep fat and the preparation was heated at 150 °C with a heating mantle for 1 h, then passed to the flame (Fig. 2, bottom). Depending on the experiment, one or more of the ingredients/steps could be omitted. To test the antibacterial and inflammatory properties of the preparations, we did neither heat nor added sheep fat and olive oil, to avoid testing either poorly soluble materials or aggregates that could bias the results.

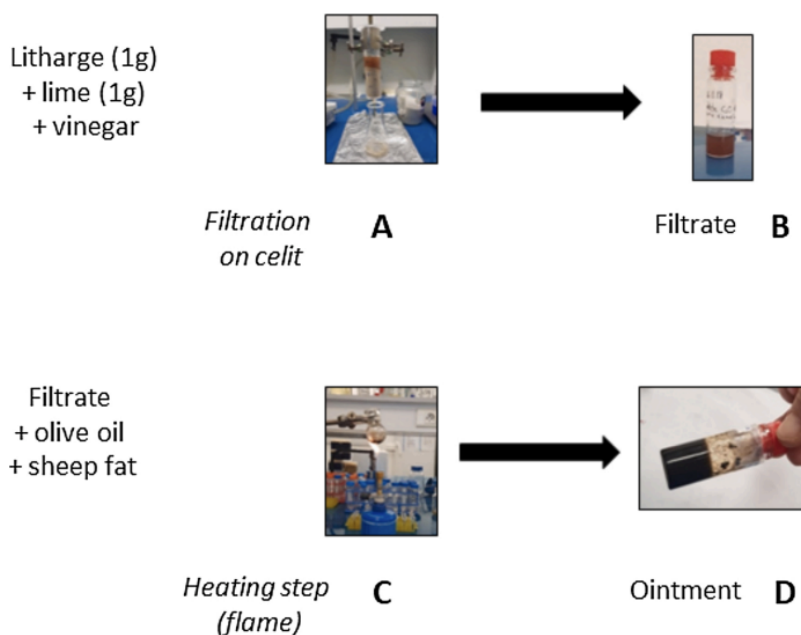


Fig. 2. Preparation of the remedy. The photos illustrate the steps to prepare the remedy, as well as its aspect. For this experiment, 1 g of quicklime and 1 g of litharge were loaded on a syringe plugged with 10 g of celite 454 (A). Vinegar was then poured onto the syringe to obtain 50 mL of filtrate (B). The filtrate was recovered in a round-bottom flask, and 50 mL of olive oil as well as 4 g of sheep fat were added. The preparation was heated first at 150 °C then passed to the flame (C) to obtain the final black ointment (D).

2.4. Metal content analysis

Samples were mineralized in closed vessels with nitric acid for trace analysis at 100 °C for 1 h. A blank test was carried out in parallel under the same conditions. The detection of 30 elements in the clear obtained solution was realized at the proper dilution by ICP-AES (Varian 720ES). Elements with a concentration above 1.5 mg/g were quantified using a multielement standard for calibration. Data were expressed as mean ± standard deviation. Student t-test were used to analyse the significance of the results. P values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

2.5. MIC calculation

To estimate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the preparations were tested in serial dilutions 1:2 or 1:3 in a round-bottomed 96 well plate (Greiner Bio-One). 100 µL of the medium used were first added to all wells. For a cascade dilution of 1:2, 100 µL of the preparation to be tested (after a preliminary dilution) was added to well 1. After mixing, 100 µL was removed and added to the following well. This step was repeated until well 10, after which 100 µL was ejected. All wells except the sterility controls were then inoculated with 100 µL of a bacterial overnight culture diluted to an optical density 600 nm (OD₆₀₀) of 0.0002, for a final OD₆₀₀ of 0.0001 in each well. Plates were then agitated overnight (~18 h) at 37 °C. Observation with MIC was made by eye and by reading of the OD₆₀₀ by an Infinite TECAN 200/M200 Pro. MIC was taken to be the lowest concentration at which bacterial growth was fully inhibited.

2.6. Disk diffusion test

300 µL of a bacterial overnight culture diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 for LB medium, or 0.05 for SM medium were spread on a Petri dish poured with the same medium. After 10 min drying, 5–20 µL of the samples to be tested was directly deposited on the dish. Dishes were finally left overnight (18 h) at 37 °C, and pictures taken.

2.7. Cell viability

2.7.1. Cell incubation

RAW264.7 (TIB-71, ATCC) are monocytes/macrophages from mouse, widely used as model cell in inflammation studies. The incubation with the preparations (passed through a 70 µm filter, Flowmi Cell Strainer) was conducted over 3 days. The first day, 50,000 cells/well were seeded with filtered preparations, concentrations ranging from 0.016 to 50 µL/mL, to a final culture medium volume of 100 µL in 96 well plate flat bottom during 24 h at 37 °C. On day 2, cells were stimulated with 50 ng/mL of lipopolysaccharides (LPS). On day 3, cells and supernatants were collected for subsequent analysis.

2.7.2. Evaluation of cell viability by MTS assays

24 h following treatment, mitochondria activity that is related to cell metabolic activity and thus cell viability was assessed using CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI). Briefly, after supernatant removal, 100 µL PBS 1X and 20 µL MTS solution were added per well. Cells were incubated at 37 °C for 40 min and absorbance was measured at 490 and 700 nm on a SAFAS spectrophotometer (SAFAS, Monaco). Cell viability was determined as the optical density ratio between sample and control cells and expressed as percent.

2.8. Inflammation evaluation

2.8.1. NO production

Concentrations of nitrogen dioxide in cell supernatants (representative of the nitric oxide produced by activated cells) were evaluated by Griess test. Briefly, 60 µL of Griess reagent (v/v mixture of 58.1 mM p-aminobenzene sulfonamide in 30 % acetic acid and 3.9 mM n-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 60 % acetic acid) were added to 40 µL of supernatant and the absorbance at 543 nm was measured and compared to a sodium nitrite standard curve.

2.8.2. TNF-α production

To determine the effects of treatment on the production of inflammatory cytokines (i.e., TNF-α), cells were cultured and treated as described in the previous section. Supernatants collected from wells of a 96-well plate were assayed using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Purified anti-mouse TNFα antibody clone 1F3F3D4 and biotinylated anti-mouse TNFα antibody clone XT3/XT22 were purchased from eBiosciences/thermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA). Avidin HRP was from Jackson (West Grove, PA, USA).

Briefly, capture antibody was diluted to 1 µg/mL in a 0.05 M pH 9.6 carbonate/bicarbonate buffer and coated 1 night at 4 °C before blocking with PBS 0.05 % Tween 20 1 % BSA (1 h, 37 °C). Samples were then diluted with PBS and incubated with capture antibody (2 h, 37 °C) before the biotinylated detection antibody diluted to 0.5 µg/mL in PBS 0.05 % Tween 20 1 % BSA was added (1 h, 37 °C). Avidin HRP was then introduced (45 min, 37 °C) and revelation was conducted by adding a solution of 1.25 mM tetramethylbenzidine and 13.05 mM H₂O₂ in 0.1 M pH 5 citrate buffer. Revelation was finally stopped by addition of 1 M HCl and absorbance was measured at 450 nm.

2.8.3. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard deviation. Mann-Whitney U tests were used to analyse the significance of the results. P values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Global analysis of materia medica in the aqrābādīnat

Arab scientists were really innovative, not only by the incorporation of new substances, simple or compound drugs, specific to the biotope of

the places where they lived, but also in methodology, the establishment of professional practices with the separation of the pharmaceutical and medical professions. The growth of the medical field and the complexity of this profession also necessitated the codification of the pharmacy and the classification of the drugs, for a better implementation of the medical practice, and a more effective application of the treatments and development of medicines and remedies.

The medical material had three origins: vegetable (nabāt), animal (min al-ḥayawn) and mineral (ma'ādīn); an analysis of the different sources showed that the distribution of substances varied only slightly (Table 1) in the aqrābādīnat as a function of time or geographical area with a percentage between 75,7 and 79,5% of the medical material which came from the vegetable kingdom, the rest being equally divided between animal origin or mineral origin.

3.2. Metals used in the aqrābādīnat

If the vegetal substances were mostly used, the sources revealed the systematic presence of simples drugs of mineral origin. We have identified 36 mineral products in the Arab pharmacopoeia (Table 2), showing that a wide variety of metals and minerals have been used for curative purposes, mainly minerals which were naturally available. We did not report clays which were also used in medicine back to antiquity [27], but which formulation is more complex. Most products were extracted from rocks in the native state. The minerals could be natural inorganic compounds but also chemical compounds extracted from deposits, produced by pyrolysis, or even transformed/synthesized. Indeed, the Arabs perfected the techniques of chemistry, evaporation, melting metals, dissolution techniques in the nitric acid, sulfuric acid, hydrochloric acid and aqua regia. Thanks to these techniques, the Arab chemists performed various mineral combinations: silver nitrate, mercury oxide, copper sulphate, alum or hydrated iron. They also used crushed precious stones, garnet, hyacinth, topaz, emerald, sapphire, eagle stone. Some pills were gilded with precious metals, including gold that had several therapeutic virtues.

3.3. Analysis of the metals used in infection care

To analyse more in details the minerals used to treat symptoms that could be related to bacterial infection, we extracted the remedies specifying three types of symptoms: the symptoms affecting the respiratory system such as cough, chest pains (chest pain, lung ulcers, infection, mucus, etc.), medications useful in the treatment of skin and mucous membrane (abscesses, pustules, ulcers, scrofula, fistulas) as well as those intended to treat urinary tract infections, since all these affections can have a bacterial origin. We have obtained a total of 92 remedies, some of which treating two of the three symptoms. These remedies were distributed as: respiratory disorders (40), skin disorders (14), and urinary disorders (38).

Of the 40 respiratory drug remedies, only 3 are found in which mineral elements are used, and in these cases a clay (containing the metal) was introduced as a binder for galenic purposes. A single cough sputum preparation contained hematite mixed with plants, scorched and powdered mussel shells, coral and amber. Among the 38 preparations intended to cure the diseases of urinary infections, most of them -35- were ingested (infusions). On the three left, one contained mercury and

Table 1
Comparison of the nature of the medical matter.

Source	Number of substances	% vegetal (%)	% animal (%)	% mineral (%)
Al-Kindi	311	79,5	9,6	10,9
Ibn Sahl	378	79,1	10,6	10,3
Ibn al-Tilmidh	433	75,7	11,3	13,0

Table 2
Mineral medicinal substances and chemical formulas (X present, - absent).

Mineral	Formula	Sabur Ibn Sahl	al-Kindi	Al-Tilmidh
Silver	Ag	X	X	X
Realgar	As ₄ S ₄	X	X	X
Orpiment	As ₂ S ₃	X	X	X
Gold	Au	X	X	X
Quicklime	CaO	X	X	X
Gypsum	CaSO ₄ ·2(H ₂ O)	X	-	-
Cadmium	Cd	X	-	X
Copper	Cu	X	-	X
Burnt copper	Cu ₂ O	X	X	X
Verdigris	Cu(OH) ₂ , CuCO ₃	X	X	X
Rust	Fe ₂ O ₃ ·3 H ₂ O	X	X	X
Haematite	α-Fe ₂ O ₃	X	X	X
Pyrite	FeS ₂	X	X	X
Marcasite ^a	FeS ₂	-	X	-
Mercury	Hg	-	X	-
Cinnabar (or vermilion)	HgS	X	-	-
Vitriol ^b	-	X	X	X
Potash	KOH	X	X	X
Alun	KAl(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O	X	X	X
Ammonium salt	NH ₄ Cl	X	X	X
Borax	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O	X	X	X
Litharge	PbO	X	X	X
White lead (ceruse)	PbCO ₃ , Pb(OH) ₂	X	X	X
Red lead (minium)	PbO ₂	X	X	X
Lead sulfide	PbS	X	-	-
Sulphur	S	X	X	X
Antimony sulphide	Sb ₂ S ₃	X	X	X
Scale (Calamine)	ZnCO ₃	X	X	-
Alkali ^c	-	-	X	X
Natron	Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O	-	X	X
Tutty	ZnO	X	X	-
Ruby	-	-	X	-
Salt	NaCl	X	X	X
Salpeter	KNO ₂	-	X	-
Lapis Lazuli	-	-	-	X

^a Another crystalline form of pyrite, slightly lighter in colour.

^b The term *vitriol* (*qualqa* in Arabic) is not equivalent to the current term for concentrated sulfuric acid but refers to various sulphates according to the color that is affixed to the name. Thus, here is the blue vitriol [copper sulphate], the green vitriol [iron sulphate and basic copper sulphate], the yellow and red vitriol [basic iron sulphate] and finally the white vitriol [zinc sulphate; alumina sulfate, or even alun].

^c It may be potash or ammonia, but it is rather a mixture of sodium carbonate and potassium obtained by slow combustion of certain plants.

another contained potash and lime. The first is applied as a clyster while the second is an enema. Altogether, except for clay or hematite, drugs containing mineral elements were not ingested, which argues in favour of a consideration of their potential toxicity. On the other hand, the treatment of skin disorders lead to a wide use of minerals since among the 14 remedies listed, 10 contained at least one mineral element. The occurrence of metals in these remedies was reported in Table 3.

Table 3
Number of occurrences of minerals present in the treatment of skin conditions.

Mineral	Occurrences
Gold (Au)	1
Silver (Ag)	1
Litharge (PbO)	2
Minium (PbO ₂)	1
Céruse (PbCO ₃ , Pb(OH) ₂)	1
Alun	1
Quicklime	1
Verdigris	5
Mercury	1

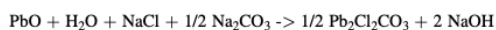
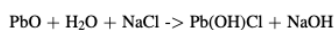
3.4. Selection of a remedy

We then focused on remedies to cure skin disorders. Copper was the most frequently used metal (5 times), followed by litharge (2 times). We followed up a remedy containing mainly metals, among them litharge (PbO) and quicklime (CaO), described by Al-Kindi. As this remedy contained few organic ingredients, and no plants, we believed it could be easier to follow the transformations imposed to these metals. Even if nowadays, Pb is only considered through its toxicity, it has been widely used in past medicines. Studying different remedies based on Pb could help to evaluate the mastery of metal used by these physicians.

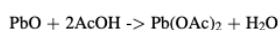
The remedy is described as followed: "It draws out what is in it, cleanses it, cicatrizes the flesh. It is good and tested: it contains 1 part of quicklime and 1 part of litharge. Each is strained well through clay. Both are covered with the best wine vinegar until they are soaked in it. Olive oil is poured on them and also sheep fat in a measure that is enough for both. It is a measure of half of each of them. It is boiled together and stirred with a rod until it is mixed and it is almost black. It is left. The heating is renewed until the viscosity is like thick gathered honey. It is applied to the wound. It is tested and good with God's help."

3.5. Metal transformation and formulation

Litharge-based compounds were widely used from the antiquity either in the formulation of make-up materials, or in remedies. We wondered whether its use in both types of application was comparable. A recent study on the chemical analysis of make up samples found in Egyptians tombs, confirmed by the reconstitution of ancient recipes, have shown that two non-natural Pb chlorides (laurionite Pb(OH)Cl and phosgenite Pb₂Cl₂CO₃) were purposely synthesized, and triggered a pro-inflammatory activity [28]. In that case, the transformation of litharge (through a process already described by Discorides) was as follow:



The description of the ointment used by Al-Kindi to cure abscesses followed a different transformation process of litharge, due to the vinegar that contains acetic acid. This process was often used in the past to solubilize litharge in Pb acetate:



It should be noted that quicklime underwent the same transformation (CaO + 2AcOH → Ca(OAc)₂ + H₂O).

Thus depending on final application, litharge could be submitted to different transformation processes. We wondered whether this differences conferred also different activities to the metals.

3.6. Reproduction of the remedy

To reproduce as faithfully as possible the remedy 1 g of quicklime (CaO) and 1 g of litharge (PbO) were loaded on a celite 545 column to reproduce the step of filtration on clay. Vinegar was then added to the column until 50 mL of filtrate was obtained. We added the same volume of olive oil as well as 4 g of sheep fat after the filtration, and heated the preparations to 150 °C, but we only got two separated phases. We obtained the viscous black ointment described when the preparation was passed to the flame (higher temperature). Fig. 2 summarizes the preparation steps and give an idea of the intermediate/final products.

To test the role of the different compounds, we prepared different versions of the remedy (named preparations), omitting sometimes one ingredient, or step... (Fig. 3).

The vinegar was essential to dissolve the litharge, as well as the quicklime in their acetate salt form. It should be noted that the filtration through celite (or any clays) that contained different salts could enable

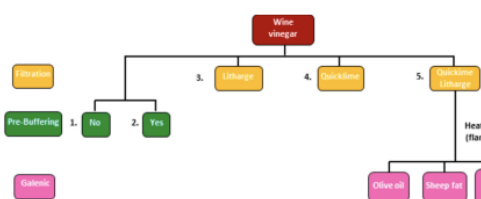


Fig. 3. Summary of the preparations tested. All preparations were filtrated through clay with wine vinegar. Control preparations (in green) were prepared only with vinegar, that was buffered before the filtration step or not. Different other preparations were studied (in yellow), for which only litharge was passed through clay with vinegar (preparation 3), only quicklime (preparation 4) or both minerals (preparation 5). The importance of olive oil, sheep fat or heating step for galenic purposes (pink) was also assessed through preparations lacking one of these ingredient/step. The numbers refer to preparations that will serve to study the biological activities. The details of the preparations are depicted in 2.3 and 3.6. When required, statistical tests were used to assess the results and significance of the comparison (see Sections 2.4, 2.8.3).

the formation of different lead or calcium salts, by exchange between acetate and other counter-ions. The final formulary contained thus lead and calcium salts, vinegar, olive oil and sheep fat. The efficacy of metal solubilisation by vinegar was assessed by analyzing the metal content through ICP-AES. Pb was at a concentration of 10 mM ($\pm 15\%$) in the solution recovered after filtration (50 mL recovered), yielding 10 % of the initial litharge deposited on the clay. Ca was better solubilized, as almost 50 mM ($\pm 15\%$) were recovered. The quicklime enabled to buffer the preparation, increasing the pH from 3 to 4 to 6. The clay was used to filtrate the product, so that litharge/quicklime were prevented from ending up in the final product. The olive oil, sheep fat and heating step were indispensable to get the black ointment consistency described by Al-Kindi. Omitting one of these ingredient/step did not allow the obtention of the ointment. They thus have a galenic function. Since the ointment was not soluble, and thus its activity difficult to test, we only analysed the biological activity of preparations without olive oil and sheep fat.

3.7. Trace metal content

We further measured the concentration of several metals (biologic or toxic) and analysed their variation among some preparations (preparations containing either litharge (3), quicklime (4), both (5) or neither ingredient (2) (Fig. 5) by ACP-AES. While as expected, Ca was more concentrated in preparations 4 and 5, and Pb more concentrated in preparations 3 and 5, some other metals (either toxic like Al or non toxic as K, Mg, Na, Zn) have been significantly found in higher concentrations in the preparation 3 than in the others, according to Student T-test statistical analysis. This may be explained by the acidity of preparation 3 leading to a better solubilization of different metals present in the celite, and thus higher concentrations in the eluate.

3.8. Antibacterial activity

The antibacterial activity of the preparation obtained was tested on three different pathogenic bacteria, belonging to the ESKAPE group of alarming pathogens for their resistance to antibiotics: the gram positive *Staphylococcus aureus*, the gram negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Two methods were used to assess the antibacterial activity, based on solid or liquid LB media. Different preparations were tested, which were prepared either without quicklime or litharge (Fig. 3) to study their antibacterial effect. We further performed control experiments only with vinegar, to dissociate the role of the Pb or Ca salts (obtained after filtration on clay with vinegar in preparations 3 and 4 respectively), to that of vinegar alone (Fig. 3). Two control preparations

of vinegar were used, either vinegar passed through clay (control 1) as a control for the acidic preparation 3 (pH 3–4), or buffered vinegar passed through clay (control 2) as a control for the preparation 4 or 5 (pH 6). As a positive control, we also exposed the bacteria to 10 μ L of tobramycin (0.1 μ g/mL; Fig. 4, positive control). We loaded 10 μ L of preparations on plates (Fig. 4). Beside the central plot, which corresponds to some precipitation of the preparations once deposited on the plate (metals are usually only partly soluble in physiological conditions), a hole in the bacterial plate reflected the antibacterial activity of the preparation. When comparing the preparation 3 (Fig. 4, spots 3) to that of the vinegar control 1 (Fig. 4, spots 1), both carried a similar antibacterial activity, meaning that Pb salts contained in preparation 3 had probably no antibacterial activity by itself. The preparation 4 (Fig. 4, spots 4), however, showed an antibacterial activity when compared to that of the buffered vinegar control 2 (Fig. 4, spots 2), showing that the Ca salts contained in preparation 4 carry an antibacterial activity. The preparation 5, containing both Pb and Ca salts, (Fig. 4, spots 5) did not greatly improve the effect on bacteria as compared to that of preparation 4 (Fig. 4, spots 4). Thus, the antibacterial activity of the remedy, as far as we can test, relied most probably on Ca salts.

Since the different version of the remedy partly precipitated on the plates, it was important to test these fractions in liquid, at lower initial concentration, that could minor this adverse effect. We then tested the antibacterial properties of the preparations in liquid (in 96-well plates), by following the growth of the bacteria in the presence of serial dilution of the different preparations. As long as the concentration of the preparations were lethal for the bacteria, they did not grow. The concentration used in the last well in which the bacteria did not grow gave the Minimum Inhibitory Concentration (MIC, Table 4). When the dilution was more important, the preparations were not able to inhibit bacterial growth anymore. The MIC of the preparation 3 was pretty similar to that of vinegar control 1, for the three bacteria, that confirmed the weak antibacterial activity of Pb salts. The preparations 4 containing Ca salts, on the opposite, triggered an antibacterial activity (MIC = 15 μ L/mL, *e.i.* 15 μ L of preparation diluted in 1 mL of medium), which was absent when buffered vinegar control 2 was tested. As for the plate, the preparation 5 containing Pb and Ca salts did almost not improve the activity of preparation 4. Altogether, whether tested on plate or in liquid, the remedies gave similar results; the absence of bactericidal effect of lead in this remedy might probably not be due to precipitation in LB medium. Since LB is a very rich medium, not reflecting the one on the skin which might be poorer, we also tested the activity of the preparations in succinate medium, a poorer medium. Indeed, Pb ions target many biomolecules that are apt to interact with the most common divalent cations [29]. There is thus a competition between Pb and biological metals for specific function (ion channels, enzymes, and proteins). The use of this poor medium (including poor metal concentrations, at least 100 fold lower [30]) will change the ratio between Pb and the other metals, and thus potentially increase its toxicity. However, when we performed these tests on *P. aeruginosa*, we observed similar results than in LB. Thus, changing the composition of the medium, or the ratio between toxic metals/biological metals might not change drastically the bactericidal activity of either Pb or Ca salts.

Altogether, the preparation tested enabled to show that the remedy promoted an antibacterial activity, mainly carried by Ca salts. This activity was however low, but it should be noted that these metal preparations partly precipitated in the media, so that the real bactericidal activity of the preparations might be higher than the observed ones. Further, the ointment was directly applied to the infection site according to Al-Kindi, which might enable to reach these high concentrations precisely at this infected site. Interestingly also, while plant-based remedies often show enhanced activity against gram positive versus gram negative bacteria, these metal preparations were similarly active against both type of bacteria.

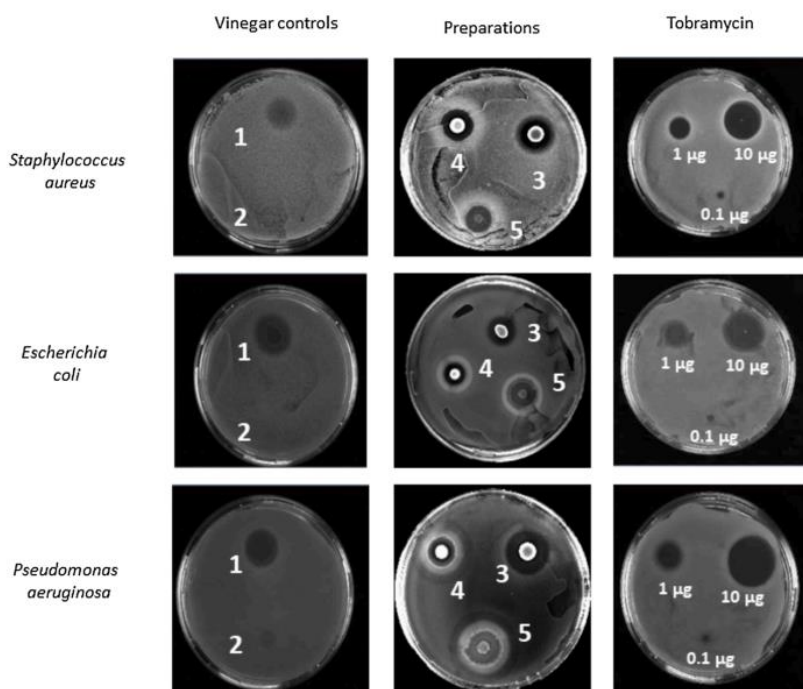


Fig. 4. Antibacterial effect of the remedy preparations. 300 µL of a bacterial (*S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) overnight culture diluted to an OD_{600nm} of 0.02 were spread on LB plates. 10 µL of preparations were then dropped onto the plates which were left overnight (18 h) at 37 °C, before pictures were taken. Each drop related to a specific preparation, which number referred to those in Fig. 3. The halo around the drops reflected the antibacterial activity of the preparations. Positive controls referring to tobramycin bactericidal activity on these bacteria have been added.

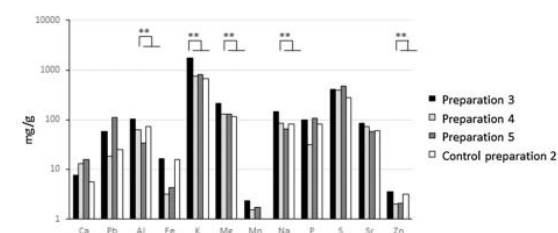


Fig. 5. Metal content of the preparations. The presence of several metals have been monitored in the preparations 3, 4, 5 and in the control preparation 2. Samples were mineralized in closed vessels with nitric acid for trace analysis at 100 °C for 1 h. The detection of 30 elements in the clear obtained solution was realized at the proper dilution by ICP-AES (Varian 720ES). The concentration is given in mg/g of the dried preparations. Elements with a concentration above 1.5 mg/g were quantified using a multielement standard for calibration. The concentration of Mn in the control preparation 2 was below 1.5 mg/g, and is thus not shown. P values were determined by Student's *t*-test (* *P* < 0,05, ** *P* < 0,005).

3.9. Anti-inflammation properties

During oedema development following bacterial infection, immune response, especially inflammation, is an important part of the symptom. To evaluate the possible effect of the preparations on inflammation, we used a very simple cellular model to partially mimick *in vitro* the inflammatory response : activated mouse macrophage cell line, RAW264.7. We tested the preparations 4 or 5, but not the preparation 3, as acidic pH is detrimental for RAW264.7 cells. We showed the results for two lots of preparations 5 (Fig. 6).

3.9.1. Toxicity on RAW cells

First, we investigated the toxicity of the preparations, using

Table 4

Zone of inhibition and MIC calculated for the different preparations tested in 96-well plates. The number of the preparation refers to that of Fig. 3. The zone of inhibition is given in mm, as the diameter of the halo around the offset of the remedy (Fig. 4), with a standard deviation <10 %. The value for tobramycin corresponds to that of 1 µg loaded on the plate. The MIC value represent the lowest concentration of the preparation (diluted in the growth medium) that completely inhibited bacterial growth, and is given in µL/mL. The concentrations tested ranged from 125 µL/mL to 0.125 µg/mL. The MIC for the tobramycin is given as a positive control (in µg/mL).

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Inhib. zone	CMI	Inhib. zone	CMI	Inhib. zone	CMI
Control 1	16 mm	15 µg/mL	18 mm	15 µg/mL	18 mm	15 µg/mL
Preparation 3	18 mm	7.5 µg/mL	12 mm	15 µg/mL	20 mm	15 µg/mL
Control 2	-	125 µg/mL	-	125 µg/mL	-	>125 µg/mL
Preparation 4	20 mm	30 µg/mL	13 mm	15 µg/mL	16 mm	15 µg/mL
Preparation 5	16 mm	15 µg/mL	13 mm	15 µg/mL	16 mm	7.5 µg/mL
Tobramycin	12 mm	0.3 µg/mL	12 mm	0.5 µg/mL	28 mm	0.5 µg/mL

measurement of mitochondrial metabolism that was proportional to cell viability. These preparations were added at various concentration to RAW cell culture. As shown on Fig. 6A, preparation 4 (without Pb salts) had no effect on cell viability until of 50 µL/mL. By contrast, in the presence of Pb salts, the two distinct preparations 5 induced cell cytotoxicity for concentrations above 0.1 µL/mL. In the rest of the experiments, we used a concentration of 0.08 µL/mL at which the preparations does not affect cell viability.

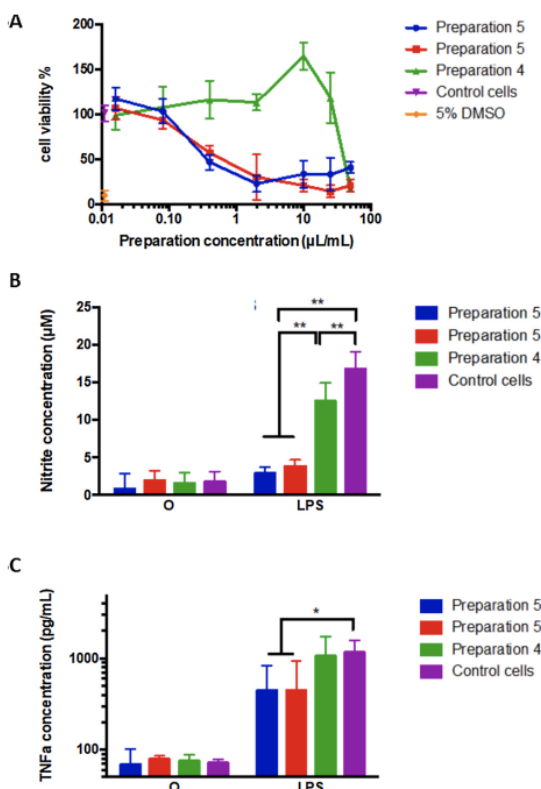


Fig. 6. Cytotoxic effect and anti-inflammatory response of the preparations on RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with different concentrations of the preparations 4 and 5 (referring to Fig. 3). Two different preparations 5 have been used (blue and red), to monitor intra-variation that could originate from the preparation protocol. Cytotoxicity was assessed using mitochondrial activity after 48 h of contact (6A). As control, the cytotoxicity was assessed either without exposition of RAW cells to the preparations (purple), or with 5% DMSO (a toxic concentration, orange) and represented as a single point on the graph. (6A). The results are expressed as the percentage of breathing mitochondria corresponding to alive cells from 3 independent experiments. To study the inflammatory part (6B and C), RAW cells were exposed to the preparations for 24 h (value '0' in abscisses), or further challenged with 50 ng/mL of lipopolysaccharide (value 'LPS' in abscisses) for 24 h or not (value '0' in abscisses) (6B and C). Supernatants were then collected. NO production was assessed by Griess reaction ($n = 3$) and TNF α by ELISA ($n = 3$). They reflect an activation of the macrophages, and thus a pro-inflammatory effect. Fig. 6B and C represent respectively NO and TNF α concentrations observed in supernatant of cells cultured in presence of 0.08 $\mu\text{L/mL}$ of filtered remedies where no cell toxicity has been observed (6A). P values were determined by two-tailed Mann-Whitney U test (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$).

3.9.2. Production of NO and TNF- α

The pro-inflammatory or anti-inflammatory activities of the preparations were then estimated by assessing the amount of various inflammation mediators produced by the activated RAW cells such as nitric oxide (NO) (Fig. 6A) or pro-inflammatory cytokines such as TNF- α (Fig. 6B). As a control, the production of NO and TNF- α was measured when no preparations were added to the RAW cells.

As shown in Fig. 6, after 24 h of contact with any preparation, no observable pro-inflammatory activity could be detected, as of NO and TNF- α were produced (label '0' in abscisses of Fig. 6B and C).

To evaluate the potential anti-inflammatory activity of the preparations, RAW cells were activated by lipopolysaccharide (label 'LPS' in

abscisses of Fig. 6B and C), a chemical compound that mimics infection and induces inflammation, after treatment with the preparations during 24 h. As expected, LPS induced the production of NO (Fig. 6B, control) and TNF- α (Fig. 6C, control). The preparations 5 containing Pb salts, induced a decrease of NO and, in a lesser extend, of TNF- α whereas the preparation 4 without Pb salts had no effect. Altogether, these results showed that preparations containing Pb salts had anti-inflammatory properties.

4. Discussion

Due to antibiotic overuse during the last decades, bacteria have developed resistance in such a way as to represent an important health risk for the next years. Unfortunately, the antibiotic discovery pipeline has been reduced in the same period and we currently lack new lead compounds. There is thus an urgent need for new molecules/strategies to fight these resistant bacteria. Among the possibilities, plant-derived compounds and other natural substances like minerals may represent a rich source of products that could inhibit or mitigate current antibiotic-resistant pathogens. In the last years, research on nature-derived drugs has increasingly turned to historical medical texts, both to study the development of pharmacopeias and to identify candidate species for the discovery of new drugs [31,32]. Medieval societies used these natural substances to treat diseases clearly identifiable by the trained eye as microbial infections. Specifically, Arab physicians have produced a developed pharmacopeia containing thousands of preparations that could be re-examined in the light of current scientific research techniques. We focused our study on metal-plant derived remedies, as they were often prescribed when plant-only remedies were not efficient enough. Even if promising, such remedies deserved only few studies, due to a reluctance toward metals as compared to plants, difficulties to identify the past formulation of metals, and to understand their mode of action. Thus, to promote again such studies, it is essential to bring a proof of concept that such remedies are worth studying, through examination of the potential brought by metals.

We based our study on historical text analyses from three different, well recognized Arab scientists from the 9–12th century. Even if plants, as we could expect, were extensively used, ingredients from mineral origin still represented 10 % of all, with no less than 36 different minerals. When it came to remedies against infections that could be applied externally, as for skin infection, the use of minerals grew to 70 %. We then focused our study on a simple remedy, prescribed by Al-Kindi to cure abscesses and containing mainly metals, to bring a proof of concept that it is possible to analyse their formulation, to assess the mastery of ingredient transformation by the physicians, their awareness about toxicity, and finally the potentialities brought by the use of metals.

The remedy studied here contained litharge, quicklime, vinegar, olive oil and sheep fat. While olive oil and sheep fat had mainly a galenic role, we studied the function of the other ingredients. Vinegar allowed the solubilization of litharge and quicklime. For litharge and quicklime, we turned to the historic indications to study their role. The remedy was prescribed as such: "It draws out what is in it, cleanses it, cicatrizes the flesh". Thus, the remedy could be expected to carry different actions, not only a bactericidal one, but also a pro or anti-inflammatory one. Wound healing usually consists of two phases [33,34], one pro-inflammatory, to combat the infection and destroy the infectious agents (named acute inflammation), and one anti-inflammatory to enable a repair of the wound (named inflammation resolution). This latter stage is necessary for re-epithelialisation, re-vascularisation, and fibroblast regeneration [35,36]. In an *in vitro* model of inflammation, we observed that two inflammation markers (NO and TNF) was not increased by our remedy. On the contrary, the remedy decreased the production of these two markers induced by a molecule mimicking infection (LPS) suggesting an anti-inflammatory effect of the remedy. Moreover, this effect was not observed in presence of litharge showing the role of the Pb in this effect. All together, our data showed that the

remedy mimicks the two phases of inflammation, the Ca salts contained in the remedy triggering the bactericidal activity, as it is the case for the first pro-inflammatory step, while the Pb salts promoted the subsequent anti-inflammatory, cicatrisation phase.

One difficulty when working on preparations with non-pure materials (as it is the case here with quicklime, celite, or vinegar) is the potential contamination of the final product with undesired ingredients, like other metals that could be responsible of some of the observed effects, or induce other side effects. This has been particularly depicted for some herbal preparations [17], in which Pb contamination was involved in toxic side effects. In our preparations, we indeed found different metals that originated probably from the celite (as any other clay, celite contained trace metals elements). The fact that higher concentrations of most metals were found in the preparation 3 (preparation without quicklime), conferred another role to quicklime, as buffering the vinegar avoided a higher solubilisation of these metals. In this study, the experimental protocols (including the controls) enabled to avoid some biases in the conclusions. Indeed, the anti-inflammatory properties have been deduced from comparison of preparations containing or not litharge, which purity is assessed > 99.99 % by the manufacturer. The antibacterial effect of preparation 4 (with quicklime) could in that case be due to metals contained in the commercial quicklime, but only the calcium has been shown in higher concentration in preparation 4 as compared to the others. These results nevertheless pointed out the importance of checking the presence of trace elements, especially for preparations containing non-pure ingredients.

The direct application of the remedy on the infection site could have two beneficial effects: it might enable to reach a high concentration of the ingredients at this specific site, promoting the antibacterial and the anti-inflammatory effects, while the diffusion of the ingredients in the body through the skin might remain low, and thus their toxic effect mainly restricted to the infected area. Altogether, with a very simple recipe, these past physicians designed a complete and synergistic remedy to combat abscesses, while restricting the toxic effect of litharge to the site of infection.

It is further a first example showing that different metal manufacture were evolved to improve the therapeutic potentials of metals. A previous study showed that litharge could be purposely transformed in laurionite and phosgenite, with pro-inflammatory properties which were added to make-up to prevent infection [28]. Our results showed that through a different process of transformation, the physicians could obtained soluble Pb with anti-inflammatory properties, that promoted cicatrisation. These formulations were not purposely prepared to trigger pro/anti-inflammation, as these physicians did not have the molecular knowledges for that. How did they come to such unattended medical conclusions is still appealing and intriguing. Yet, they knew that these formulations were adapted to preventive care, or skin infection cure, through careful experimental observations, and used these different preparations purposely.

Pb has proven highly toxic for human [37,29], which contrasts with its wide use in the past especially as anti-infective (either in make-up to promote a protective immunity or in remedies themselves), that still remains questionable. Nevertheless, Pb toxicity was known even in Antiquity. Its therapeutic use was documented and framed as reported by Lanoë [38]. As anti-infective, Pb was mainly used externally, which limits the diffusion of this toxic metal in the body, while concentrates its action on the infection site. Knowledges about metal toxicity was not limited to Pb. For example, Hg (mercury) formulations were also used [39]. Its toxicity was also well-known since ancient time, as reported by Pliny the Elder [13], and past chemists knew that different Hg formulation triggered different toxicity. Hg was thus preferentially used as cinnabar (sulphur salt, HgS), which toxicity has been recently estimated to be >3 log lower than current well-known and toxic mercury salts (Me-Hg, HgCl₂) [40]. Thus, it is possible that these ancient and careful precaution changed the balance advantage/risk on the use of such metals. Altogether, it appears that the past physicians were aware of

metal toxicity, and that their use could be carefully framed.

5. Conclusion

Of course we do not wish to promote the re-use of Pb in medicine, but our data illustrated the capacity of these physicians to master the transformation and formulation of metals, while handling the toxicity of these hazardous materials. Being aware of these past knowledges, mastering, risk prevention in metal use, should help considering again these ancient remedies for more than shamanism or charlatanism. The knowledges acquired by these physicians deserve more attention, and it is likely that research on these types of ancient remedies combining plant and metal, maybe targeted on less toxic metals, could still reveal unexpected features, original organo-metallic compounds or therapeutic synergy. We are also aware that promoting again the use of such formulations will also require consideration of the various trace elements that these formulations may contain (due to contamination/lack of purity...), and their beneficial/detrimental effects on the final product.

Author contributions

V.P., P.F. conceived this study and drafted the manuscript. B.A., E.A., C.S. performed the experiments. P.F., V.P., and S.F. analysed the data. C. V., L.C., H.A.B, L.S. formulated hypotheses, and contributed to manuscript preparation, G.L.A.M., S.F., I.J.S. participated to the experimental design of the study. All authors reviewed and approved the manuscript.

Funding

This project was financially supported by the French Ministry of Europe and Foreign Affairs, Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the French Institute of Rabat (PHC TOUBKAL 2019 (French-Morocco bilateral program) Grant Number: 41520SE, by the University of Strasbourg (projet Interdisciplinaire – Emergence) Grant Number CF/PN/CB/N°2017-974-3), and by the program METALLO-MIX of CNRS - Grant Number 21887. B. Abdallah was financed by the Mascir Foundation (Rabat), and by the PHC TOUBKAL. E. Aubert held a fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Brice Angot, and Conor McCartin for technical assistance.

References

- [1] K.J. Waldron, N.J. Robinson, How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 25–35, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2057>.
- [2] C. Andreini, I. Bertini, A. Rosato, A hint to search for metalloproteins in gene banks, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20 (2004) 1373–1380, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth095>.
- [3] T. Bardinnet, *Les Papyrus médicaux de l'Égypte pharaonique*, Trad. intégrale et comment, Fayard, Paris, 1995.
- [4] J. Campbell, *Pharaohs and the first prescriptions*, *Pharm. J.* (2007) 735–737.
- [5] Credé, *Die Verhütung der Augenentzündung der Neugeborenen*, *Arch. Für Gynäkol.* 17 (1881) 50–53, <https://doi.org/10.1007/BF01977793>.

- [6] J.M. Sims, On the treatment of vesico-vaginal fistula. 1852, *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* 9 (1998) 236–248, <https://doi.org/10.1007/BF01901610>.
- [7] J. Pereira, T.B. Crosby, G.O. Rees, A.S. Taylor, K.C. London, S.T. Hospital, *The Elements of Materia Medica and Therapeutics, Third Edition Enlarged Improved, Including Notices of Most of the Medicinal Substances in Use in the Civilized World, and Forming an Encyclopaedia of Materia Medica*, Printed for Longman, Brown, Green and Longmans, London, 1849, <https://doi.org/10.5962/bhl.title.109750>.
- [8] N.D.C. Hodges, The value of mercuric chloride as a disinfectant, *Science* 13 (1889) 62–64.
- [9] P. Ehrlich, A. Berthelm, Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxy-arsenbenzol und seine nächsten Verwandten, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* (1912) 756–766.
- [10] E.L. Keyes Jr., The treatment of gonorrhoea of the male urethra, *J. Am. Med. Assoc.* 75 (1920) 1325–1329, <https://doi.org/10.1001/jama.1920.02620460023008>.
- [11] A.D. Frazer, Tellurium in the treatment of syphilis, *Lancet* 216 (1930) 133–134, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)09037-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)09037-7).
- [12] M. Wellman, Library, *Pedani Dioscuridis De materia medica libri quinque* [electronic resource], University of Glasgow, Berolini : Weidmann, 1906 (Accessed November 5, 2020), http://archive.org/details/b21459162_0001.
- [13] H. Le Bonniec, *Histoire naturelle, Livre XXXIV - Plaine l'Ancien*, Paris, 2002 (Accessed November 5, 2020), <https://www.lesbelleslettres.com/livre/867-histoire-naturelle-livre-xxxiv>.
- [14] Christian Bonah, L'affaire du Stalinon : et ses conséquences réglementaires, 1954-1959 "Sécurité sanitaire" et innovation thérapeutique en France il y a 50 ans, in: *Aff. Stalinon Ses Conséq. Réglem. 1954-1959 Sécurité Sanit. Innov. Thérapeutique En Fr. Il 50 Ans.*, 57, 2007, pp. 1501–1505.
- [15] J. Parascandola, From mercury to miracle drugs: syphilis therapy over the centuries, *Pharm. Hist.* 51 (2009) 14–23.
- [16] M.A. Riva, A. Lafranconi, M.L. D'Orso, G. Cesana, Lead poisoning: historical aspects of a paradigmatic "Occupational and environmental disease", *Saf. Health Work* 3 (2012) 11–16, <https://doi.org/10.5491/SHAW.2012.3.1.11>.
- [17] M.A. Mikulski, M.D. Wichman, D.L. Simmons, A.N. Pham, V. Clotey, L.J. Fuortes, Toxic metals in ayurvedic preparations from a public health lead poisoning cluster investigation, *Int. J. Occup. Environ. Health* 23 (2017) 187–192, <https://doi.org/10.1080/10773525.2018.1447880>.
- [18] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 371–384, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- [19] G.B. J. Gabbay, Copper, An ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections, *Curr. Chem. Biol.* 3 (2009) 272–278 (Accessed October 26, 2020), <https://www.eurekaselect.com/93409/article>.
- [20] E. Connelly, C.I. Del Genio, F. Harrison, Data mining a medieval medical text reveals patterns in ingredient choice that reflect biological activity against infectious agents, *MBio* 11 (2020), <https://doi.org/10.1128/mBio.03136-19>.
- [21] A.E. Al-Snafi, Therapeutic properties of the medicinal plants: a review of their antibacterial activity (Part 1), *Int. J. Pharm. Ther.* 6 (2015) 137–158.
- [22] F. Harrison, A.E.L. Roberts, R. Gabriliska, K.P. Rumbaugh, C. Lee, S.P. Diggle, A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity, *MBio* 6 (2015) e01129–15, <https://doi.org/10.1128/mBio.01129-15>.
- [23] O. Kahl, *The Small Dispensatory, Sahl Sabür Ibn*, BRILL, Leiden, 2003.
- [24] O. Kahl, *Sabür ibn Sahl's Dispensatory in the Recension of the 'Aḍudī Hospital*, Brill, Leiden, 2009 (accessed November 5, 2020), https://www.academia.edu/4245202/%C4%81b%C5%ABr_ibn_Sahls_Dispensatory_in_the_Recension_of_the_%CA%BFA%E1%B8%8Dud%C4%AB_Hospital_Islamic_Philosophy_Theology_and_Science_78_By_Oliver_Kahl_pp.1x_265_Leiden_and_Boston_Brill_2009.
- [25] M. Levey, *The Medical Formulary, or Aqrābādīn of Al-Kindī*, University of Wisconsin Press, Madison, 1966.
- [26] O. Kahl, *The Dispensatory of Ibn At Tilmid: Arabic Text, English Translation, Study and Glossaries, Bilingual édition*, Brill, Leiden; Boston, 2007.
- [27] E. Photos-Jones, C. Keane, A.X. Jones, M. Stamatakis, P. Robertson, A.J. Hall, A. Leonard, Testing Dioscorides' medicinal clays for their antibacterial properties: the case of Samian Earth, *J. Archaeol. Sci.* 57 (2015) 257–267, <https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.01.020>.
- [28] I. Tapsoba, S. Arbault, P. Walter, C. Amatore, Finding out egyptian gods' secret using analytical chemistry: biomedical properties of egyptian black makeup revealed by amperometry at single cells, *Anal. Chem.* 82 (2010) 457–460, <https://doi.org/10.1021/ac902348g>.
- [29] P. Mitra, S. Sharma, P. Purohit, P. Sharma, Clinical and molecular aspects of lead toxicity: an update, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 54 (2017) 506–528, <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>.
- [30] O. Cunrath, V.A. Geoffroy, L.J. Schalk, Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores, *Environ. Microbiol.* 18 (2016) 3258–3267, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12971>.
- [31] M. Dal Cero, R. Saller, C.S. Weckerle, The use of the local flora in Switzerland: a comparison of past and recent medicinal plant knowledge, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 253–264, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.035>.
- [32] P.O. Staub, L. Casu, M. Leonti, Back to the roots: a quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (ex Matthioli, 1568), *Phytomedicine* 23 (2016) 1043–1052, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.06.016>.
- [33] M. Hesketh, K.B. Sahin, Z.E. West, R.Z. Murray, Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18071545>.
- [34] A.C. Labonte, A.-C. Tosello-Tramont, Y.S. Hahn, The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases, *Mol. Cells* 37 (2014) 275–285, <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2374>.
- [35] B. Shook, E. Xiao, Y. Kumamoto, A. Iwasaki, V. Horsley, CD301b+ macrophages are essential for effective skin wound healing, *J. Invest. Dermatol.* 136 (2016) 1885–1891, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.107>.
- [36] J.M. Daley, S.K. Brancato, A.A. Thomay, J.S. Reichner, J.E. Albina, The phenotype of murine wound macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 87 (2010) 59–67, <https://doi.org/10.1189/jlb.0409236>.
- [37] I.D. de Souza, A.S. de Andrade, R.J.S. Dalmolin, Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning, *Crit. Rev. Toxicol.* 48 (2018) 375–386, <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>.
- [38] C. Lanoë, La cèruse dans la fabrication des cosmétiques sous l'Ancien Régime (XVIIe-XVIIIe siècles), *Tech. Cult. Rev. Semest. D'anthropologie Tech.* (2002), <https://doi.org/10.4000/te.224>.
- [39] V.S. Vaidya, H.M. Mehendale, Mercuric chloride (HgCl₂), in: P. Wexler (Ed.), *Encycl. Toxicol.*, third ed., Academic Press, Oxford, 2014, pp. 203–206, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00330-4>.
- [40] Q. Wu, Y.-F. Lu, J.-Z. Shi, S.-X. Liang, J.-S. Shi, J. Liu, Chemical form of metals in traditional medicines underlines potential toxicity in cell cultures, *J. Ethnopharmacol.* 134 (2011) 839–843, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.031>.

Un corrigendum a été fait suite à l'absence de l'affiliation du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté des sciences de Rabat, Maroc.

Article 1. Corrigendum

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 73 (2022) 127033



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb



Corrigendum

Corrigendum to “Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential” [J. Trace Elem. Med. Biol. 71 (2022) 126926]

Basma Abdallah ^{a,b,c}, Cendrine Seguin ^d, Elora Aubert ^{c,e}, Hassan Ait BenHassou ^a, Laila Sbabou ^f, Laurence Choulier ^b, Catherine Vonthron ^e, Isabelle J. Schalk ^c, Gaetan L.A. Mislin ^c, Sylvie Fournel ^d, Véronique Pitchon ^{g,*}, Pierre Fechter ^{c,*}

^a Medical Biotechnology Center, Moroccan Foundation for Science, Innovation & Research (MAScIR), Rabat 10100, Morocco

^b CNRS, UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France

^c CNRS, UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

^d CNRS, UMR 7199, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France

^e Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT) UMR CNRS 7200, LabEx Medalis, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^f Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V Agdal, Faculty of Sciences, Rabat 10100, Morocco

^g CNRS, UMR7044, Archéologie et Histoire Ancienne: Méditerranée, Europe, MISHA, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

The authors regret the absence of an affiliation for the first author, Basma Abdallah.

The first author is affiliated to four laboratories, instead of three initially mentioned.

Basma Abdallah is indeed affiliated to the following laboratories:

^aMedical Biotechnology Center, Moroccan Foundation for Science, Innovation & Research (MAScIR), Rabat 10100, Morocco.

^bCNRS, UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies,

Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France.

^cCNRS, UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

^fLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V Agdal, Faculty of Sciences, Rabat 10100, Morocco.

The authors would like to apologise for any inconvenience caused.



Conclusion de l'article

Cette étude nous a montré qu'il est très difficile de reproduire exactement à l'identique un remède du passé, mais qu'il est possible de s'en approcher. Par exemple, l'argile a été remplacée par de la céélite, couramment utilisée pour filtrer des espèces chimiques. La litharge par le passé extrait de mines a été remplacée par un oxyde de plomb pur et la chaux également par un équivalent pur. Même si la préparation n'est pas l'exacte copie de la préparation millénaire, nous en avons tiré des enseignements et connaissances

Le remède possède à la fois des propriétés bactéricides, pour lutter contre l'infection et des propriétés anti-inflammatoires qui favorisent la cicatrisation. L'avantage de ces synergies est qu'elles pourraient retarder l'apparition de résistances. En effet, pour devenir résistante, la bactérie devrait développer une panoplie de résistance contre tous les principes/molécules actifs des remèdes.

Ce travail a aussi mis en avant le fait que les alchimistes du passé maîtrisaient l'utilisation et savaient appréhender la toxicité des métaux. Ils étaient surtout utilisés de manière topique, afin de minimiser leurs effets toxiques. Cette conclusion est importante pour nous permettre de poursuivre nos investigations sur des combinaisons plantes – métaux.

Pour revaloriser l'étude de ces préparations anciennes, il est nécessaire aussi de montrer qu'elles n'ont pas été conçues par hasard, ou pour des besoins non médicaux (mystiques...), mais qu'une démarche scientifique a bien été suivie dans leur élaboration. Le fait que chaque ingrédient ait une fonction pour la préparation éloigne la possibilité qu'elle ait été obtenue sans reposer sur le moindre fondement scientifique. Si tel avait été le cas, on se serait probablement attendu à trouver quelques ingrédients ajoutés pour d'autres raisons (une couleur ou un attribut symbolique ...). Cela renforce l'hypothèse que cette préparation a bien été obtenue selon une démarche scientifique.

2.2. Remède 2

Cette 2^{ème} préparation est plus complexe puisqu'elle combine plantes et métaux. Elle a également été décrite par Al-Kindi au IX^{ème} siècle (tableau 9).

Tableau 9 : Composition de la préparation du remède 2 sélectionné.

Préparation 2	Quantité
Gomme ammoniacque	2 ûqiyya
Astragale	2 ûqiyya
Aloes	2 ûqiyya
Vert de gris (acétate de cuivre ou carbonate de cuivre)	1 mithqal
Myrrhe	2 ûqiyya

Avec 1 mithqal = 4,46g et 1 ûqiyya = 33,85g

Il s'agit d'un médicament contre les abcès et les mauvais furoncles, dont le mode de préparation est décrit comme suit : « Chaque ingrédient est broyé et tamisé. On humidifie l'abcès avec. On humidifie un tissu fin en lin avec de l'eau et on saupoudre le médicament dessus et on applique sur la blessure. Cet emplâtre ne s'enlèvera pas (tout seul) tant que (l'abcès ou le furoncle) ce n'est pas guéri, avec l'aide de Dieu ».

Pour étudier ce remède contenant des plantes, nous avons décidé non pas d'étudier la préparation entière, comme précédemment, mais de réaliser des extractions à partir des plantes par 3 solvants de polarité différente : 100% EtOAc (Acétate d'éthyl), un mélange EtOH/H₂O 70/30 v/v (Ethanol et eau), soit CH₂Cl₂ (Dichlorométhane). Chaque mélange a été placé sous agitation magnétique à l'obscurité, à température ambiante pendant 24h avant d'être filtré et évaporé. Les plantes ont été 'épuisées' par trois extractions successives. Les extraits secs ont été obtenus à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C. Tous les extraits secs ont été pesés avant d'être conservés à 4°C et à l'abri de la lumière. Cette partie a été effectuée par Elora Aubert, en collaboration avec le groupe du Pr Catherine Vonthron (UMR7200).

Lorsque j'ai initié l'étude de ce remède, seules deux plantes étaient disponibles dont *Aloe ferox* et *Commiphora abyssinicae*. Le tableau 10 comprend les différents extraits préparés avec les solvants utilisés. L'annexe 1 comprend le protocole utilisé pour préparer ces extraits.

Les rendements d'extraction ont été élevés car il s'agit d'exsudats et non pas d'organes (absence de tissus cellulaires). Seuls l'extrait du dichlorométhane de l'*Aloe ferox* a été obtenu avec un rendement trop faible pour qu'il puisse être utilisé dans la suite de l'étude.

Tableau 10 : Les différents extraits des deux plantes *Aloe ferox* et *Commiphora abyssinicae*, utilisées dans le remède 2. Chaque plante a été extraite par un solvant ; acétate d'éthyle, eau/éthanol et dichlorométhane.

<i>Aloe ferox</i> ALOF	Extrait d'acétate d'éthyle ALOFA	Extrait Eau/Ethanol ALOFEH	-
<i>Commiphora abyssinicae</i> COMA	Extrait d'acétate d'éthyle COMAA	Extrait Eau/Ethanol COMAEH	Extrait dichlorométhane COMAD
Mélange (<i>Aloe ferox</i> + <i>Commiphora abyssinicae</i>) ALOF + COMA	Extrait d'acétate d'éthyle ALOF + COMA A	Extrait Eau/Ethanol ALOF + COMA EH	Extrait dichlorométhane ALOF + COMA D

Deux formes du cuivre ont aussi été testées dont : le carbonate du cuivre CuCa et l'acétate du cuivre CuAc. J'ai donc travaillé avec les deux plantes *A. ferox* et *C. abyssinicae*, et sur une synergie possible avec CuCa et le CuAc.

Dans un premier temps, j'ai utilisé un test qualitatif, en observant les halos d'inhibition sur boîtes de Petriensemencées avec des bactéries d'intérêt (figure 17) du microbiote cutané, *S. epidermidis* et *C. striatum* et une bactérie pathogène *S. aureus*.

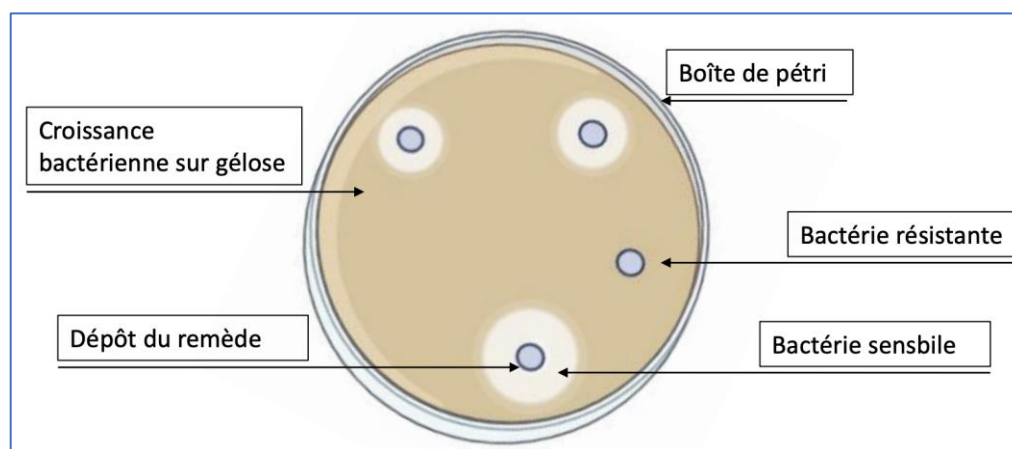


Figure 17 : Schéma explicatif du test qualitatif, effectué sur boîte de Petri.

Pour cela, nous avons testés trois quantités d'extraits d'*Aloe ferox* (500 µg, 1.5 mg et 5 mg) obtenus grâce aux solvant EtOAc (ALOFA) et le mélange éthanol/eau 70/30 (ALOFEH), ainsi

que les mêmes quantités d'extraits de myrrhe obtenus grâce aux solvants EtOAc (COMAA), le mélange éthanol/eau 70/30 (COMAEH) et le dichlorométhane (COMAD). Enfin, pour tester la synergie entre ces plantes, des quantités équivalentes de myrrhe et d'*Aloe ferox* ont été mélangées puis des extractions ont été réalisées avec les trois solvants décrits ci-dessus (ALOF + COMA A pour l'extrait EtOAc, ALOF + COMA EH pour l'extrait éthanolique, et ALOF + COMA D pour l'extrait dichlorométhane).

Les résultats sont présentés sur la figure 18. Le halo autour des dépôts reflète le degré d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits. Dans tous les cas, des halos d'inhibition sont observés, ce qui suggère que les deux plantes produisent bien des substances antibactériennes. Ce test reste néanmoins qualitatif, il est très difficile de commenter l'effet de la quantité déposée, car une partie des produits déposés précipitent (précipités observables au centre du dépôt) et les propriétés de diffusion des produits actifs dans la gélose ne sont pas connues. Cependant, les halos observés lorsque la bactérie *S. epidermidis* est utilisée sont les plus importants. Cette bactérie semble donc plus sensible aux extraits des deux plantes que *S. aureus* et *C. striatum*. Par ailleurs, les halos observés lorsque les extraits d'*Aloe ferox* sont obtenus avec l'acétate d'éthyle sont plus importants que ceux obtenus avec de l'éthanol/eau. Cet extrait semble donc contenir plus de substances actives contre ces bactéries que les deux autres extraits. Cette différenciation n'apparaît pas aussi évidente pour les extraits de myrrhe. Nous avons ensuite testé la combinaison entre ces deux plantes, en déposant les même quantité (500 µg, 1,5 mg et 5 mg) d'extraits l'*Aloe ferox* + myrrhe obtenue avec les trois solvants. Les halos observés n'ont pas de taille supérieure à la taille des halos pour chaque extrait testé séparément. Il n'y a pas d'effet synergique des deux plantes. Le tableau 11 résume ces résultats.

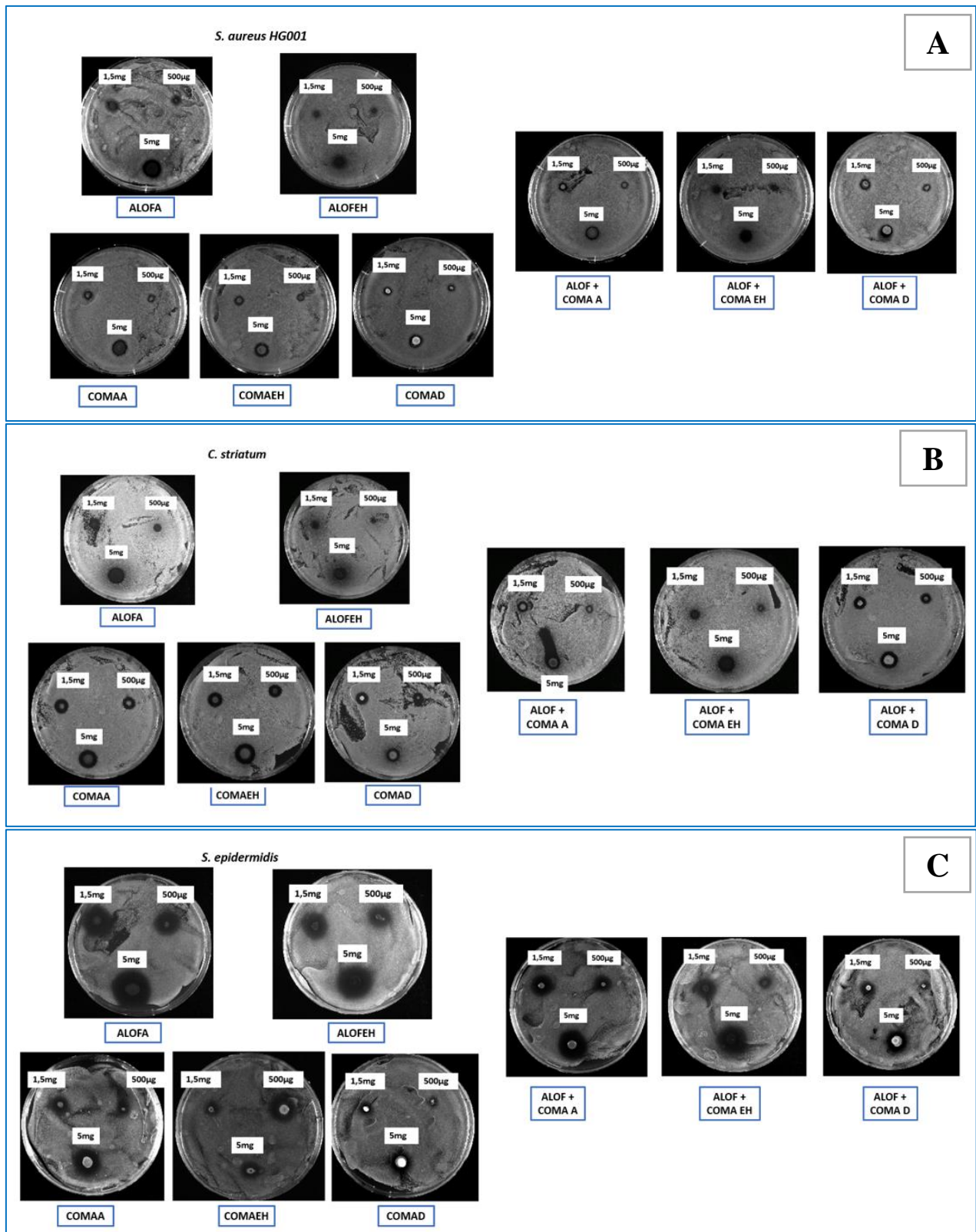


Figure 18 : Résultats des tests des extraits de plantes (500µg/1,5mg/5mg) sur gélose contenant le BHI, contre les différentes bactéries pathogènes. A. *Staphylococcus aureus* HG001 B. *Corynebacterium striatum* C. *Staphylococcus epidermidis*.

Tableau 11 : Test antibactérien des extraits des plantes sur boîte de Petri (n=3) contre les trois bactéries, exprimé en quantité déposée à partir duquel nous observons des zones d'inhibition.

Extractions	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. striatum</i>
ALOFA	500 µg	500 µg	5 mg
ALOFEH	1,5 mg	500 µg	1,5 mg
COMAA	500 µg	500 µg	500 µg
COMAEH	500 µg	500 µg	500 µg
COMAD	500 µg	500 µg	500 µg
ALOF+COMA A	500 µg	500 µg	500 µg
ALOF+COMA EH	1,5 mg	500 µg	1,5 mg
ALOF+COMA D	500 µg	500 µg	500 µg

Pour confirmer ces résultats et interpréter de manière quantitative, les CMI ont été mesurées. Pour cela, des cultures bactériennes ont été ensemencées avec les trois bactéries, en présence de concentrations décroissantes d'extraits de plantes, comme décrits dans la partie Matériels et Méthodes. Nous avons suivi la croissance des bactéries au cours du temps grâce à un Tecan 2000.

La CMI correspond à la première concentration d'extrait pour laquelle la bactérie ne pousse plus. Un exemple de courbes de suivi de croissance bactérienne en fonction du temps et en présence d'extrait d'EtOAc d'*Aloe ferox* est présenté figure 19. Chaque courbe en couleur représente une concentration de l'extrait testé, qui est donnée en légende des courbes. La courbe en pointillé de couleur rose (0) correspond à la croissance de la bactérie en absence de l'extrait. La courbe en pointillé de couleur noire (A12) correspond au contrôle négatif (milieu de culture non ensemencé). Lorsque la courbe est plate (pour *S. epidermidis*, notamment les courbes à 5 mg/ml ou 2.5 mg/ml), cela traduit l'absence de croissance bactérienne. La DO lue est alors liée à l'absorbance de l'extrait et parasite l'interprétation de l'effet de l'extrait. Ces concentrations n'ont pas été testées sur *S. aureus* et *C. striatum*.

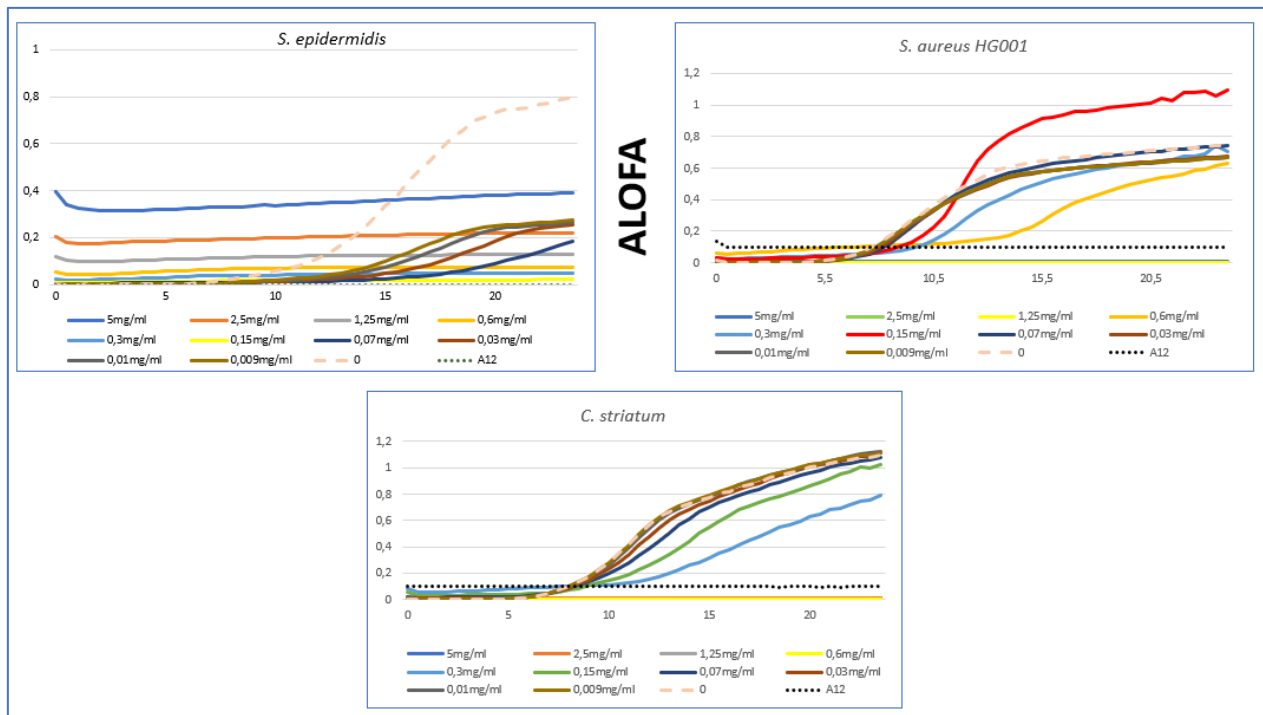


Figure 19 : Résultat du test de l'extrait de plante ALOFA sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus* HG001 et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait d'Acétate d'éthyle d'Aloe ferox.

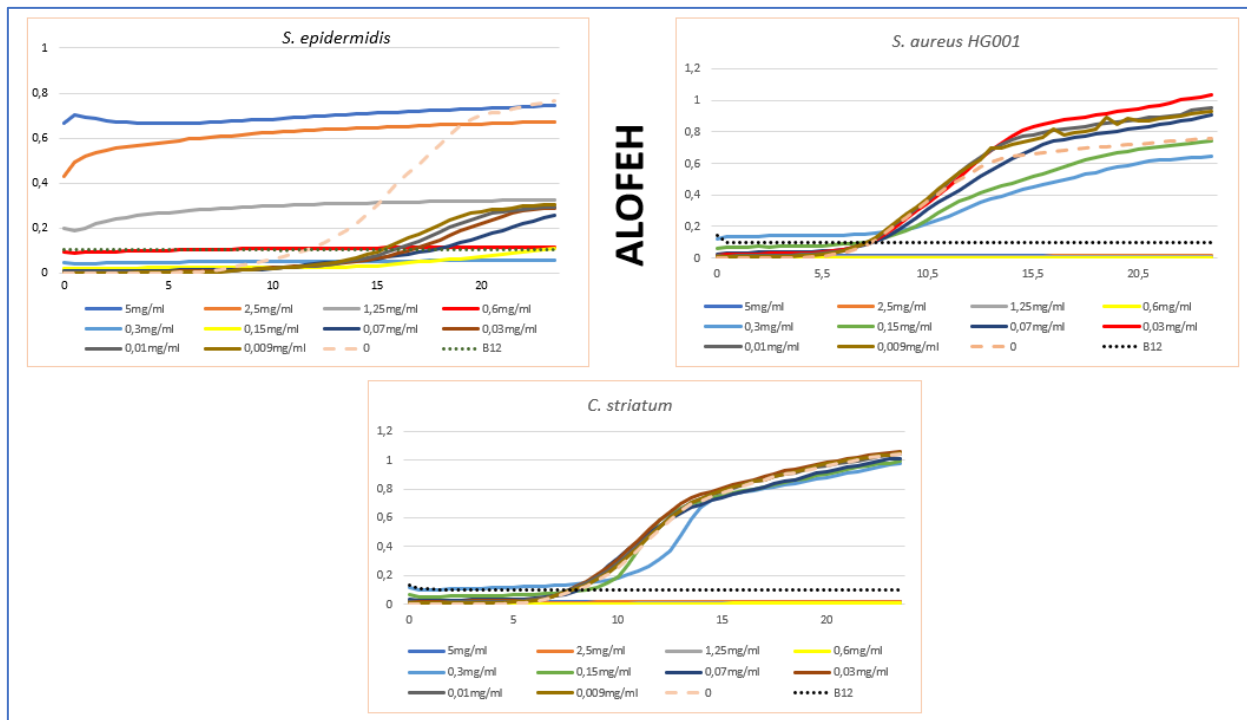


Figure 20 : Résultat du test de l'extrait de plante ALOFEH sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus HG001* et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'eau/éthanol d'Aloe ferox.

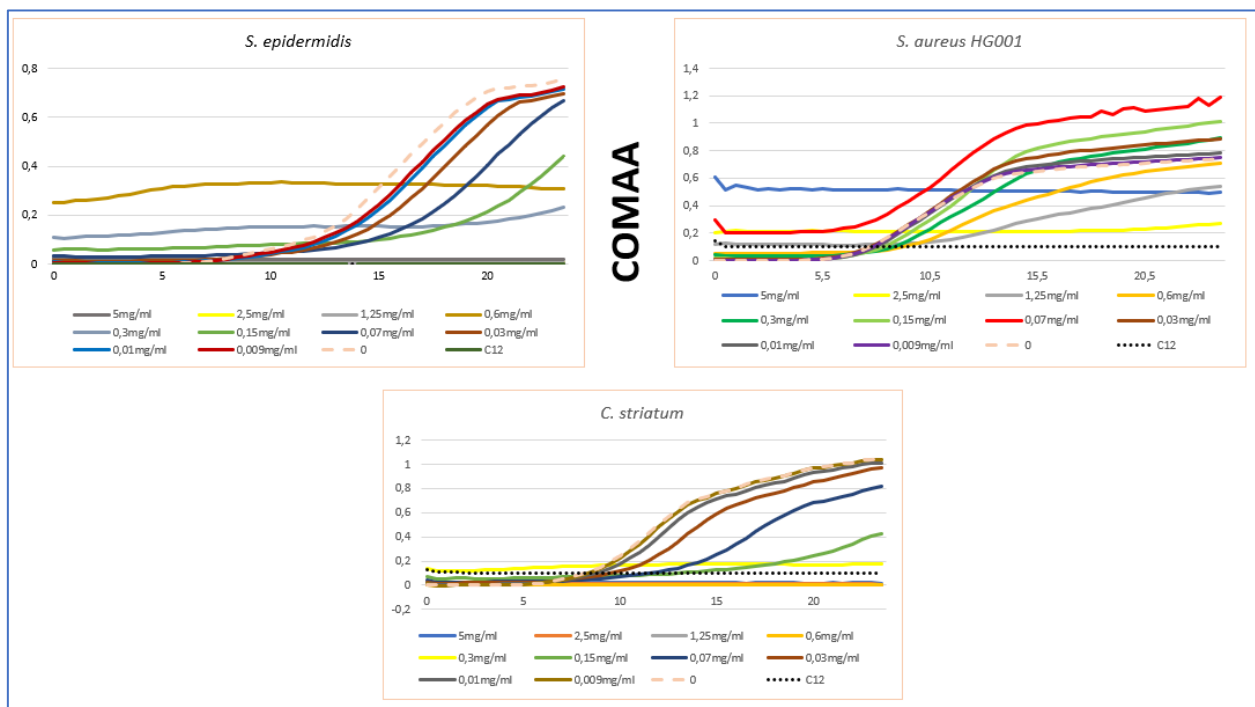


Figure 21 : Résultat du test de l'extrait de plante COMAA sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus HG001* et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait d'Acetate d'éthyle de Commiphora abyssinicae.

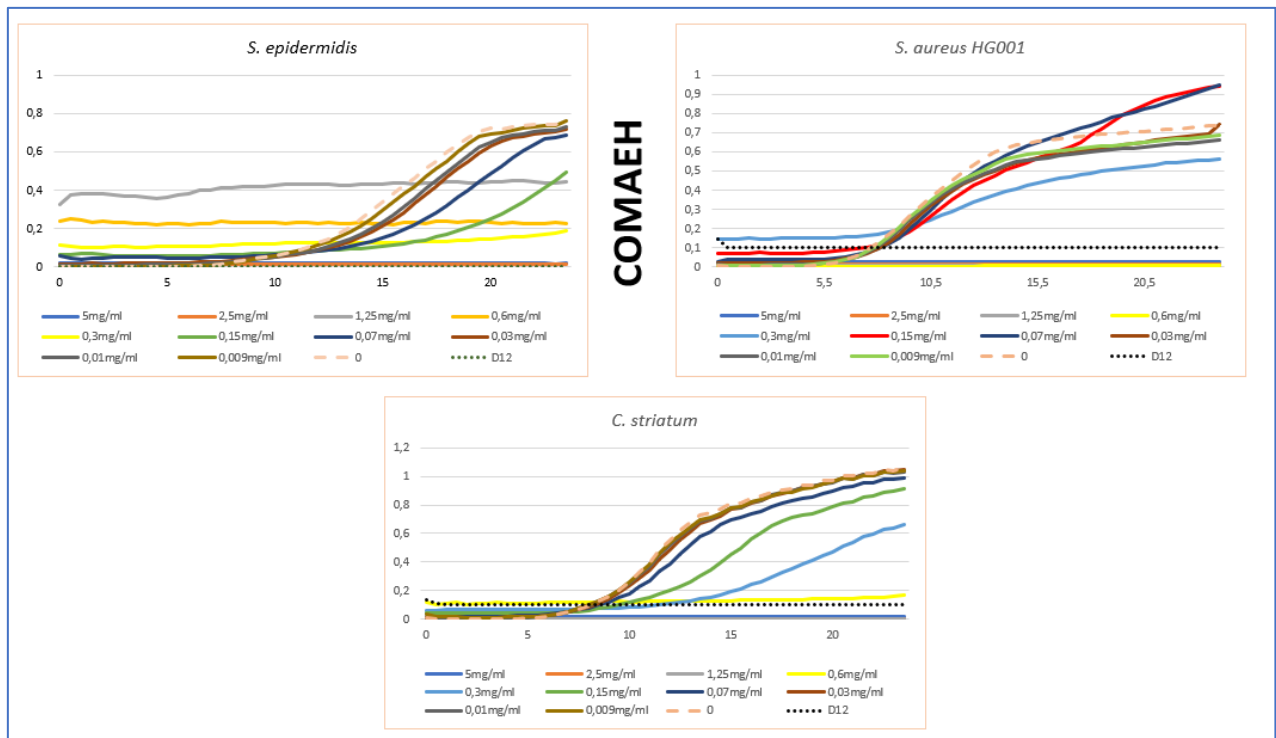


Figure 22 : Résultat du test de l'extrait de plante COMAEH sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus* HG001 et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait de l'eau/éthanol de *Commiphora abyssinicae*.

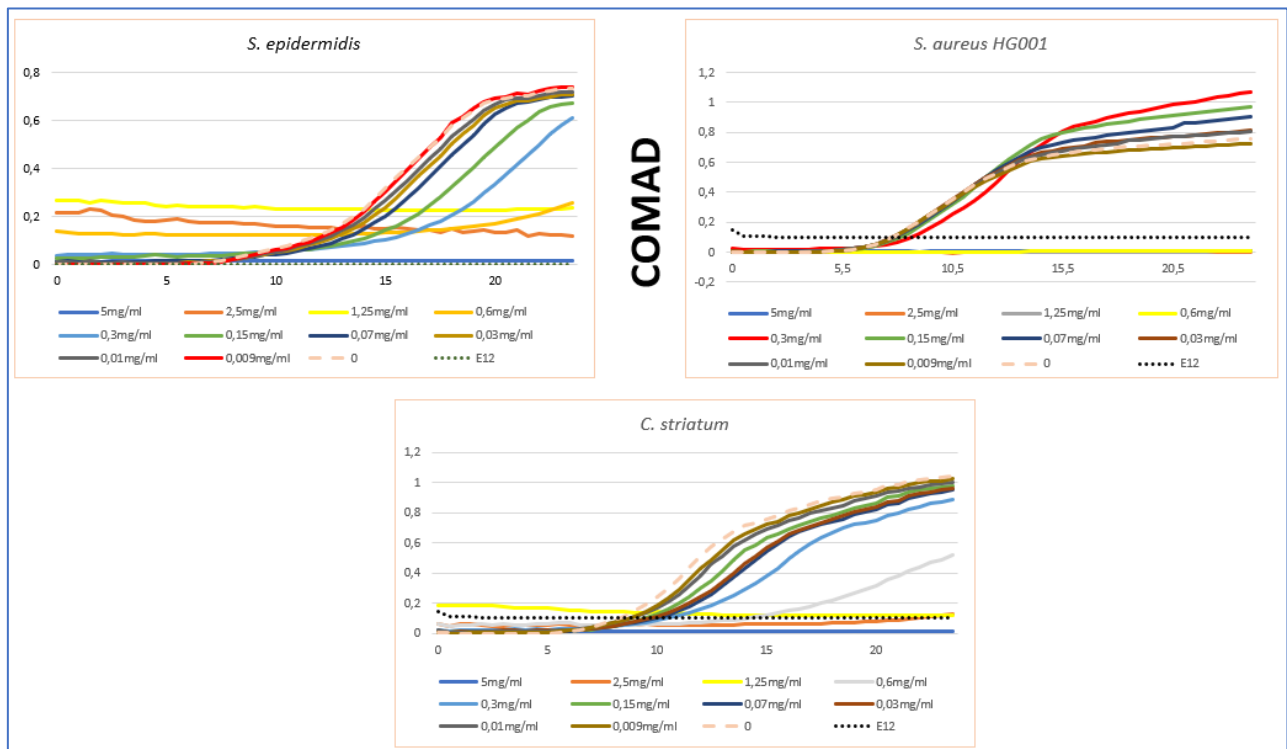


Figure 23 : Résultat du test de l'extrait de plante COMAD sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus* HG001 et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait de dichlorométhane de *Commiphora abyssinicae*.

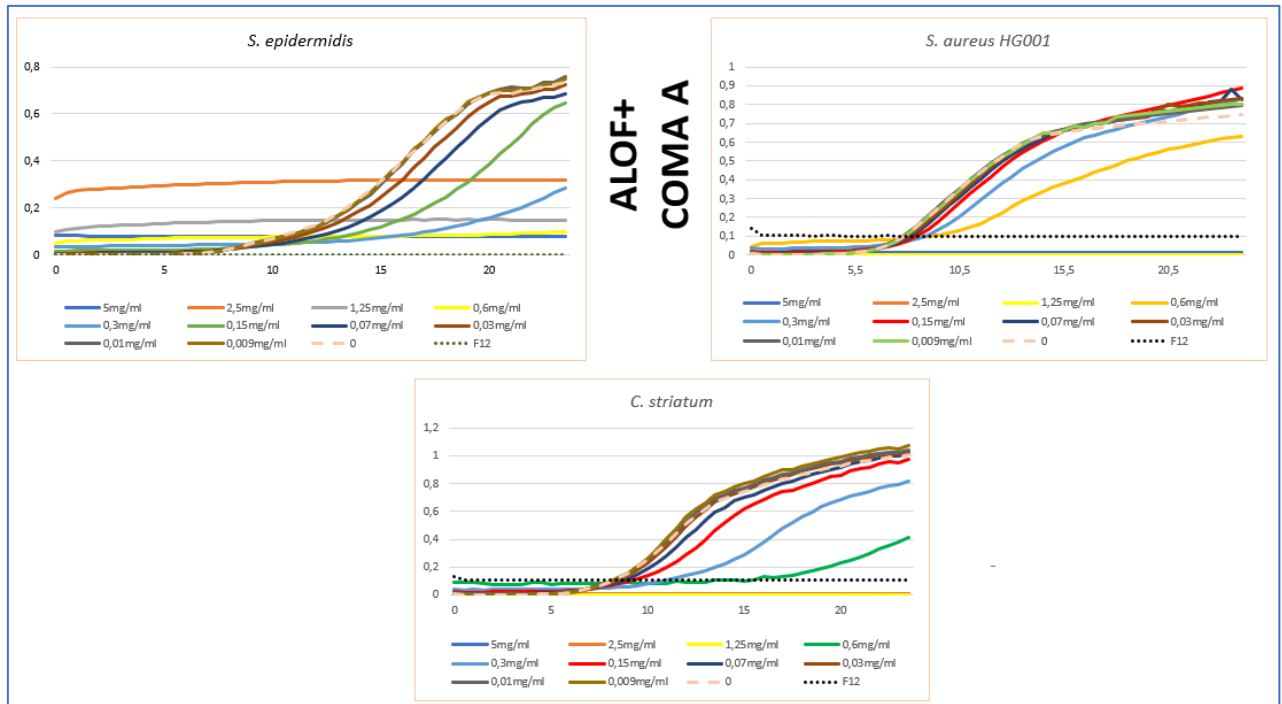


Figure 24 : Résultat du test de l'extrait de plante ALOF + COMA A sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus* HG001 et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait d'Acétate d'éthyle du mélange Aloe ferox et Commiphora abyssinicae.

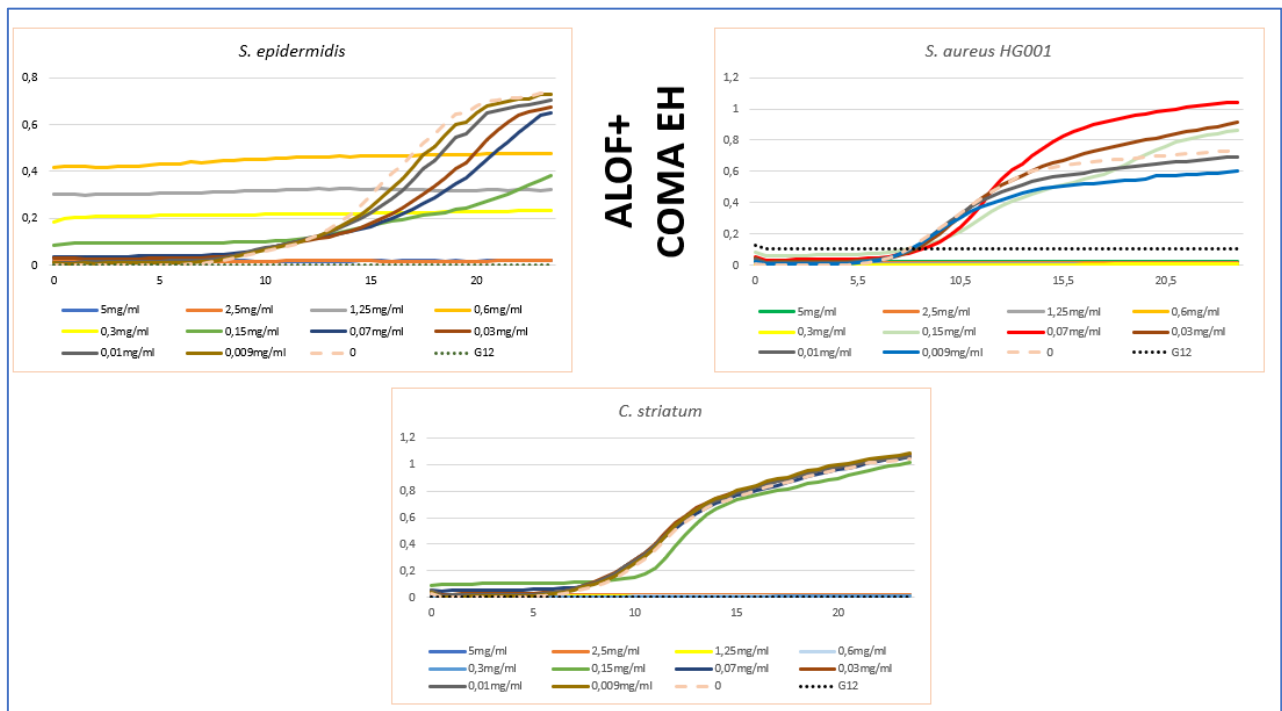


Figure 25 : Résultat du test de l'extrait de plante ALOF+COMA EH sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus* HG001 et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait de l'eau/éthanol du mélange Aloe ferox et Commiphora abyssinicae.

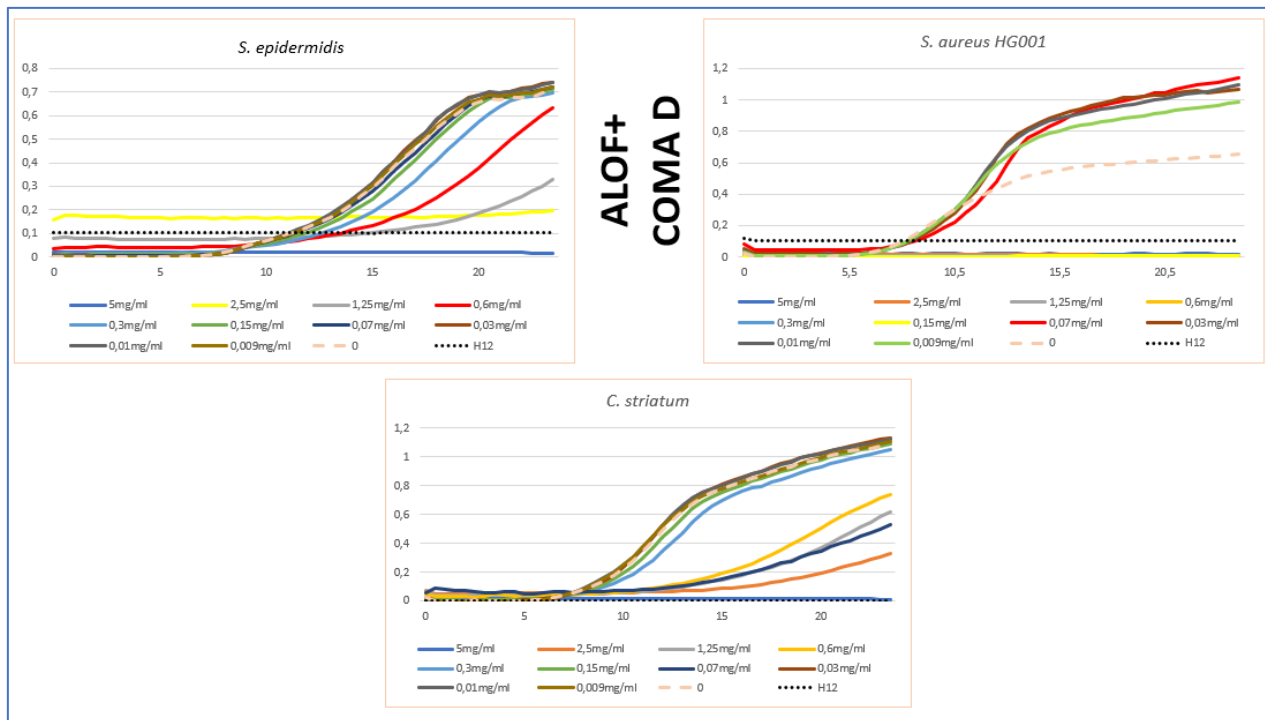


Figure 26 : Résultat du test de l'extrait de plante ALOF+COMA D sur les différentes bactéries. Les courbes correspondent aux courbes de croissance des bactéries pathogènes *S. epidermidis*, *S. aureus HG001* et *C. striatum*, en fonction du temps et en fonction de différentes concentrations de l'extrait de dichlorométhane du mélange Aloe ferox et Commiphora abyssinicae.

Le tableau 12 résume les CMI déterminées à partir des courbes obtenues, pour chaque extrait et chaque bactérie testée.

Tableau 12 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices des extraits de plantes contre les différentes souches bactériennes.

Plante	Extraits utilisés	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. striatum</i>
<i>Aloe ferox</i>	Extrait d'acétate d'éthyle	1,25mg/mL	0,15mg/mL	0,6mg/mL
	Extrait Eau/Ethanol	1,25mg/mL	0,15mg/mL	0,6mg/mL
<i>Commiphora abyssinica</i> (Myrrhe)	Extrait d'acétate d'éthyle	>5mg/mL	0,6mg/mL	0,3mg/mL
	Extrait Eau/Ethanol	1,25mg/mL	0,15mg/mL	0,6mg/mL
	Extrait dichlorométhane	>5mg/mL	1,25mg/mL	1,25mg/mL
Mélange	Extrait d'acétate d'éthyle	1,25mg/mL	0,6mg/mL	1,25mg/mL
	Extrait Eau/Ethanol	0,3mg/mL	0,3mg/mL	0,3mg/mL
	Extrait dichlorométhane	0,15mg/mL	>5mg/mL	>5mg/mL

Ces résultats confirment bien une activité antibactérienne de ces deux plantes, mais qui reste modérée. Les résultats confirment également que *S. epidermidis* est bien plus sensible aux extraits des deux plantes que *S. aureus* et *C. striatum*, car les valeurs de MIC pour cette bactérie sont inférieures à celle des deux autres. Il est possible que ces deux plantes aient d'autres fonctions dans ce remède 2 en plus de fournir une activité antibactérienne.

De manière intéressante, l'extrait d'EtOAc d'*A. ferox* a montré un double effet sur *S. aureus*. A faible concentration, entre un intervalle allant de 0,3mg/mL à 70µg/mL, nous avons remarqué une action stimulante de la croissance. En effet, les DO observées pour les courbes de croissance, à ces concentrations d'extraits, sont supérieures à celles obtenues pour la courbe de référence sans extrait (figure 19). Ceci pourrait indiquer la présence de molécules ayant des propriétés favorisant la croissance bactérienne et d'autres molécules inhibitrices de la croissance de la bactérie. Il est par exemple tout à fait possible que la présence de sucres dans ces extraits puisse expliquer ces observations, c'est-à-dire une stimulation de croissance à faible concentration. A plus forte concentration, les principes responsables de l'inhibition de croissance atteignent un seuil de concentration qui leur permet cette inhibition.

Enfin, j'ai testé l'activité de deux formes de cuivre dont le carbonate de cuivre CuCa et l'acétate de cuivre CuAc. Le vert de gris pourrait correspondre à ces deux espèces, avec une récurrence néanmoins plus importante de la forme acétate de cuivre dans les textes anciens. Pour cela, j'ai déposé sur des boîtes ensemencées par chacune des bactéries d'intérêt différentes quantités de ces sels : 1 μ mole, 0,5 μ mole et 0,2 μ mole.

Sur les trois bactéries étudiées, nous avons remarqué la formation de zones claires autour des trois dépôts du CuCa et CuAc, indiquant sur une inhibition de la croissance bactérienne (figure 27). L'effet dose-dépendant est plus visible ici, la diffusion du cuivre dans le milieu gélosé étant probablement plus efficace quelle celle des extraits de plantes. Cependant, le CuCa nécessite une dissolution dans l'acide chlorhydrique, qui suffit à expliquer la formation d'halo autour du dépôt. Ce sel n'est malheureusement pas soluble dans un autre solvant que l'acide et ainsi, nous avons abandonné son utilisation par la suite. Cela correspond aussi à une utilisation plus probable du CuAc dans ces pharmacopées anciennes. Le CuAc, solubilisé dans l'eau a montré une activité antibactérienne contre les souches *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. striatum*.

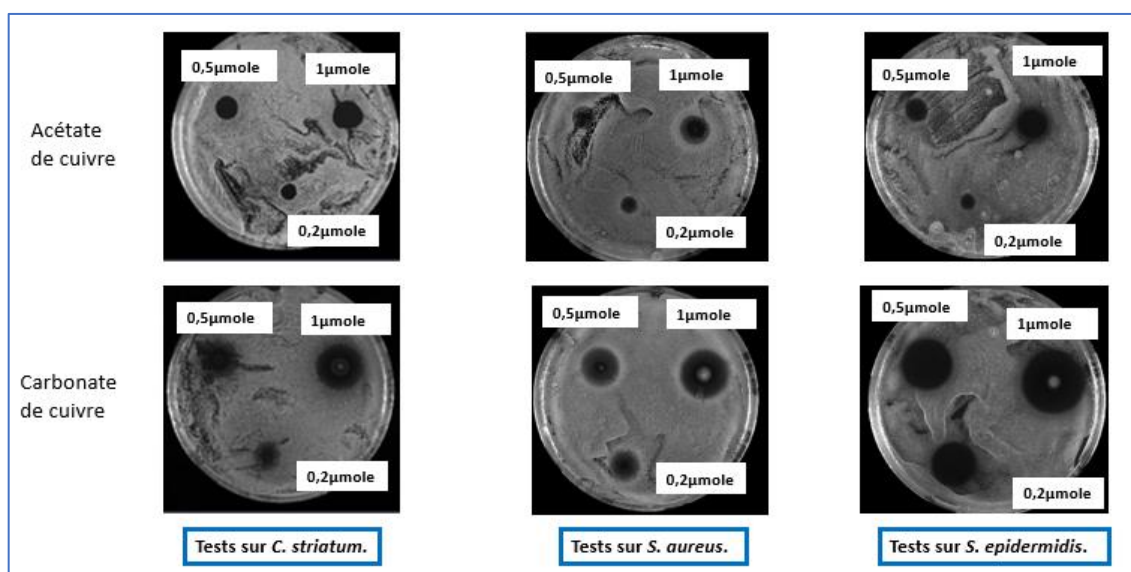


Figure 27 : Test des deux formes du cuivre contre les trois souches pathogènes *C. striatum*, *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Conclusions

Les résultats de ce 2^{ème} remède montrent une activité antibactérienne modérée des extraits de plantes d'*A. ferox* et *C. abyssinicae* sur les trois bactéries *S. aureus*, *S. epidermidis* et *C. striatum*. L'extrait ALOFA a montré une double action à la fois stimulante et inhibitrice de la croissance de *S. aureus*. Ceci peut être dû à plusieurs mécanismes. À faible concentration, l'extrait peut inhiber la croissance de *S. aureus* en perturbant les mécanismes cellulaires de la bactérie. Cependant, à forte concentration, l'extrait peut stimuler la croissance en agissant comme source

de nutriments favorisant ainsi la croissance bactérienne. Il est également possible que l'extrait ALOFA contient une multitude de composés bioactifs ayant différentes activités. Il serait important de poursuivre des recherches approfondies pour comprendre ces mécanismes sous-jacents de ces effets. Une meilleure connaissance des interactions entre les extraits de plantes et les bactéries permettra de mieux cibler ces effets pour des applications thérapeutiques futures. L'acétate de cuivre CuAc a montré ainsi une activité antibactérienne par rapport au carbonate du cuivre CuCa.

Cette partie a été poursuivie par ma collègue Dr. Elora Aubert (UMR 7200 - LIT), qui a pu tester les autres plantes évoquées dans le remède 2 (Gomme ammoniacale et l'Astragale). Dans ses conditions des tests, les extraits de la gomme ammoniacale ont montré une activité bactérienne prometteuse. Par contre, aucune activité bactérienne n'a été montrée pour les extraits de l'astragale.

3. Étude des chélateurs de fer

De nombreuses préparations ne contiennent pas de métaux, ce qui ne veut pas dire que les mécanismes d'action de ces préparations ne font pas intervenir les métaux. En effet, certains métaux (fer, cuivre, zinc, cobalt...) sont ambivalents, ils sont indispensables à tout organisme vivant à faible doses mais toxiques à fortes doses. Or, de nombreuses plantes produisent des polyphénols, qui sont des produits naturels ayant des bienfaits sur la santé humaine tels que des activités antibactériennes ¹⁵⁹. Ces polyphénols peuvent ainsi chélater les métaux indispensables à la vie et ainsi empêcher les bactéries d'y avoir accès ¹⁵⁶.

3.1. Test de l'activité antibactérienne des chélateurs de fer

Nous avons entamé des études sur cette possibilité, dans un premier temps en testant l'impact de quatre chélateurs de fer (figure 28) sur la croissance de différentes bactéries, comme décrit précédemment. Après culture en plaque de 96 puits et en présence de différentes concentrations de chaque chélateur, les courbes de croissance des bactéries ont été analysées pour déterminer les CMI.

Nous n'avons pas pu déterminer la CMI des 4 chélateurs pour *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. striatum*, car les valeurs sont supérieures à 10mM (excepté pour l'exjade sur *S. aureus*). Cependant, des CMI de l'ordre de la dizaine de micro molaire ont été trouvées contre *S. epidermidis*. Ainsi, les 4 chélateurs n'ont pas d'effet sur la croissance des bactéries *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. striatum* alors que 3 d'entre eux (excepté le déferiprone) inhibe la croissance de *S. epidermidis*. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il a été obtenu dans un milieu pourtant riche en fer, ce qui, en général, ne favorise pas la détection d'une activité inhibitrice des chélateurs de fer.

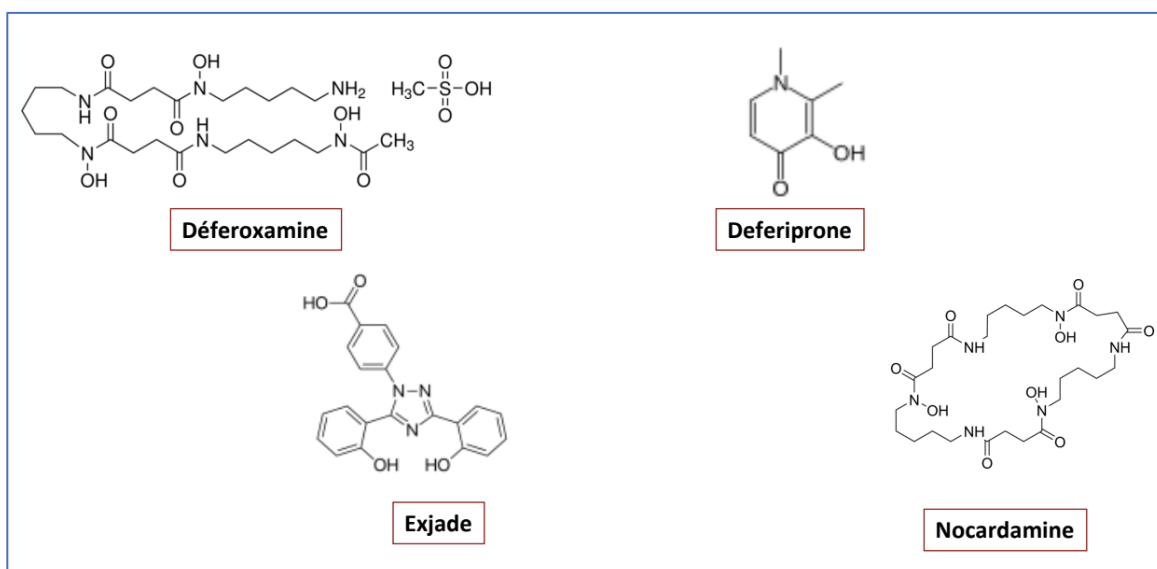


Figure 28 : Structures chimiques des quatre chélateurs de fer étudiés ; déferoxamine, déferiprone, exjade et nocardamine. Ces structures ont été générées par Dr. Mislin de l'UMR7242.

Le tableau 13 suivant présente les CMI déterminées en présence des 4 chélateurs de fer.

Tableau 13 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices des chélateurs de fer contre les souches pathogènes étudiées

Chélateurs de fer Bactéries	Déferoxamine	Déferiprone	Exjade	Nocardamine
<i>S. aureus</i> HG001	-	-	0,5mM	-
<i>S. epidermidis</i> (isolat clinique)	0,01mM	1mM	0,03mM	0,01mM
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	0,01mM	1mM	0,03mM	0,01mM
PAOI	-	-	-	-
<i>C. striatum</i>	-	-	-	-

(-) signifie absence d'inhibition.

Une étude précédente vient en appui de ce résultat. Kim et Shin (2009) ont montré que *S. epidermidis* ne pouvait pas se développer en présence de la forme Fe^{3+} . Les auteurs ajoutent que la croissance de *S. aureus* est inhibée en présence de 1.5mM de la déferiprone¹⁶⁰.

Ces résultats sont intéressants, car ils permettent une action différenciée entre bactéries. Et donc, par exemple, il est possible de cibler spécifiquement une seule espèce de bactéries sans affecter les autres espèces, non pathogènes, présentes dans le microbiote. Ce qui pourrait être intéressant par exemple pour cibler les *S. epidermidis* lorsqu'elles sont responsables d'infections nosocomiales.

Ces résultats suggèrent également que les plantes qui produisent des chélateurs de fer peuvent avoir une action sur la croissance de certaines bactéries à travers la privation de métal. Certains flavonoïdes, par exemple, ont des effets antibactériens, en tuant directement les bactéries, en potentialisant l'action des antibiotiques de manière synergique ou en atténuant la pathogénicité bactérienne ¹⁶¹. Il faudra en tenir compte dans nos prochaines études, notamment lorsque nous identifierons des molécules présentant un pouvoir chélateur potentiel ¹⁵⁶.

3.2. Test de la synergie entre les chélateurs de fer et les antibiotiques sur *S. epidermidis*

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet synergique potentiel entre les antibiotiques et les chélateurs de fer sur *S. epidermidis*. En combinant ces chélateurs avec des antibiotiques dont l'érythromycine, la céfalexine, l'ofloxacine et la tobramycine, nous cherchons à explorer la possibilité d'une action synergique où l'efficacité des deux types de molécules serait renforcée lorsque utilisées en association.

J'ai tout d'abord déterminé les différentes CMI des antibiotiques utilisés couramment en clinique (tableau 14).

Tableau 14 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice des antibiotiques contre *S. epidermidis*.

Antibiotique	Erythromycine	Céfalexine	Ofloxacine	Tobramycine
Bactérie				
<i>S. epidermidis</i>	3µg/mL	1,5µg/mL	6µg/mL	12,5µg/mL

Ensuite, nous avons étudié l'effet synergique, en ajoutant la MIC/2 de deux chélateurs la déféroxamine et la nocardamine dans le milieu MH II, en présence d'une gamme de concentrations d'antibiotiques (allant de 100µg/mL à 195ng/mL) dans un premier temps. Dans un second temps, nous avons ajouté la MIC/2 des antibiotiques dans le milieu MH II en présence d'une gamme de concentrations des chélateurs (allant de 1mM à 1,9µM). Nous évaluerons ainsi si les combinaisons induisent une synergie, en observant des effets inhibiteurs plus marqués que ceux observés avec les antibiotiques ou les chélateurs seuls.

- **Le milieu de culture MH II est supplémenté d'un des antibiotiques à CMI/2, puis une gamme de concentrations allant de 1mM à 1,9µM des chélateurs a été testé.**

Dans ce premier test, nous n'avons pas révélé un effet synergique significatif suite à l'absence d'une inhibition plus prononcée de la croissance de *S. epidermidis* par rapport au test de chélateurs seuls (tableau 15).

Tableau 15 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice des différents chélateurs de fer, en présence d'antibiotiques dans le milieu.

Chélateurs de fer Test	CMI Déféroxamine	CMI Défériprone	CMI Exjade	CMI Nocardamine
Chélateurs de fer seuls	0,01mM	1mM	0,03mM	0,01mM
Chélateurs de fer + CMI/2 d'antibiotiques dans le milieu MH II	0,01mM	1mM	0,03mM	0,01mM

- **Le milieu de culture MH II est supplémenté d'un des deux chélateurs à CMI/2, puis une gamme de concentrations allant de 100µg/mL à 195ng/mL des antibiotiques a été testé.**

Cette étude a mis en évidence une efficacité nettement supérieure des antibiotiques par rapport aux chélateurs de fer (tableau 16). Cette inhibition significative souligne l'important continue des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes. Malgré l'intérêt pour l'utilisation des chélateurs de fer pour priver les bactéries de nutriments essentiels, il est évident que les antibiotiques conservent leur rôle central en tant qu'agents antimicrobiens puissants.

Tableau 16 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice des antibiotiques, en présence de déféroxamine ou nocardamine dans le milieu.

Antibiotiques Test	CMI Erythromycine	CMI Céfalexine	CMI Ofloxacin	CMI Tobramycine
Antibiotiques seuls	3µg/mL	1,5µg/mL	6µg/mL	12,5µg/mL
Antibiotique + CMI/2 de déféroxamine ou nocardamine dans le milieu MH II	195ng/mL	195ng/mL	195ng/mL	195ng/mL

Conclusions

Ces résultats suggèrent que les mécanismes de captation du fer varient d'une bactérie à l'autre et que certaines souches bactériennes peuvent être sensibles à l'effet inhibiteur de certains chélateurs (*S. epidermidis*). Cette étude met en évidence la spécificité de l'effet des chélateurs de fer sur différentes souches bactériennes et souligne leur potentiel en tant qu'outils pour contrôler certaines infections bactériennes (éradiquer les bactéries pathogènes sans impacter les commensales). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche future dans le domaine de la lutte contre les infections bactériennes en ciblant spécifiquement les mécanismes liés au fer

Ainsi, la compréhension de l'interaction entre les chélateurs de fer et les antibiotiques pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches pour lutter contre les infections nosocomiales et potentiellement augmenter l'efficacité des traitements antimicrobiens existants. Il est donc crucial de poursuivre la recherche dans ce domaine, en utilisant d'autres combinaisons de molécules, ou d'autres concentrations pour révéler et confirmer des effets synergiques, qui pourraient être exploités afin de développer de nouvelles thérapies antimicrobiennes.

Les contraintes temporelles, entre mon séjour en France et au Maroc, m'ont empêchées de mener à bien les investigations supplémentaires nécessaires pour approfondir cette étude.

CHAPITRE 2

Ciblage des bactéries pathogènes par des aptamères

Chapitre 2 : Ciblage des bactéries pathogènes par des aptamères

A long terme, l'objectif du projet est de vectoriser les molécules ou combinaisons de molécules, aux foyers infectieux, grâce à des aptamères. Mais avant même d'initier la vectorisation de ces molécules, nous avons souhaité identifier des aptamères spécifiques de certaines bactéries. Ainsi, l'objectif de cette partie est d'identifier des aptamères spécifiques de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*, d'étudier leur spécificité sur des bactéries planctoniques (partie 2-Test de liaison des aptamères aux bactéries) et sur des biofilms bactériens (partie 3-Test de liaison des aptamères aux biofilms).

Pour rappel, plusieurs études, décrites dans l'introduction, ont montré que les aptamères sont des outils prometteurs pour le diagnostic des infections bactériennes (par exemple par liaison à des antigènes bactériens), ou, pour la thérapie (soit par liaison à des protéines essentielles à la croissance et à la survie des bactéries, soit pour la vectorisation).

1. Identification d'aptamères ciblant PAO1, *S. aureus*, *E. coli* et *M. tuberculosis*

J'ai réalisé une recherche bibliographique pour identifier des aptamères ADN simple brin (ADNsb), décrits comme étant spécifiques à des bactéries pathogènes. Nous avons choisi d'utiliser des aptamères à ADN parce qu'ils sont plus stables que les aptamères à ARN et leur coût de synthèse est moindre. En se basant sur différents travaux de la littérature, j'ai répertorié les aptamères ADNsb ciblant *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *M. tuberculosis*. Ces bactéries sont souvent la cause de différentes maladies chez l'homme ou d'autres animaux. Le tableau 17 ci-dessous présente les différents aptamères sélectionnés sur la base de l'étude bibliographique réalisée.

Tableau 17 : Données bibliographiques concernant les aptamères ciblant différentes bactéries pathogènes.

Bactéries ciblées	Aptamère	Bactéries utilisées pour la sélection	Constante d'affinité Kd (nM)	Bactéries utilisées pour la contre-sélection	Technique utilisée pour évaluer la spécificité	Référence
<i>P. aeruginosa</i>	F23	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	17.27 ± 5.00	<i>S. maltophilia</i> ATCC 13637, <i>A. baumannii</i> ATCC 17978	Microscopie à fluorescence	162
	JN27	<i>P. aeruginosa</i> 692 ATCC 14502	26.9 ± 4.6	Aucune contre sélection	Cytométrie en flux	160
<i>E. coli</i>	E1	<i>E. coli</i> KCTC 2571	12,4	<i>K. pneumonia</i> KCTC 2208, <i>C. freundii</i> KCTC 2006, <i>E. aerogenes</i> KCTC 2190, <i>S. epidermidis</i> KCTC 1917	Cytométrie en flux	134
	E2		25,2			
	E10		14,2			
	E12		16,8			
	P1217	<i>E. coli</i> ATCC 25922	56.33 ± 15.87	<i>K. pneumonia</i> ATCC 27853, <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048, <i>P. mirabilis</i> ATCC 00557, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.	Microscopie à fluorescence	133
	P1231		87.03 ± 17.32			
	P1252		11.97 ± 2.94			
	P1255		161.0 ± 34.74			
<i>S. aureus</i>	A14	<i>S. aureus</i> KCCM 12103	3.49 ± 1.43	<i>S. enteritidis</i> KCCM 1201. <i>E. coli</i> KCCM 11234	Cytométrie en flux	161
	A15		Non déterminé			
	SA20	<i>S. aureus</i> ATCC 8325	70.86 ± 39.22	<i>S. epidermidis</i> (26069)	Cytométrie en flux	162
	SA23		61.50 ± 22.43			
	SA31		82.86 ± 33.20			
	SA34		72.42 ± 35.23			
	SA43		210.70 ± 135.91			
<i>M. tuberculosis</i>	Mtb36	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	5.09 ± 1.43	<i>M. bovis</i> , <i>E. coli</i>	qPCR	163
	NK2		5,4 x 10 ³	-		103

M. tuberculosis étant classé dans la catégorie de risque 3 des bactéries, doit être manipulé dans un laboratoire de confinement de niveau 3 selon les lignes directives de l'OMS ¹⁶³. C'est pour cela que nous n'avons pas pu collectionner des souches de *M. tuberculosis* et de synthétiser les aptamères sélectionnés contre cette bactérie. Cette bactérie pathogène est l'une des 10 principales causes de décès à l'échelle mondiale ¹⁶⁴. Le Maroc est l'un des pays qui n'a pas échappé à ce fléau jusqu'à aujourd'hui. En 2019, l'OMS a enregistré 35000 nouveaux cas et 2900 décès ¹⁶⁵. Le développement d'outils innovants, comme l'introduction des aptamères, pour la détection précoce de la tuberculose pourrait participer à l'éradication de ce fléau.

Nous avons donc choisi de faire synthétiser uniquement un ou deux aptamères ciblant les bactéries PAO1, *S. aureus* et *E. coli*, en se basant sur les constantes d'affinité Kd (quand nous avons le choix, nous avons sélectionné les aptamères ayant la meilleure affinité) et sur la taille de la séquence qui devait être la plus petite possible pour une synthèse facile et rapide.

Le tableau 17 ci-dessus présente les cinq différents aptamères avec lesquels nous avons travaillé et résumant quelques données de la littérature. Ces aptamères ont été synthétisés par la société *Eurogentec Inc.* avec un fluorophore en 5' pour une utilisation en microscopie confocale. La séquence de ces cinq aptamères, leur taille et les étiquettes des fluorophores sont également décrites dans le tableau 18.

Tableau 18 : Description des aptamères sélectionnés pour l'étude des bactéries PAO1, *E. coli* et *S. aureus*

Aptamère	Fluorophore utilisé	Séquence	Taille (nt)
F23	Cyanine 5 (Cy5)	5'-(Cy5) CCC CCG TTG CTT TCG CTT TTC CTT TCG CTT TTG TTC GTT TCG TCC CTG CTT CCT TTC TTG-3'	60
E2	Alexa 568 (A1568)	5'-(Alexa568) CCA TGA GTG TTG TGA AAT GTT GGG ACA CTA GGT GGC ATA GAG CCG-3'	45
P1231	Alexa 568 (A1568)	5'-(Alexa568) TCA TCG GGA TAC CTG GTA AGG ATA-3'	24
A14	FITC	5'-(FITC) CAC ACC GCA GCA GTG GGA ACG TTT CAG CCA TGC AAG CAT CAC GCC CGT-3'	48
SA23	FITC	5'-(FITC) GCA ATG GTA CGG TAC TTC CCA AAA GTG CAC GCT ACT TTG CTA A-3	43

2. Test de liaison des aptamères aux bactéries planctoniques

2.1. Liaison d'un aptamère par bactérie

Afin de vérifier la spécificité de liaison de chacun des 5 aptamères, nous avons réalisé des études comparatives par imagerie confocale sur les trois souches bactériennes *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*. Dans un premier temps, indépendamment les uns des autres, les cinq aptamères couplés à différents fluorophores ont été utilisés à différentes concentrations et ont été incubés avec les trois souches fixées au PFA, puis montés sur des lames et observés par microscopie confocale. Il s'agit donc d'essais fonctionnels sur des bactéries mortes.

La figure 29 ci-dessous représente un schéma explicatif du test de liaison d'un aptamère à une bactérie. Il se résume en trois étapes ; la première consiste à préparer les bactéries et les fixer au PFA 4%. La deuxième consiste à monter sur lames les bactéries à $DO_{600nm} = 1$. La lame est ensuite saturée en protéines et acides nucléiques par ajout de 10 μ L de Tampon d'Hybridation + BSA (10mg/mL) + ARNt (1 μ g/mL). Ensuite l'aptamère à étudier est ajouté. L'ADN bactérien est marqué au DAPI pendant 45min à l'abri de la lumière. Les lamelles sont fixées sur les lames avec le milieu de montage. Finalement, l'analyse et la visualisation des lames sont réalisées en microscopie confocale.

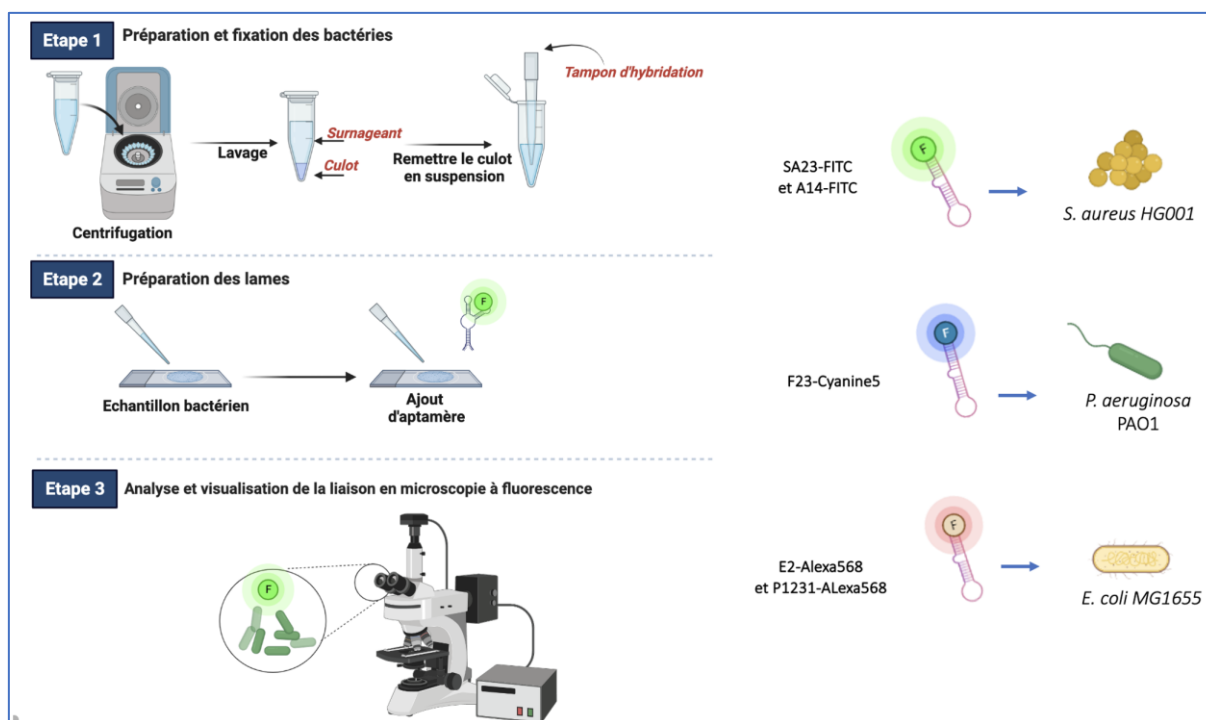


Figure 29 : Schéma explicatif des tests de liaison des aptamères aux bactéries. **A gauche**, le protocole du test de liaison qui s'effectue en 3 étapes. **A droite**, les aptamères choisis pour les tests de liaison. Pour *S. aureus*, deux aptamères ont été sélectionnés, nommés SA23 et A14, couplés au fluorophore FITC. Un aptamère F23 couplé à la Cy5 pour PAO1. Deux aptamères E2 et P1231 couplés à l'Alexa568 pour *E. coli*.

- **Aptamère F23**

L'aptamère F23 avait été décrit par Wang et al (2011) comme étant un ligand de PAO1¹⁶². Les auteurs l'avaient testé à une concentration de 0,4 μ M. Nous avons donc testé la liaison de l'aptamère F23 marqué à la cyanine 5 (Cy5-F23) à la concentration de 0,4 μ M sur les trois souches bactériennes PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. Des images de microscopie confocale représentatives des tests de liaison sont illustrées sur la figure 30. Les résultats montrent que l'aptamère Cy5-F23 à 0,4 μ M se lie parfaitement à PAO1. En effet, la fluorescence de l'aptamère F23 couplé à la Cyanine 5 est visible en blanc et l'image se superpose parfaitement à la fluorescence émise par le DAPI marquant l'ADN de PAO1. En revanche, aucun marquage n'est détecté sur *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. Ces expériences confirment la spécificité de l'aptamère F23 pour PAO1, comparé à *E. coli* et *S. aureus*.

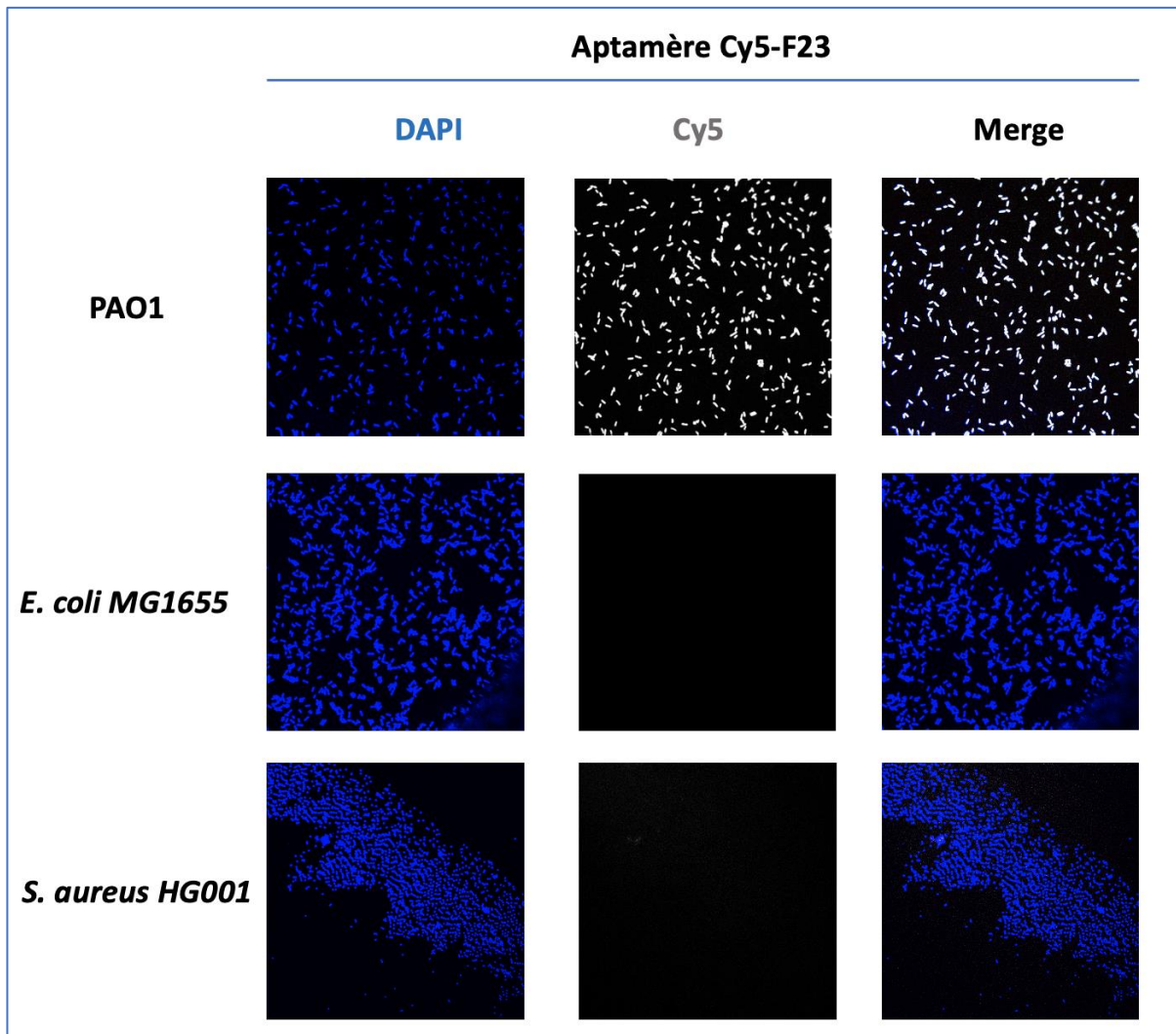


Figure 30 : Test de liaison de l'aptamère F23 sur les souches PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. L'aptamère F23 (0,4 μ M) couplé à la cyanine 5 Cy5 (Cy5-F23) a été incubé séparément avec les 3 bactéries *E. coli*, *S. aureus* et PAO1. Les images, représentatives du résultat des tests de liaison de l'aptamère F23 sur différentes souches bactériennes, sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Pour visualiser les bactéries, l'ADN bactérien est marqué au DAPI (représenté en bleu). Les bactéries marquées par l'aptamère Cy5-F23 sont imagées en gris.

- **Aptamères E2 et P1231**

Les aptamères E2 et P1231 ont été décrits dans la littérature comme spécifiques à *E. coli*^{136,137}. Ils avaient été testés dans ces publications à des concentrations de 0,25 à 0,4µM respectivement. Dans notre étude, à une concentration de 0,36µM, aucune liaison à *E. coli MG1655*, ni PAO1 ni *S. aureus HG001* n'a été détectée. Ainsi, nous avons augmenté la concentration des deux aptamères.

A une concentration de 1,8µM, et dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de liaison de l'aptamère P1231 couplé à l'Alexa 568 (A1568-P1231) à aucune des trois souches testées (figure 31).

Par contre, l'aptamère E2 à 1,8µM permet de détecter *E. coli MG1655*. Sur la figure 32, ce résultat est montré par le marquage des bactéries d'*E. coli MG1655* en rouge et par la superposition parfaite des marquages au DAPI et à l'Alexa 568.

Nous avons donc choisi l'aptamère E2 en tant qu'aptamère spécifique d'*E. coli* pour la suite des expériences, et notamment pour les expériences de multiplexing (mélange).

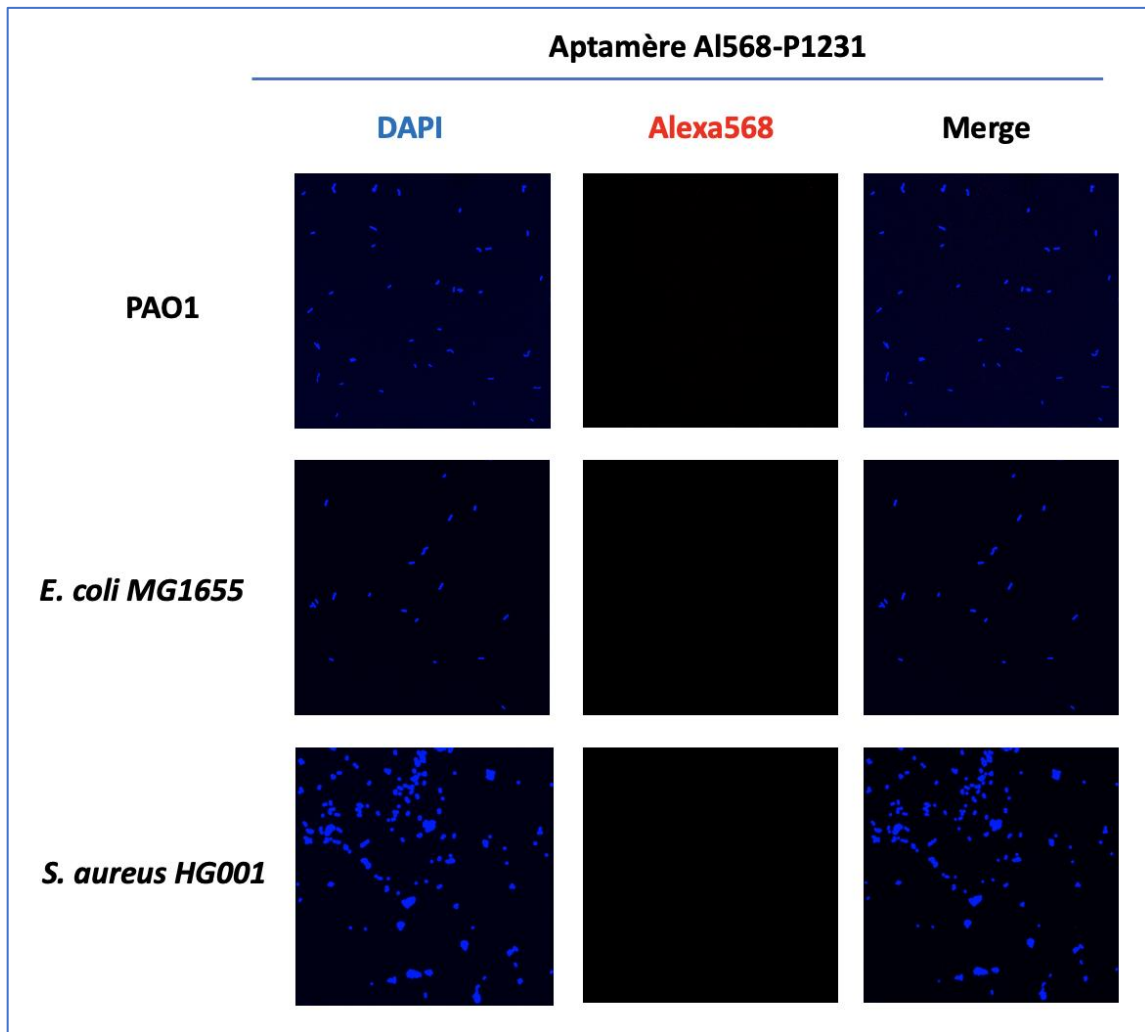


Figure 31 : Test de liaison de l'aptamère P1231 sur les souches PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. L'aptamère P1231 (1,8 μ M) couplé à l'Alexa568(AI568-P1231) a été incubé séparément avec les 3 bactéries *E. coli*, *S. aureus* et PAO1. Les images, représentatives du résultat des tests de liaison de l'aptamère P1231 sur différentes souches bactériennes, sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Pour visualiser les bactéries, l'ADN bactérien est marqué au DAPI (représenté en bleu). Les bactéries ne sont pas marquées à l'aptamère suite à l'absence de la fluorescence rouge émise par l'Alexa568.

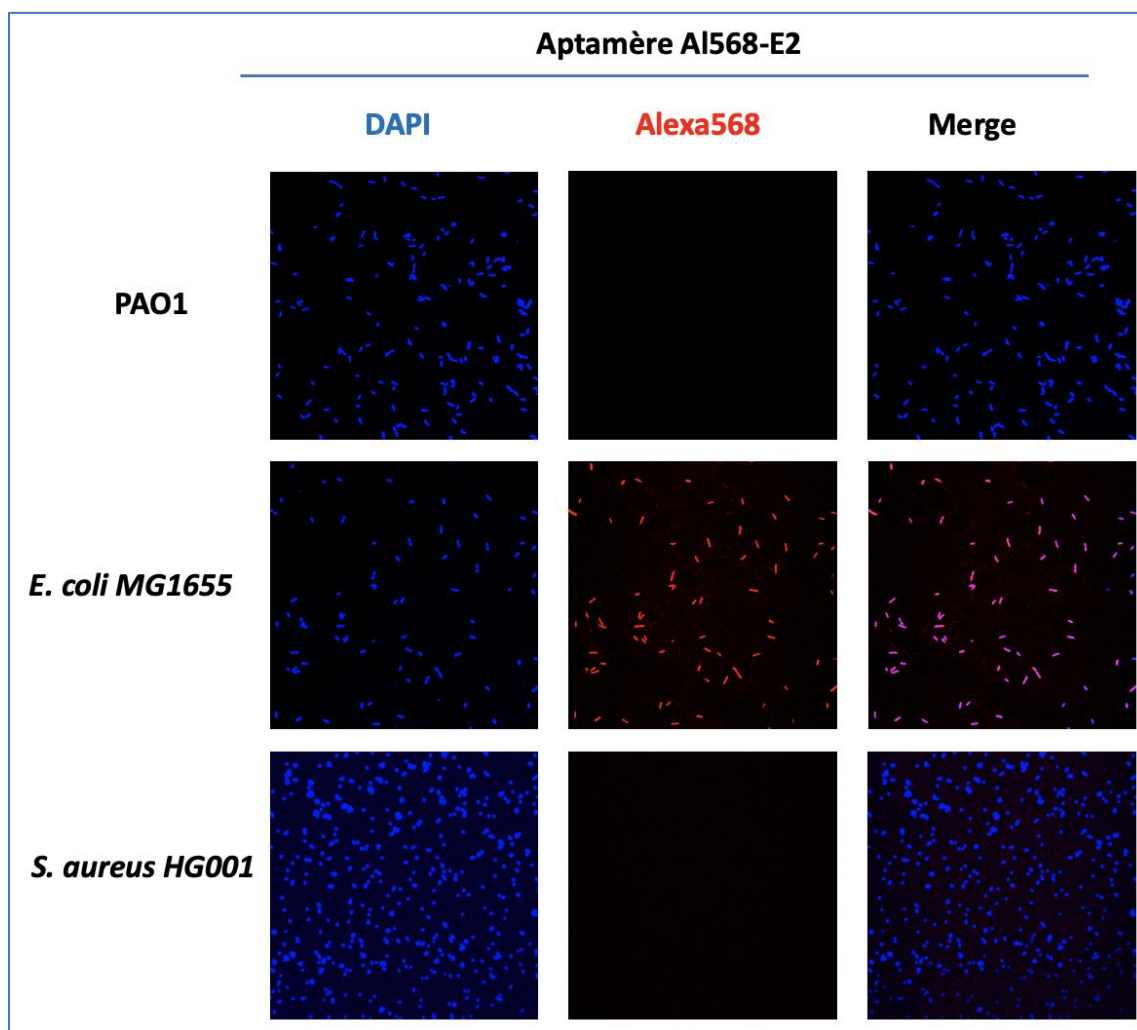


Figure 32 : Test de liaison de l'aptamère E2 sur les souches PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. L'aptamère E2 (1,8 μ M) couplé à l'Alexa568(A1568-E2) a été incubé séparément avec les 3 bactéries *E. coli*, *S. aureus* et PAO1. Les images, représentatives du résultat des tests de liaison de l'aptamère E2 sur différentes souches bactériennes, sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Pour visualiser les bactéries, l'ADN bactérien est marqué au DAPI (représenté en bleu). L'aptamère E2 marque *E. coli* suite à la présence de la fluorescence émise en rouge par l'Alexa568.

- **Aptamères SA23 et A14**

Les aptamères SA23 et A14 ont été décrits comme spécifiques à *S. aureus*. Les essais décrits dans la littérature ont été réalisés à des concentrations de 240 et 10nM respectivement ^{166,167}. Dans nos expériences, les deux aptamères sont conjugués au FITC. Ils ont été testés à différentes concentrations de 0,36 à 1,8 μ M sur les trois souches de PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* H001.

Dans nos conditions expérimentales, aucun marquage n'a été détecté sur les trois bactéries étudiées. Les figures 33 et 34 montrent les résultats des aptamères A14 et SA23, respectivement, à la concentration de 1,8 μ M.

Pourquoi ces deux aptamères, décrits dans la littérature comme spécifiques de *S. aureus*, ne se lient pas à cette bactérie dans nos expériences et pourtant à des concentrations plus élevées ? Nous pouvons avancer trois hypothèses : soit ces deux aptamères A14 et le SA23 décrits par Moon et al (2015) et Cao et al (2009) dans la littérature bactéries ‘vivantes’ et n’ont pas été fixées au PFA comme dans nos expériences ^{166,167}. Deuxièmement, il se peut que ces aptamères soient spécifiques aux souches que les auteurs ont utilisées *S. aureus KCCM 12103* et *S. aureus ATCC 8325*, respectivement. La troisième hypothèse pourrait être technique, puisque les auteurs ont validé les liaisons aptamères-cellules bactériennes par cytométrie en flux, alors que nous n’avons utilisé la microscopie confocale.

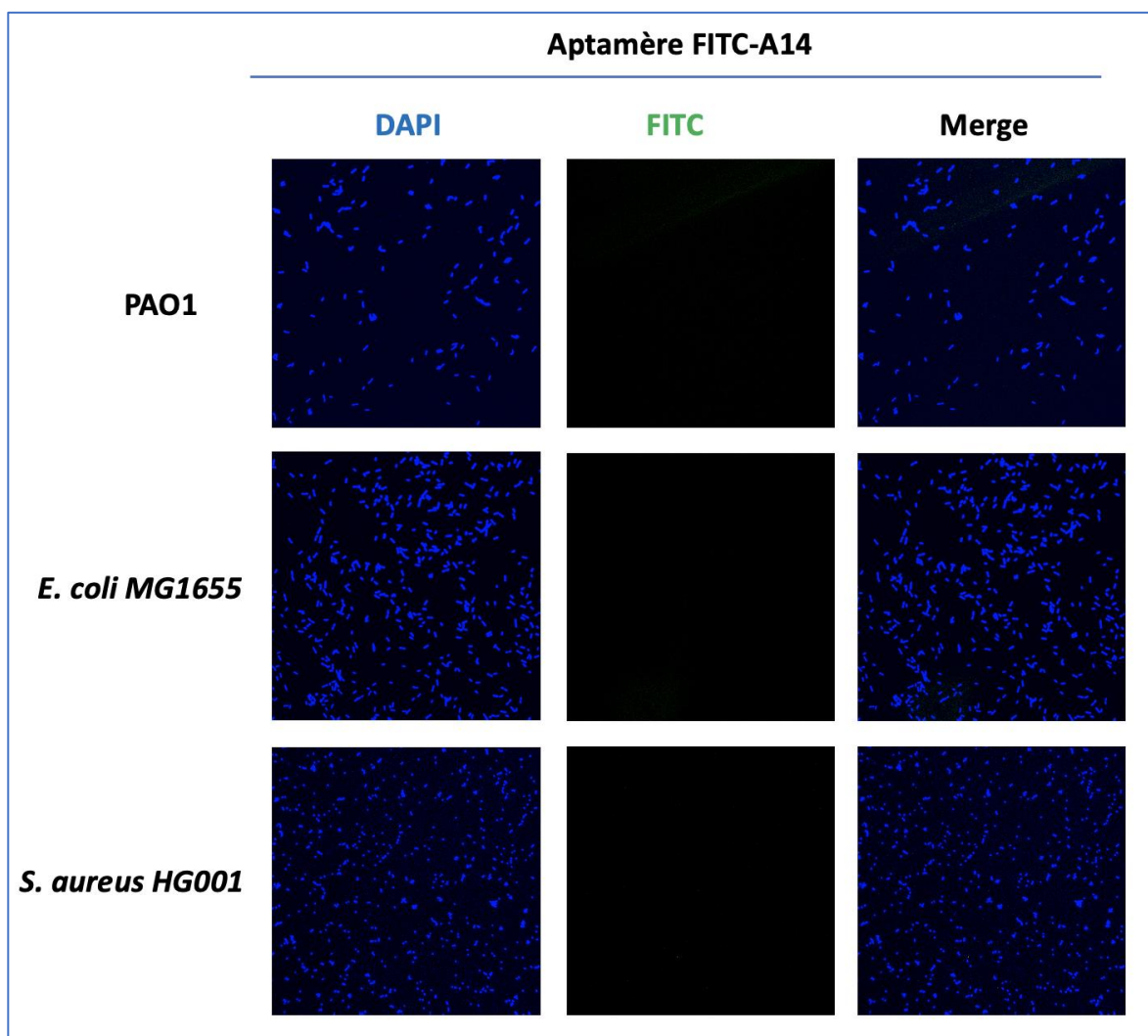


Figure 33 : Test de liaison de l'aptamère A14 sur les souches PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. L'aptamère A14 (1,8 μ M) couplé à la FITC (FITC-A14) a été incubé séparément avec les 3 bactéries *E. coli*, *S. aureus* et PAO1. Les images, représentatives du résultat des tests de liaison de l'aptamère A14 sur différentes souches bactériennes, sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Pour visualiser les bactéries, l'ADN bactérien est marqué au DAPI (représenté en bleu). Les bactéries ne sont pas marquées à l'aptamère suite à l'absence de la fluorescence verte émise par la FITC.

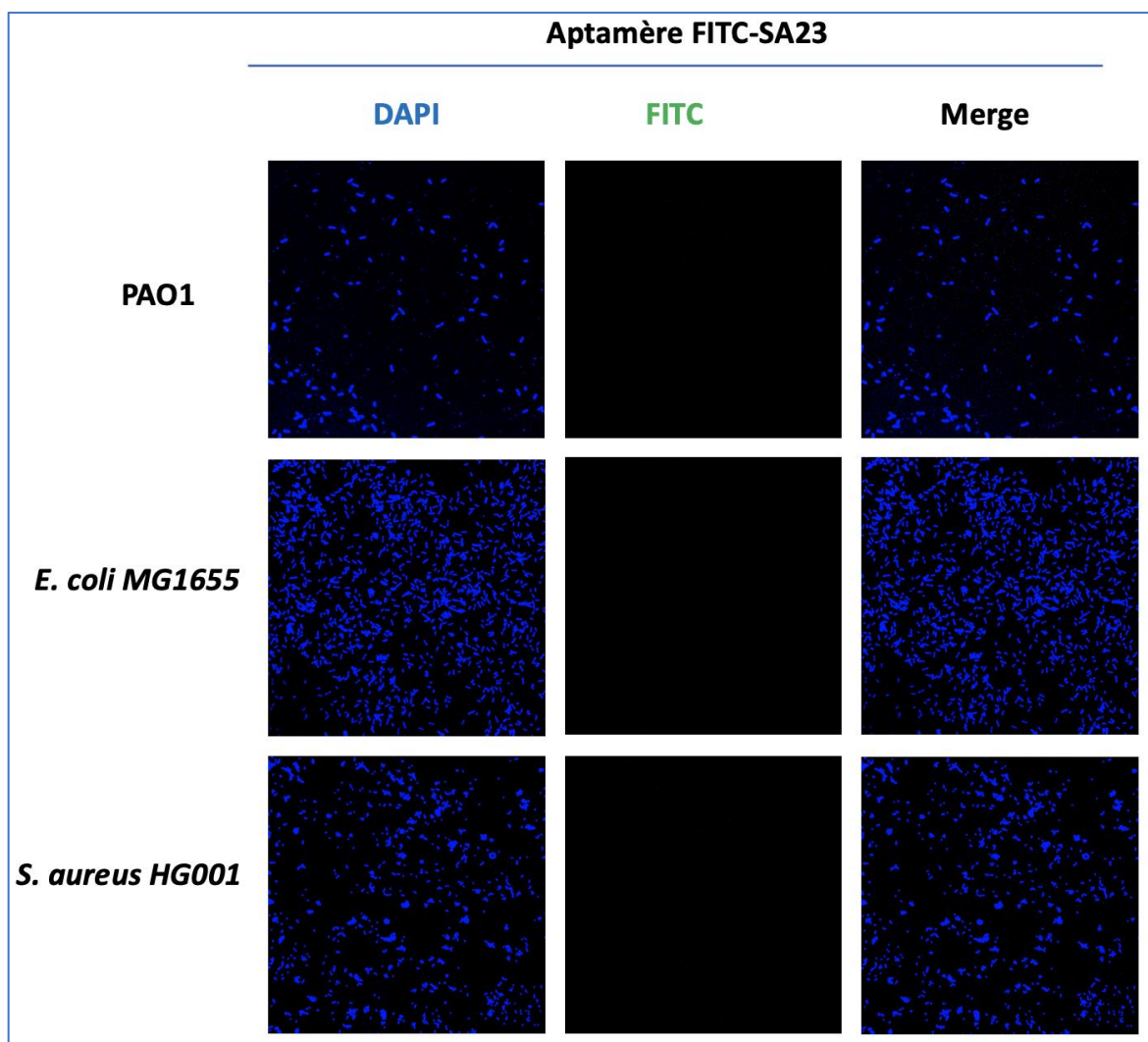


Figure 34 : Test de liaison de l'aptamère SA23 sur les souches PAO1, *E. coli* MG1655 et *S. aureus* HG001. L'aptamère SA23 (1,8 μ M) couplé à la FITC (FITC-SA23) a été incubé séparément avec les 3 bactéries *E. coli*, *S. aureus* et PAO1. Les images, représentatives du résultat des tests de liaison de l'aptamère SA23 sur différentes souches bactériennes, sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Pour visualiser les bactéries, l'ADN bactérien est marqué au DAPI (représenté en bleu). Les bactéries ne sont pas marquées à l'aptamère suite à l'absence de la fluorescence verte émise par la FITC.

2.2. Liaison d'un ou de deux aptamères sur un mélange de deux bactéries

Notre objectif à long terme est d'utiliser les aptamères pour vectoriser les fractions actives des remèdes 1 et/ou 2 spécifiquement aux bactéries ciblées. Il sera donc particulièrement important que les aptamères utilisés pour cette vectorisation ciblée, ne délivrent pas des molécules cytotoxiques à d'autres bactéries du foyer infectieux que les bactéries à éliminer. Nous avons donc réalisé des tests de liaison d'un aptamère (F23 ou E2) ou d'un mélange d'aptamères (F23 + E2) sur les bactéries PAO1, *E. coli* et *S. aureus*. Le même protocole que celui décrit ci-dessus a été suivi (partie matériels et méthodes, 4. Test de l'apta-fluorescence), sauf que les deux souches différentes de bactéries ont été mélangées dans un rapport 1/1.

La figure 35 ci-dessous explique schématiquement les étapes du test. Dans un premier temps, les bactéries ont été préparées et fixées au PFA 4%, puis elles ont été mélangées dans un tube avant d'être déposées sur lame. L'aptamère est ensuite ajouté. Dans un deuxième temps, les bactéries préparées et fixées au PFA 4% ont été ajoutées une par une sur lame, puis l'aptamère est ajouté. Quand il s'agit d'un mix d'aptamères, nous les avons préparés séparément puis mélangés dans un tube avant de les déposer sur lame.

Les aptamères Cy5-F23 et/ou Al568-E2 ont été ajoutés à des concentrations de 0,4 μ M et 1,8 μ M, respectivement. Enfin, la détection a été réalisée par microscopie confocale. Les figures montrées dans cette partie présentent des résultats préliminaires puisque les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois au cours de ma thèse.

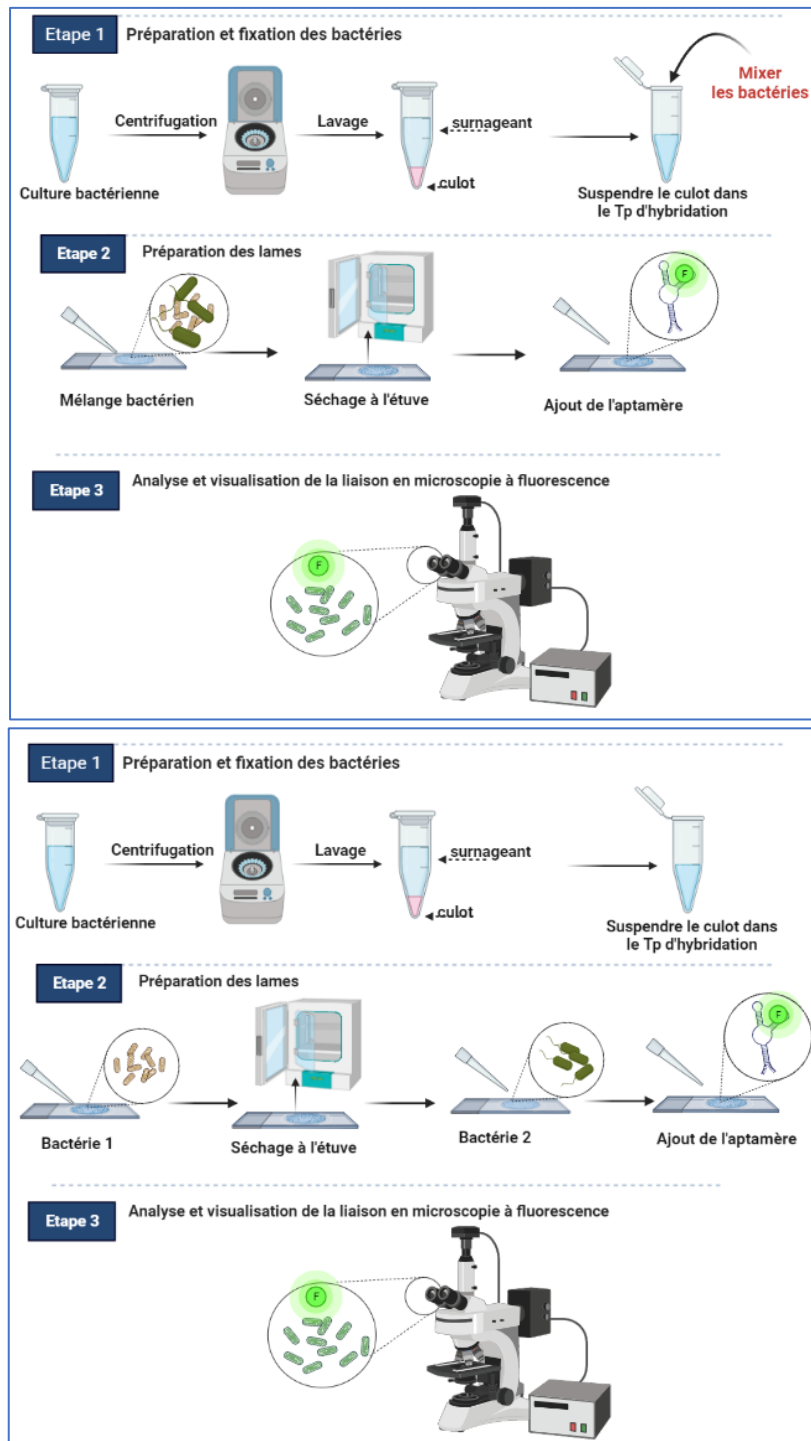


Figure 35 : Schéma explicatif correspondant au protocole utilisé pour tester les aptamères ciblant un mélange bactérien.

En haut : Les bactéries ont été préparées et ont été fixées au PFA 4% puis mélangées dans un ratio 1/1 dans un tube Eppendorf avant d'être déposées sur lame. Ensuite l'aptamère ou un mélange d'aptamère est ajouté.

En bas : Les bactéries fixées au PFA 4% ont été ajoutées séparément sur lame, puis l'aptamère ou un mélange d'aptamères est ajouté.

- **Aptamère F23 sur les mélanges PAO1+*E. coli* MG1655 et de PAO1+*S. aureus* HG001**

En ce qui concerne l'aptamère F23, les premiers résultats montrent que :

- Sur un mélange de PAO1-GFP et *E. coli* MG1655 (figure 36, images du haut), l'ADN bactérien de PAO1-GFP et d'*E. coli* sont marqués en bleu (DAPI). La fluorescence émise par la Cy5, couplée à l'aptamère F23, visualisée en rouge, se superpose parfaitement aux signaux de fluorescence émis par la GFP visualisée en vert. Nous remarquons une colocalisation en jaune de la GFP (PAO1) avec la Cyanine5 de l'aptamère F23 (figure 36, image GFP+Cy5). En revanche, nous avons noté un faible marquage de l'aptamère F23 sur les *E. coli* suite à la présence d'une colocalisation en violet (figure 36, image DAPI+Cy5) sur des bacilles correspondants à *E. coli*.
- Sur un mélange de PAO1 et *S. aureus* HG001 (figure 36 images du bas), l'aptamère se lie uniquement sur les bacilles de PAO1. Sur cette lame, PAO1 est marquée uniquement au DAPI. Sur l'image du Merge (superposition de tous les canaux), nous constatons la présence de bacilles en violet, indiquant ainsi sur la colocalisation de la Cy5 de l'aptamère F23 et DAPI (ADN bactérien PAO1). Les cocci en bleu correspondent aux *S. aureus* qui sont marquées uniquement en DAPI (figure 36).

Au niveau de l'image du *Merge* de tous les canaux de la figure 36-images du haut, nous observons la présence de 2 couleurs : un violet ou pourpre qui correspond soit à *E. coli* (superposition du DAPI avec Cy5) ou PAO1-GFP (superposition du DAPI et Cy5). Une couleur blanche qui correspond à la superposition du DAPI avec GFP et Cy5 (PAO1-GFP). Au niveau de l'image du *Merge* du bas (figure 36), nous observons la présence de 2 couleurs : des bacilles en violet correspondant à PAO1 (DAPI-Cy5) et des cocci en bleu correspondants à *S. aureus* (DAPI seulement).

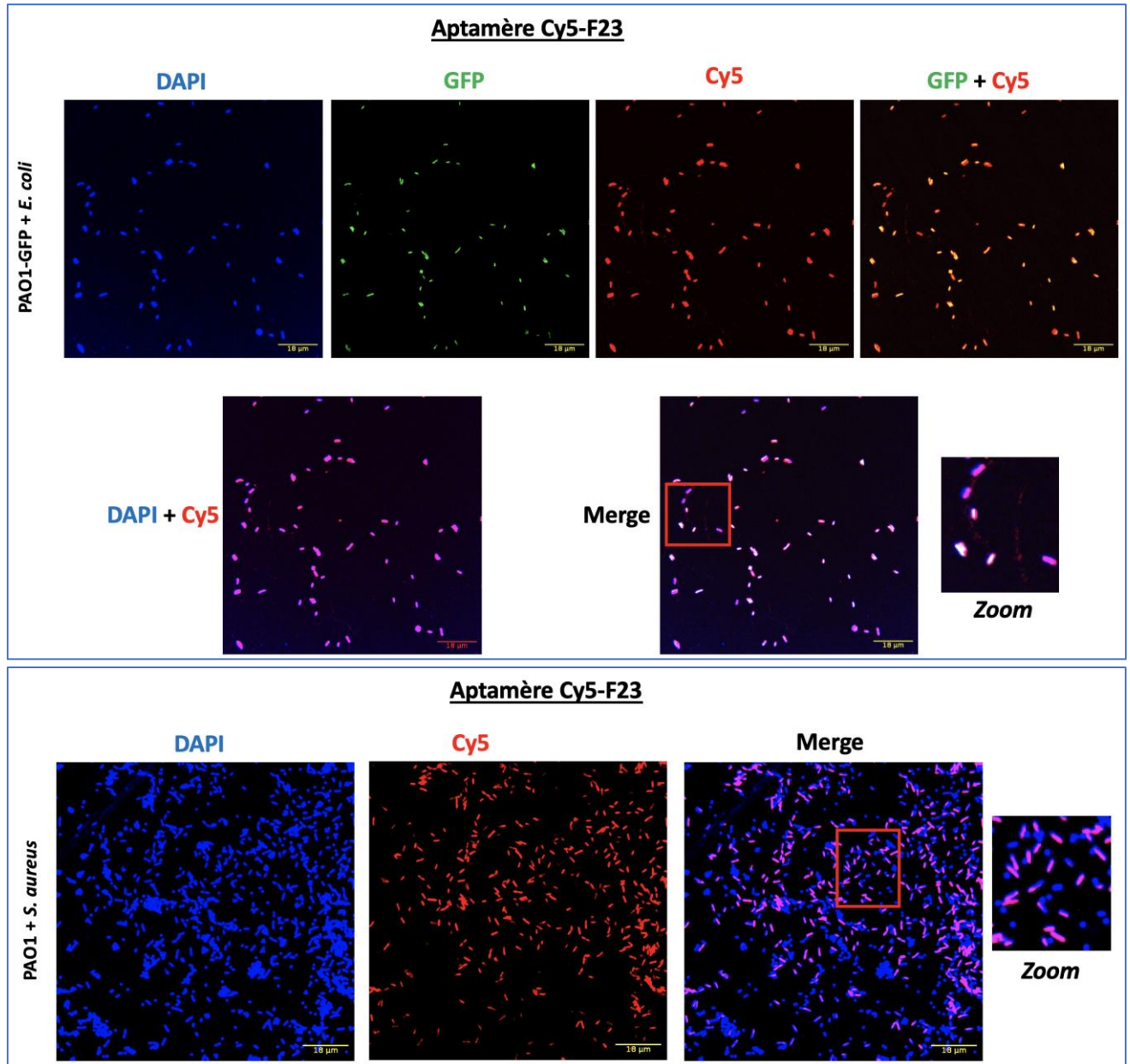


Figure 36 : Test de la liaison de l'aptamère F23 sur différents mélanges bactériens.

L'aptamère F23 (0,4 μ M) couplé à la cyanine 5 **Cy5** (représenté en **rouge**) e été incubé avec un mélange de PAO1-GFP + *E. coli* (**Image du haut**) et PAO1 + *S. aureus* (**Image du bas**). L'ADN bactérien des trois bactéries est marqué au DAPI et est visualisé en bleu. **PAO1-GFP** est représenté en **vert** (images du haut uniquement). Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Les images GFP+Cy5 et DAPI+Cy5 montrent la colocalisation du marquage de l'aptamère F23 avec les bactéries de PAO1-GFP (**colocalisation Cy5-GFP en jaune**) et avec les *E. coli* (**colocalisation DAPI-Cy5 en violet**), respectivement. Sur le mélange PAO1 + *S. aureus*, l'aptamère F23 ne marque pas les cocci de *S. aureus*. Scale bar = 18 μ m.

- **Aptamère E2 sur les mélanges PAO1-GFP+*E. coli* MG1655 et de *E. coli* MG1655+S. aureus H001**

En ce qui concerne l'aptamère E2, les premiers résultats montrent que :

- Sur un mélange de PAO1-GFP avec *E. coli* MG1655 (figure 37, images du haut), l'ADN bactérien de PAO1-GFP et d'*E. coli* sont marqués en bleu (DAPI). La fluorescence émise par l'Alexa568, couplée à l'aptamère E2, est visualisée en rouge. Nous remarquons au niveau de la figure 37, sur l'image du *Merge* et le *Zoom*, une colocalisation en violet (DAPI+Cy5), indiquant sur la superposition du DAPI (bacilles d'*E. coli*) avec l'Alexa568 (aptamère E2). Cependant, l'aptamère E2 marque également les PAO1, suite à la superposition de la GFP (PAO1) avec l'Alexa568 (aptamère E2), induisant une colocalisation en jaune (figure 37, image du GFP + Alexa568).
- Sur un mélange d'*E. coli* MG1655 avec *S. aureus* HG001, l'aptamère E2 ne se lie pas à *E. coli*, ni aux cocci de *S. aureus*, suite à l'absence de la fluorescence rouge émise par l'Alexa568 (figure 37, images du bas).

Au niveau de l'image du *Merge* de tous les canaux de la figure 37 (images du haut), nous observons la présence de 2 couleurs : un violet ou pourpre qui correspond soit à *E. coli* (superposition du DAPI avec A1568) ou PAO1-GFP (superposition du DAPI et A1568). La couleur blanche correspond à la superposition des canaux DAPI, GFP et A1568 (PAO1-GFP). Au niveau de l'image du *Merge* du bas (figure 37), nous observons la présence d'une seule couleur bleu correspondante au DAPI, sous deux formes : des bacilles d'*E. coli* et des cocci de *S. aureus*.

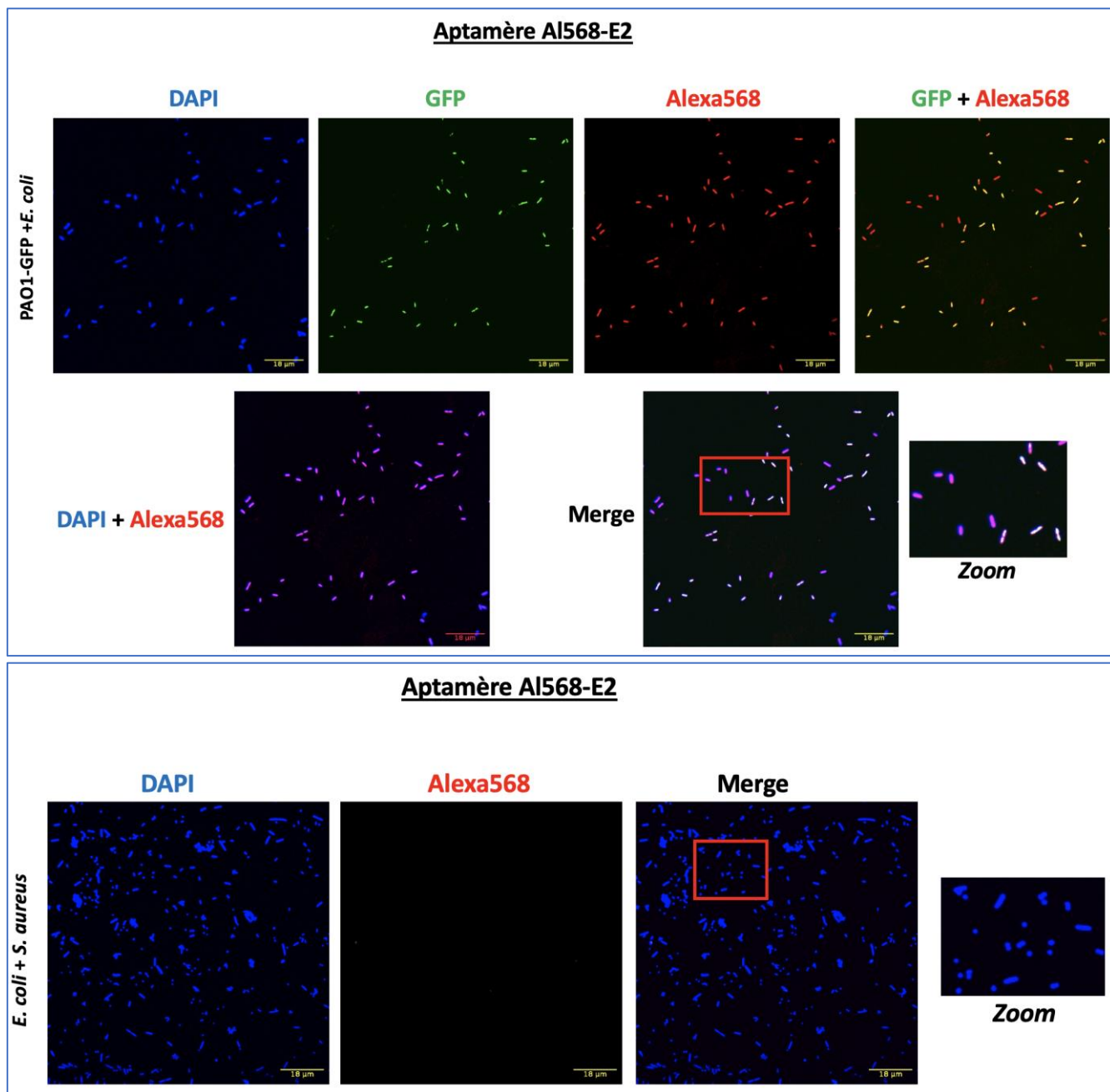


Figure 37 : Test de la liaison de l'aptamère E2 sur différents mélanges bactériens.

L'aptamère E2 (1,8μM) couplé à l'**Alexa fluor568** (représenté en **rouge**) e été incubé avec un mélange de PAO1-GFP + *E. coli* (**Image du haut**) et *E. coli* + *S. aureus* (**Image du bas**). L'ADN bactérien des trois bactéries est marqué au DAPI et est visualisé en bleu. PAO1-GFP est représenté en **vert**. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Les images DAPI+Alexa568 montrent la **colocalisation du marquage de l'aptamère E2** avec les bactéries d'*E. coli* en **violet**, mais également avec les PAO1-GFP (**colocalisation GFP+Alexa568 en jaune**). Sur un mélange d'*E. coli* + *S. aureus*, l'aptamère E2 ne se lie pas à *E. coli*, ni aux cocci des *S. aureus* (absence de fluorescence rouge émise par l'Alexa568). Scale bar = 18μm.

- **Aptamères Cy5-F23+Al568-E2 sur le mélange PAO1-GFP+E. coli MG1655**

Puis, nous avons mélangé les aptamères Cy5-F23 + Al568-E2 et les avons mis en contact du mélange PAO1-GFP+E. coli MG1655 (figure 38).

Nous n'observons pas de signal de fluorescence dans le canal correspondant à l'Alexa568 (en blanc), ce qui signifie qu'aucune des deux bactéries PAO1-GFP et *E. coli* MG1655 n'est marquée par l'aptamère E2. L'ADN bactérien de PAO1-GFP et d'*E. coli* sont marqués au DAPI en bleu. Nous avons remarqué la colocalisation du marquage de l'aptamère F23 avec les PAO1-GFP qui s'exprime en jaune (figure 38, image de GFP+Cy5). Ainsi, une colocalisation en violet de de l'aptamère F23 avec les *E. coli* suite à la superposition du DAPI (bacilles d'*E. coli*) avec de la Cy5 (aptamère F23) (figure 38, image DAP+Cy5).

Au niveau de l'image du *Merge* de tous les canaux de la figure 38, nous observons la présence de 2 couleurs : un violet ou pourpre qui correspond soit à *E. coli* (superposition du DAPI avec Cy5) ou PAO1-GFP (superposition du DAPI et Cy5). Une couleur blanche qui correspond à la superposition des canaux DAPI, GFP et Cy5 (PAO1-GFP).

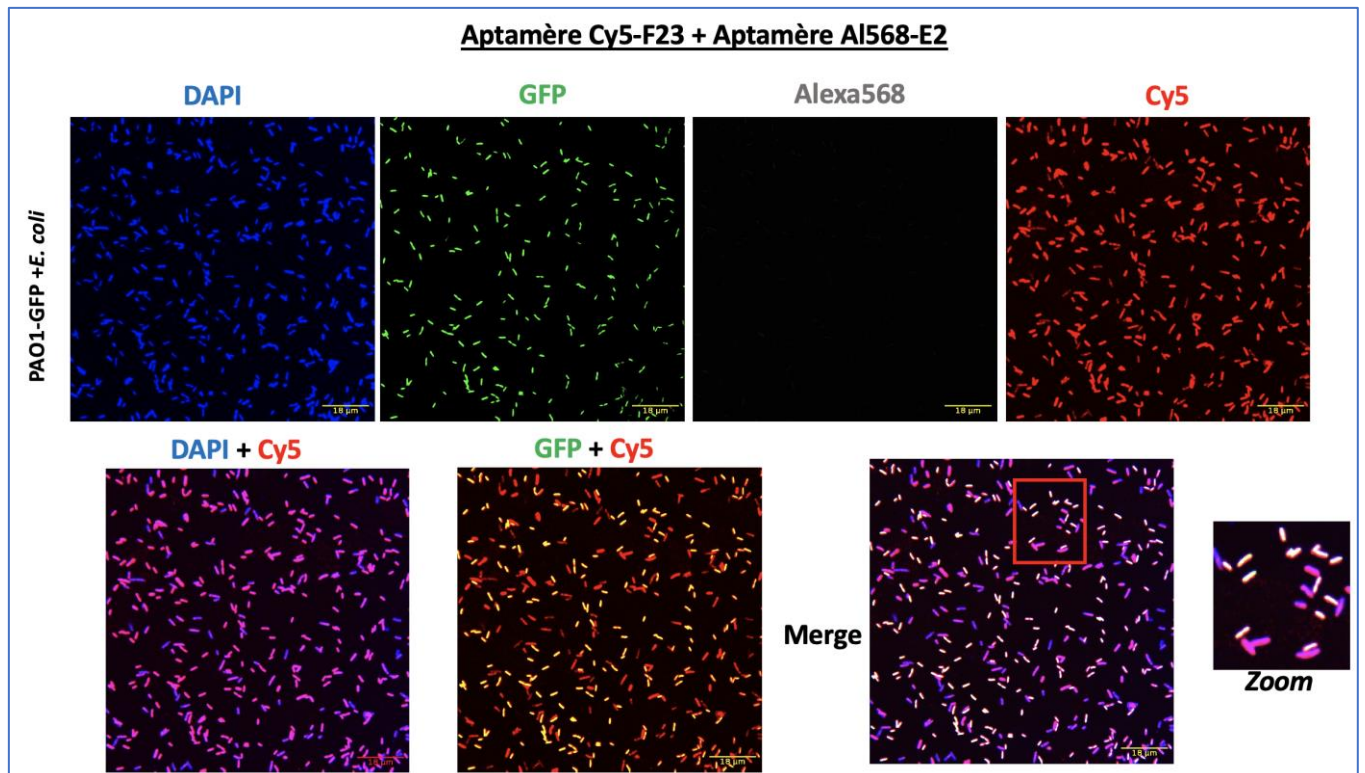


Figure 38 : Test de la liaison du mélange des aptamères F23 et E2 sur le mélange PAO1 GFP avec *E. coli*.

Le mélange d'aptamère F23 (0,4 μM), couplé à la **Cy5** et visualisé en **rouge**, et de l'aptamère E2 (1,8 μM), couplé à l'Alexa fluor 568 et visualisé en blanc, a été incubé avec un mélange de PAO1-GFP + *E. coli*. L'ADN bactérien des deux bactéries est marqué au DAPI et est visualisé en bleu. PAO1-GFP est représenté en **vert**. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale. Les images GFP+Cy5 et DAPI+Cy5 montrent la colocalisation du marquage de l'aptamère F23 avec les bactéries de PAO1-GFP (**colocalisation Cy5-GFP en jaune**), et avec les *E. coli* (**colocalisation en violet**) respectivement. Aucune liaison n'a été constatée pour l'aptamère E2 suite à l'absence de la fluorescence en blanc émise par l'Alexa568. Scale bar = 18 μm.

Conclusions

Ces expériences d'aptamères en mélange testés sur des mélanges de bactéries sont préliminaires. A l'heure actuelle, nous avons identifié les aptamères Cy5-F23 et A1568-E2 ciblant les bactéries PAO1 et *E. coli MG1655* respectivement. Dans les conditions expérimentales testées, nous n'avons pas identifié d'aptamères spécifiques à *S. aureus HG001* (figures 30 à 34).

Ensuite, nous avons testé la liaison des aptamères Cy5-F23 et A1568-E2 sur des mélanges bactériens. Nos résultats du test de liaison des aptamères aux mélanges bactériens montrent que :

- L'aptamère F23 se lie aux bacilles de PAO1 et également d'*E. coli*, avec une liaison qui reste nulle aux cocci de *S. aureus* (figure 36).
- L'aptamère E2 se lie aux bacilles d'*E. coli* et à PAO1, mais pas aux cocci de *S. aureus* (figure 37).
- Le mix des deux aptamères F23 et E2 a montré une liaison positive de l'aptamère F23 sur les PAO1 et sur les *E. coli*. Nous avons remarqué l'absence du signal de la fluorescence de l'aptamère E2.

Les tableaux 19 et 20 suivants récapitulent les tests de liaison des aptamères aux bactéries ou aux mélanges bactériens.

Tableau 19 : Récapitulatif du test de liaison des aptamères aux bactéries planctoniques.

Aptamère Bactérie	Cy5-F23	A1568-E2	A1568-P1231	FITC-A14	FITC-SA23
PAO1	✓	✗	✗	✗	✗
<i>E. coli MG1655</i>	✓	✓	✗	✗	✗
<i>S. aureus HG001</i>	✗	✗	✗	✗	✗

Tableau 20 : Récapitulatif du test de liaison des aptamères aux mélanges bactériens.

Aptamère Mélange bactérien	Cy5-F23	A1568-E2	Cy5-F23 + A1568-E2
PAO1-GFP + <i>E. coli</i>	Liaison + sur PAO1 et <i>E. coli</i>	Liaison + sur PAO1 et <i>E. coli</i>	Liaison + de l'aptamère Cy5-F23 sur PAO1 et <i>E. coli</i>
PAO1 + <i>S. aureus</i>	Liaison + sur PAO1		
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>		Liaison + sur <i>E. coli</i>	

Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi l'aptamère E2 ne marque rien sur un mélange bactérien PAO1-GFP + *E. coli*, lorsqu'il est testé en mélange avec l'aptamère F23. Trois hypothèses sont possibles :

- Il est possible que l'aptamère F23 possède des séquences d'acides nucléiques qui lui permettent de se lier à des motifs présents sur les deux bactéries de PAO1 et *E. coli*. Alors que l'aptamère E2 est plus spécifique à *E. coli* seulement.
- Les aptamères se lient généralement à des cibles sur la surface des cellules cibles. L'absence du signal de l'aptamère E2 pourrait être expliquée par l'inaccessibilité de la cible dans le mélange bactérien.
- Le protocole expérimental doit être davantage optimisé. La préparation des bactéries, les temps d'incubations ou la préparation des réactifs pourraient influencer les résultats obtenus.

3. Test de liaison des aptamères aux biofilms

3.1. Étude de la croissance des biofilms

Un biofilm est défini par un amas de cellules bactériennes attachées à une surface et entourées d'une matrice extracellulaire constituée d'une variété de composants comme des polysaccharides, des lipides, des protéines... Ils sont caractérisés par leur forte résistance aux agents antimicrobiens. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens ¹⁶⁸.

Après ensemencement et culture du biofilm dans une plaque de 96 puits, son dosage est effectué au crystal violet. La figure 39 montre le résultat de la production du biofilm par des mesures de la densité optique à 492nm. Deux milieux de culture ont été utilisés ; LB et MH II. Les biofilms de *S. aureus*, *S. epidermidis* (*S. epi1*), PAO1 et *E. coli*, se développent mieux dans le milieu riche LB que dans le milieu MH II.

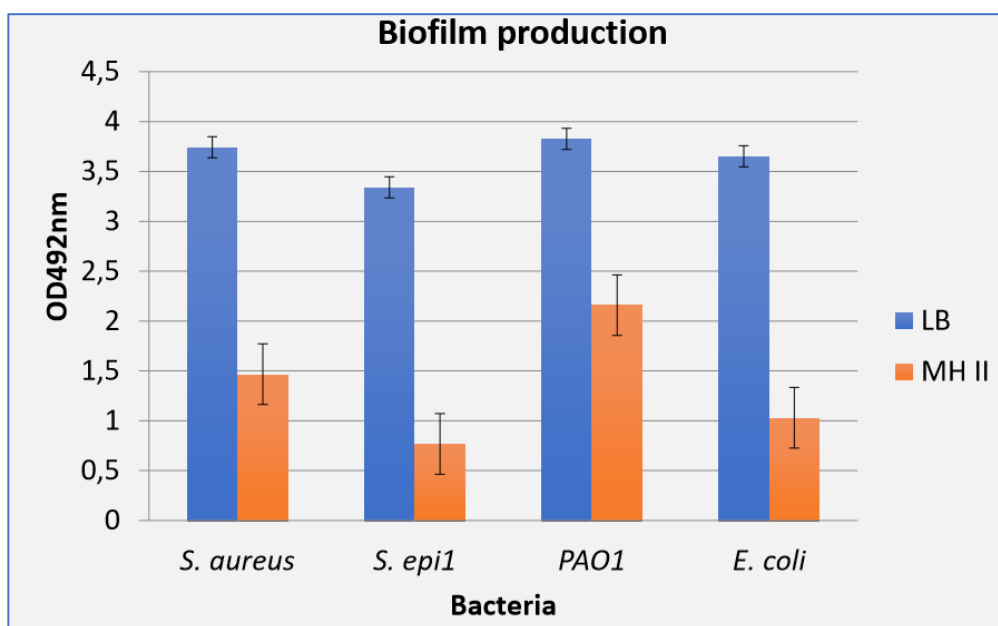


Figure 39 : Histogrammes représentant la croissance des biofilms des différentes bactéries dans deux milieux différents LB et MH II.

Après ensemencement de la plaque à partir de préculture fraîche des différentes bactéries ; *S. aureus*, *S. epidermidis* (*S. epi1*), PAO1 et *E. coli*, le dosage des biofilms est effectué au Crystal violet.

Nous avons choisi de continuer nos études sur les biofilms des deux bactéries de PAO1 et de *S. aureus*, pour deux raisons : ce sont des bactéries connues pour développer des biofilms dans le secteur médical, et ils se développent en 24h.

3.2. Étude de l'effet des aptamères sur la croissance des biofilms de PAO1 et de *S. aureus*

Nous avons testé l'effet de l'aptamère Cy5-F23, Cy5-JN27 et Cy5-Tutu22 sur la production du biofilm de PAO1 et de *S. aureus* dans MH II, LB et SM. Tutu22 est un aptamère à ADN qui a été sélectionné par Wang et al (2014) contre la protéine EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique)¹⁶⁹. Cet aptamère n'est donc pas censé se lier avec les bactéries. Le milieu SM a été utilisé ici pour évaluer la croissance du biofilm dans un milieu très pauvre et d'étudier son interaction avec les aptamères.

Nous avons réalisé deux répétitions techniques pour chaque essai. Le test a été réalisé dans deux sens :

- **Ajout de l'aptamère au moment de l'ensemencement de la plaque**

Le protocole consiste à ensemencer la plaque et ajouter 5 μ M, 2,5 μ M ou 1,25 μ M des aptamères Cy5-F23, Cy5-JN27 et Cy5-Tutu22, dans les milieux MH II, LB et SM. La figure 40 montre le résultat de croissance des biofilms de PAO1 et de *S. aureus*.

Dans MH II, nous remarquons une diminution de la croissance des biofilms de PAO1 en présence de l'aptamère F23 aux trois concentrations testées (5 μ M, 2,5 μ M et 1,25 μ M), et une diminution de la croissance des biofilms de *S. aureus* avec tous les aptamères testés. Dans le milieu LB ainsi que dans le milieu SM, les aptamères n'ont pas influencé la croissance des biofilms de PAO1 ou de *S. aureus*, en se référant au contrôle négatif.

Le fait que ces aptamères influencent la croissance des biofilms dans le milieu MH II et pas dans LB ou SM peut être expliqué par la présence de molécules impliquées dans la formation et la maturation des biofilms, dans MH II, et qui seraient reconnues par les aptamères. Comme nous avons remarqué précédemment, les biofilms de PAO1 et de *S. aureus* ont une meilleure croissance dans le milieu LB (figure 39). Il est possible que la matrice extracellulaire des biofilms dans LB soit beaucoup plus complexe, ce qui rend difficile la liaison des aptamères aux molécules cibles.

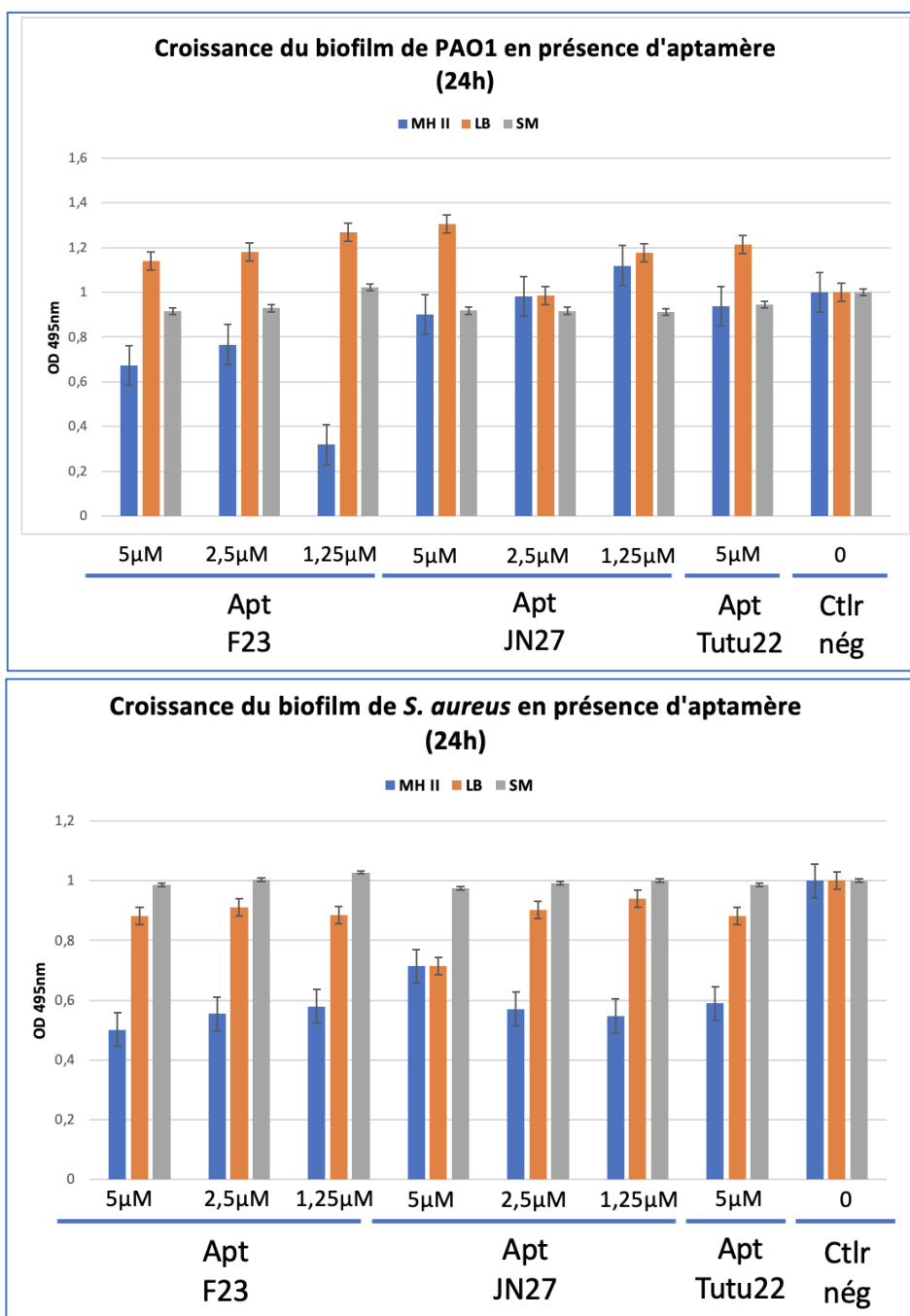


Figure 40 : Histogrammes de la production du biofilm de PAO1 et de *S. aureus* en présence l'aptamère F23, JN27 et Tutu22 à différentes concentrations et dans différents milieux de culture MH II, LB et SM.

- **Ajout de l'aptamère après 24h de croissance des biofilms**

Le protocole consiste à ensemercer la plaque, incuber 24h à 37°C, puis ajouter 5µM, 2,5µM et 1,25µM de l'aptamère Cy5-F23, Cy5-JN27 et Cy5-Tutu22, et analyser les plaques après 48h. La figure 41 montre le résultat de croissance des biofilms de PAO1 et de *S. aureus* après avoir ajouté les aptamères.

Nous remarquons que l'ajout des aptamères sur des biofilms de PAO1 favorise davantage leur croissance et maturité dans les trois différents milieux (figure 41), en se référant au contrôle négatif. En revanche, tous les aptamères inhibent la croissance des biofilms de *S. aureus* dans les milieux LB et MH II (figure 41).

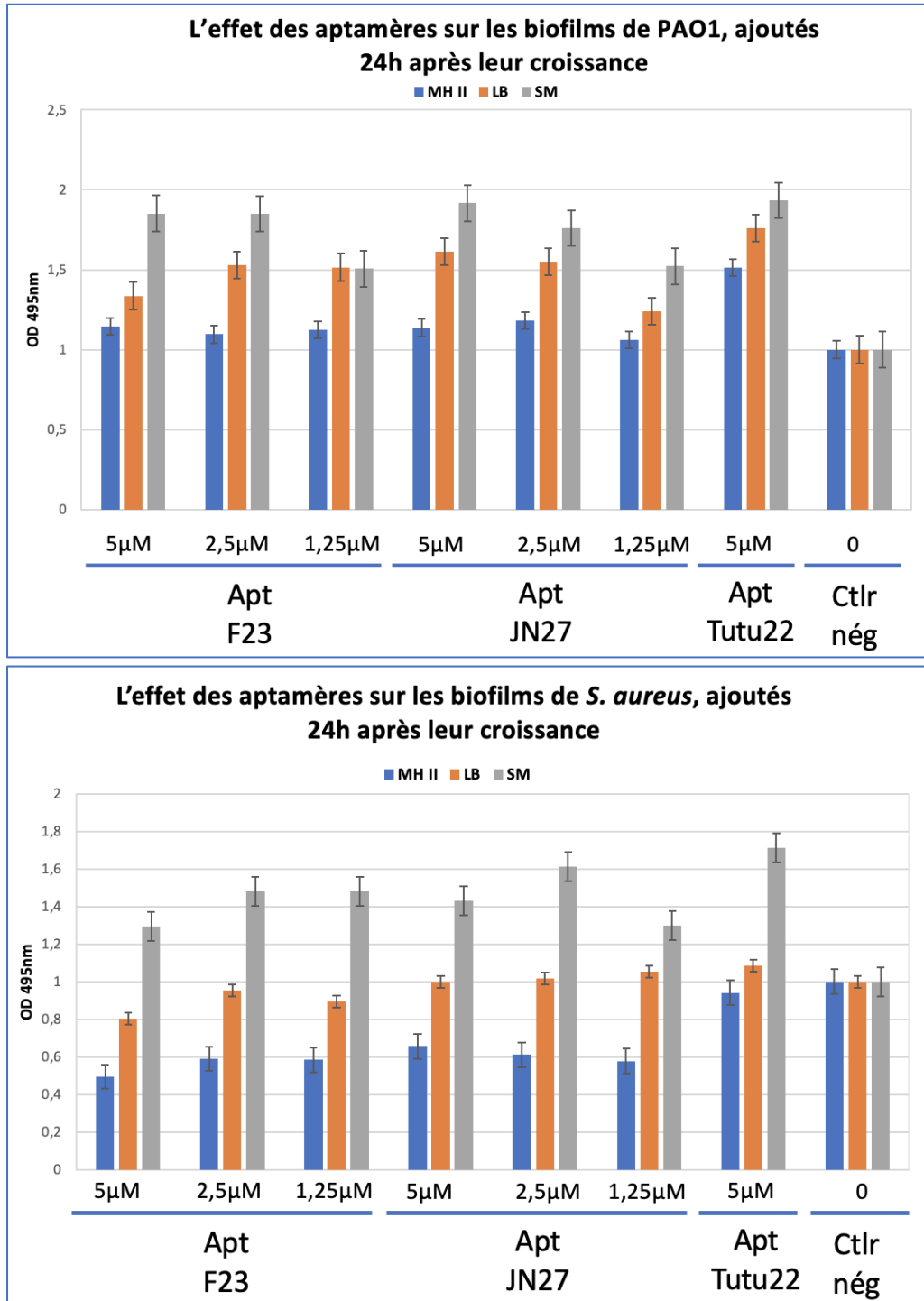


Figure 41 : Histogramme de l'effet des aptamères F23, JN27 et Tutu22 ajoutés à différentes concentrations et dans différents milieux de culture, 24h après la croissance du biofilm de PAO1 et de *S. aureus*.

- **Étude de la liaison des aptamères au biofilm PAO1 par microscopie confocale**

L'objectif de cette partie est d'étudier par bioimagerie la liaison de l'aptamère F23 sur le biofilm de PAO1. Nous avons également utilisé d'autres aptamères dont E2, A14 et Tutu22, à des concentrations de 1 μ M et 5 μ M. La figure 42 montre le schéma explicatif de la méthode utilisée pour ces tests de liaison des aptamères au biofilm PAO1. Le protocole se fait en trois étapes. La première étape consiste àensemencer une plaque Ibidi de 8puits à partir d'une préculture fraîchement préparée de PAO1. Après incubation 8h à 37°C et un lavage et changement de milieu de culture, la plaque est incubée pour toute une nuit. Le biofilm produit est fixé au PFA 4% avant d'ajouter l'aptamère. Ensuite, deux options ont été réalisées ; procéder à une fixation d'aptamère ou pas avant d'analyser les plaques en microscopie confocale.

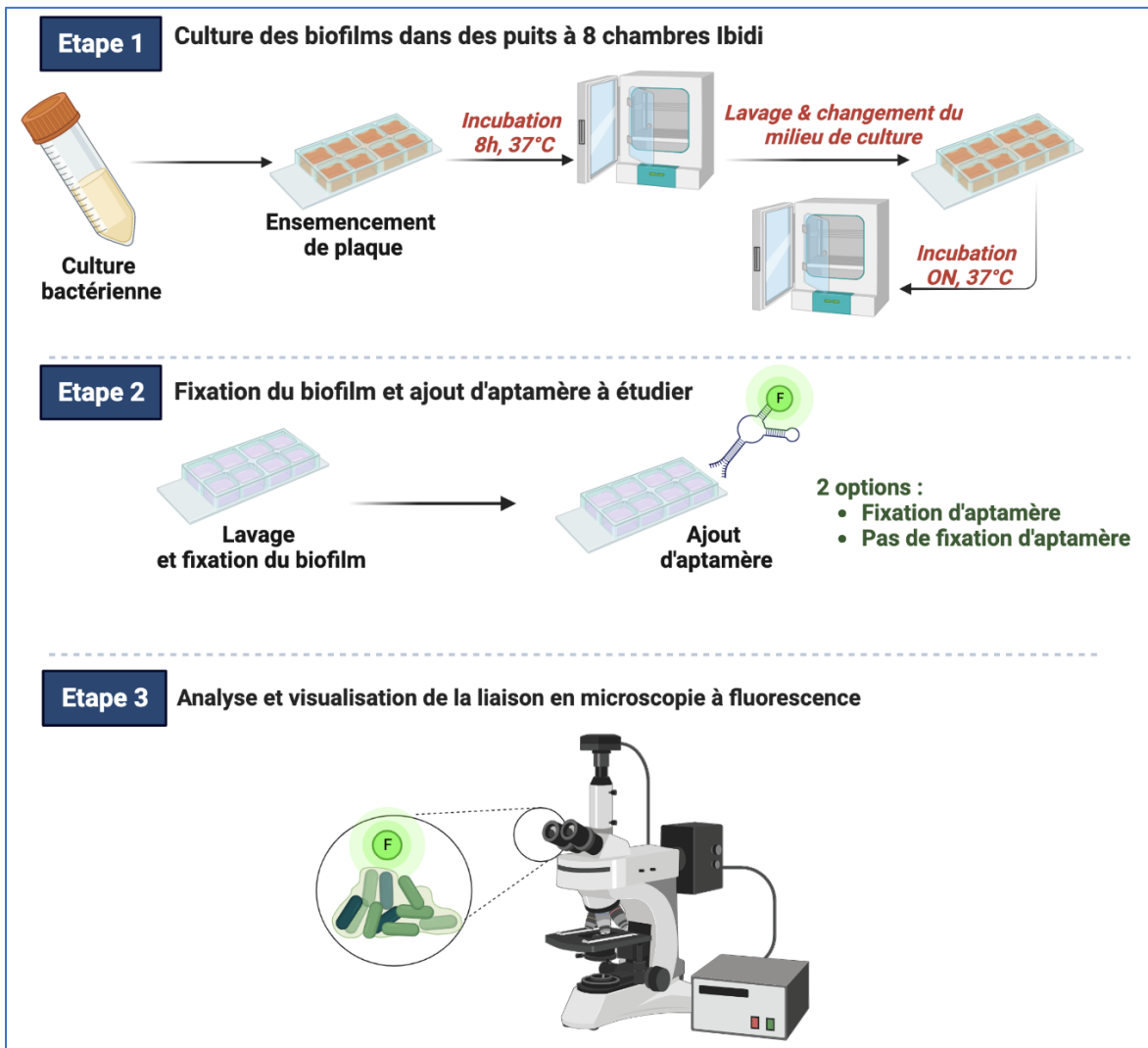


Figure 42 : Schéma explicatif correspondant au protocole utilisé pour tester la liaison des aptamères au biofilm de PAO1 par microscopie confocale

Les figures de 43 à 46 représentent les résultats des tests de liaison des aptamères F23, E2, A14 et Tutu22 au biofilm de PAO1, testés à 1 et 5 μ M. Les résultats montrent une liaison positive de tous les aptamères suite à la présence de la fluorescence émise par chaque fluorophore (Cy5 pour F23 et Tutu22, Al568 pour E2, FITC pour A14).

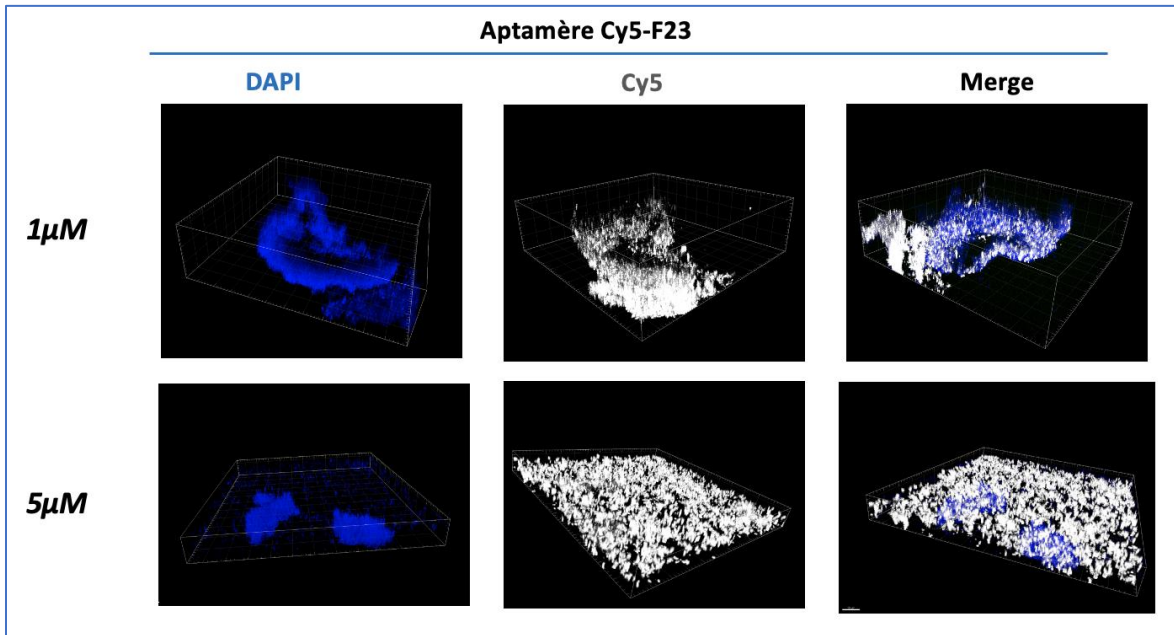


Figure 43 : Test de la liaison de l'aptamère F23 sur le biofilm de PAO1. L'aptamère F23 couplé au Cy5 (représenté en gris) a été ajouté à deux concentrations ; 1 μ M et 5 μ M. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale puis en analyse par le logiciel Imaris. L'ADN bactérien est marqué au DAPI représenté en bleu.

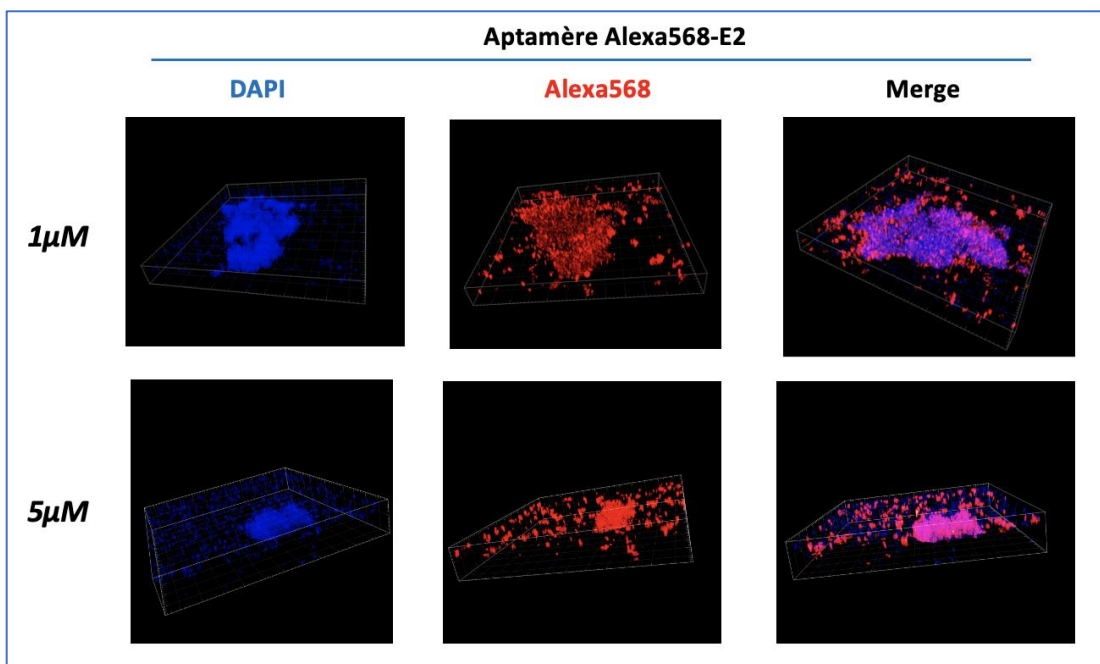


Figure 44 : Test de la liaison de l'aptamère E2 sur le biofilm de PAO1. L'aptamère E2 couplé à l'Alexa568 (représenté en rouge) a été ajouté à deux concentrations ; 1 μ M et 5 μ M. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale puis en analyse par le logiciel Imaris. L'ADN bactérien est marqué au DAPI représenté en bleu.

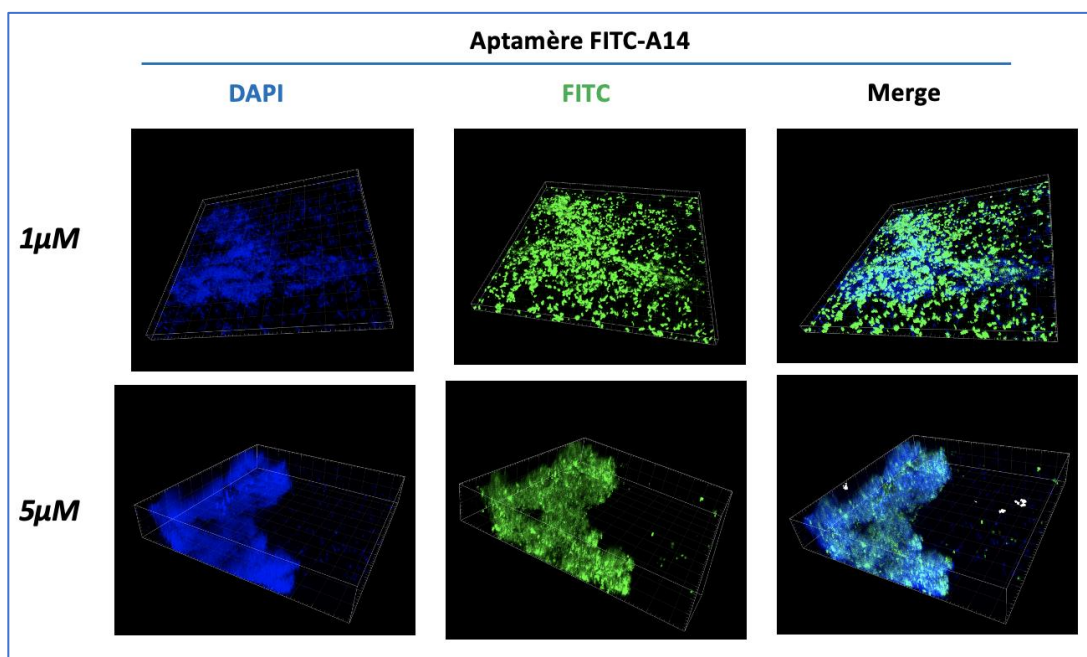


Figure 45 : Test de la liaison de l'aptamère A14 sur le biofilm de PAO1. L'aptamère A14 couplé à FITC (représenté en vert) a été ajouté à deux concentrations ; 1 μ M et 5 μ M. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale puis en analyse par le logiciel Imaris. L'ADN bactérien est marqué au DAPI représenté en bleu.

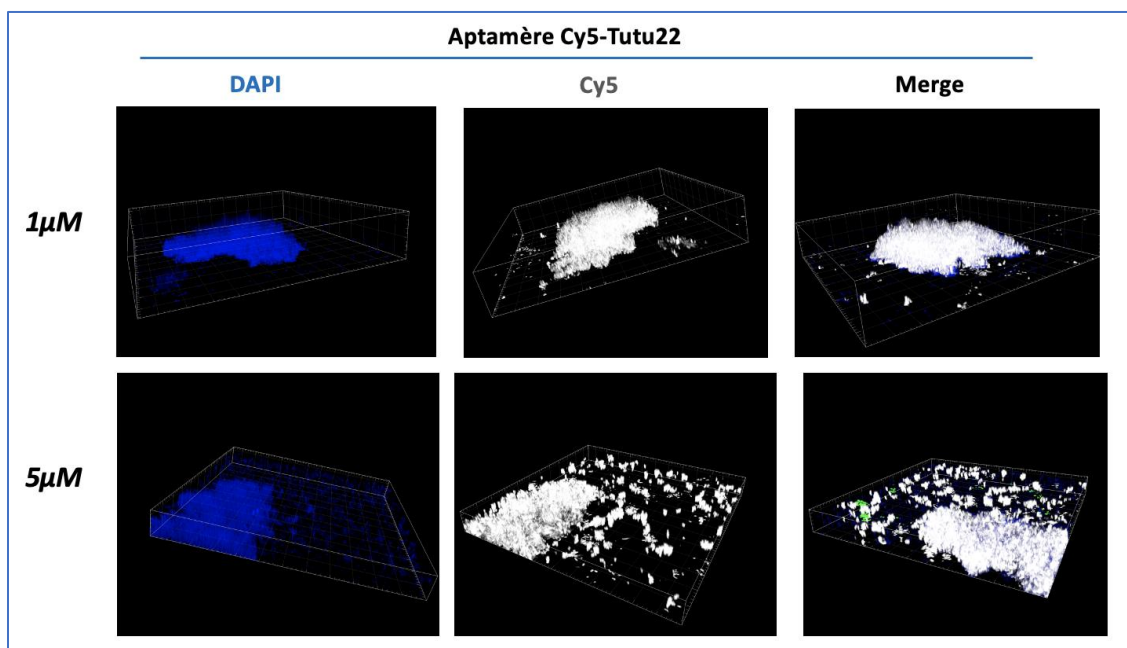


Figure 46 : Test de la liaison de l'aptamère Tutu22 sur le biofilm de PAO1. L'aptamère Tutu22 couplé au Cy5 (représenté en gris) a été ajouté à deux concentrations ; 1 μ M et 5 μ M. Les images sont obtenues par visualisation en microscopie confocale puis en analyse par le logiciel Imaris. L'ADN bactérien est marqué au DAPI représenté en bleu.

Conclusion

Pour résumer, nos résultats de cette partie d'étude de liaison d'aptamères le biofilm de PAO1 ont montré une liaison positive, sans spécificité, de tous les aptamères F23, E2, A14 et Tutu22 contre le biofilm de PAO1.

Les biofilms étant connus pour être impliqués dans un large éventail de maladies microbiennes, il est essentiel de développer des moyens efficaces pour contrôler leur formation. Aujourd'hui, plusieurs études se sont basées sur l'utilisation des systèmes basés sur les aptamères permettant de combattre les infections microbiennes causées par des biofilms. Des études de microscopie inversée et la microscopie à force atomique ont indiqué que l'aptamère appelé « aptamère3 » peut contrôler le développement des biofilms de *Salmonella cholerasuis* et augmenter l'impact inhibiteur d'un antibiotique sur les biofilms bactériens de *S. cholerasuis*¹⁷⁰. Dans cet objectif, vient l'idée de Cheng Lijuan et al (2017), de conjuguer cet aptamère 3 à l'ampicilline¹⁷¹. Ce complexe Apt3-Amp a montré une inhibition de la formation et éradication partielle du biofilm de *S. cholerasuis*. Cette activité synergique dans le contrôle des biofilms ouvre la voie passionnante pour le développement des traitements futurs, avec des aptamères par exemple, pour la prévention et l'éradication des biofilms.

Ces expériences sont préliminaires et plusieurs optimisations en terme technique seraient nécessaires. Mais il est aussi possible que les aptamères utilisés dans cette étude, et particulièrement l'aptamère F23, ne soient pas spécifiques des bactéries sous forme de biofilms. Il serait particulièrement intéressant d'identifier de la cible moléculaire de l'aptamère F23, en s'appuyant par exemple sur le protocole décrit par Ning et al (2015), qui ont pu identifier la flagelline comme cible de la bactérie *Salmonella choleraesuis*¹⁷⁰.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION / PERSPECTIVES

L'antibiorésistance représente une grande menace sanitaire à l'échelle mondiale. Pour y remédier, plusieurs études ont été entreprises. Certains chercheurs ont développé de nouvelles molécules chimiques à visée thérapeutique mais qui finissaient par devenir résistantes aux bactéries. D'autres ont pensé à piéger les bactéries en introduisant un antibiotique couplé à une molécule essentielle à la bactérie, le cas d'un sidérophore, ou une molécule hydrophobe, pouvant pénétrer la paroi bactérienne.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à plusieurs thématiques visant un seul objectif qui est de lutter contre l'antibiorésistance. Cette thèse a consisté à identifier et sélectionner des remèdes à base de métaux ou de plantes, à reproduire leur mode de préparation, à étudier leur activité biologique, et finalement à les vectoriser contre différentes bactéries pathogènes en introduisant les aptamères.

Avec l'aide d'historiens, nous avons pu identifier deux remèdes utilisés principalement contre les abcès. Le premier était simple et à base de métaux, combinant deux activités, à savoir une activité antibactérienne sur les souches d'*E. coli*, *S. aureus* et *C. striatum* et une activité anti-inflammatoire. Le deuxième remède, beaucoup plus complexe, est composé de métaux et de plantes. Les extraits de ces dernières ont montré une activité antibactérienne intéressante, particulièrement l'extrait d'EtOAc d'*Aloe ferox*, sur *S. aureus*, *S. epidermidis* et *C. striatum*. Cette partie du 2^{ème} remède a été poursuivie par ma collègue chimiste Elora Aubert (LIT-UMR7200). Les résultats d'Elora Aubert ont permis de montrer qu'un autre ingrédient possède une activité antibactérienne forte : la gomme ammoniacque. Cette gomme est issue d'une plante, *Ferula communis*, qui produit des molécules sesquiterpéniques, comme le féruléol, dont l'activité antibactérienne de l'ordre du micromolaire est similaire à celle d'antibiotiques de référence. Une collaboration avec le laboratoire de Sylvie Fournel (UMR7199) a également permis de montrer que l'*Aloe ferox*, dont l'activité antibactérienne est faible (partie résultats, chapitre 1, remède 2) montre une activité anti-inflammatoire.

Ainsi, comme pour le premier remède que j'ai étudié, une action synergique anti-infectieuse a été caractérisée : à la fois une activité antibactérienne pour diminuer la charge bactérienne, et une activité anti-inflammatoire pour résorber la plaie. Cette synergie d'action est peut-être une caractéristique de ces remèdes anciens. Chaque plante utilisée individuellement se montre insuffisamment efficace, mais l'ensemble du remède présente une activité intéressante. La suite du projet consistera à isoler et d'identifier les molécules qui portent ces activités, ainsi que de

vérifier si cette synergie d'action apportée par le mélange des différentes plantes est également valable au niveau moléculaire.

Les végétaux contiennent de nombreux composés phénoliques, dont certains pourraient chélater des métaux et ainsi priver les bactéries de ce nutriment. L'effet de quatre chélateurs de fer a été testé en culture liquide sur la croissance de différentes bactéries pathogènes. Si ces chélateurs ont un effet minime sur la croissance de la plupart des bactéries en milieu MH (milieu de culture riche) en dessous de 1mM, ils empêchent la croissance de la bactérie *S. epidermidis* à une concentration 100 fois inférieure. Ces résultats sont intéressants, car ils permettent de spécifiquement cibler *S. epidermidis* par rapport aux autres bactéries étudiées, à savoir PAO1, ou *C. striatum*. Il s'agira maintenant d'étudier plus précisément des infections liées à *S. epidermidis* pour confirmer l'intérêt d'une telle stratégie. Ainsi, pour une perspective de synergie entre les chélateurs de fer et les antibiotiques, il serait bénéfique de consacrer davantage de temps et de ressources pour explorer plus en détails les effets synergiques potentiels. Ces découvertes pourraient contribuer significativement à l'amélioration des stratégies thérapeutiques contre les pathogènes nosocomiales tels que *S. epidermidis*.

Afin d'élargir le spectre d'activité des molécules actives présentes dans les plantes étudiées et de diminuer la toxicité des métaux utilisés dans les préparations, une stratégie intéressante serait de cibler les pathogènes d'intérêt grâce à des molécules reconnaissant spécifiquement une bactérie pathogène dans un mélange de bactéries, mimant un foyer infectieux. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux aptamères en tant que molécules de ciblage. Le dernier objectif de ma thèse était donc de vectoriser certaines molécules issues des remèdes 1 et 2 grâce à des aptamères.

Ma thèse se termine donc sur l'identification par microscopie confocale, d'un aptamère spécifique par souche bactérienne sous forme planctonique. A l'heure actuelle, nous avons identifié les aptamères F23 et E2 liant respectivement les bactéries PAO1 et *E. coli* MG1655. Dans les conditions expérimentales testées, nous n'avons pas identifié d'aptamères spécifiques de *S. aureus* HG001. L'aptamère F23 a permis également de discriminer les PAO1 de *S. aureus* en mélange bactérien. Cependant, des optimisations sont à prévoir en terme techniques pour étudier au mieux cette partie de multiplexing des aptamères avec des bactéries. Des optimisations sont en cours par ma collègue Chaimae Mezouarhi (UMR7021-LBP) qui prend le relais sur cette partie. L'une des pistes envisagées consiste à optimiser les tests techniques en terme de temps de lavages et d'incubation. Chaimae étudiera également la liaison des aptamères sur des bactéries vivantes.

Au cours de mes travaux, j'ai été confronté à la notion de spécificité des aptamères, dans le domaine de la bactériologie. En effet, certains des aptamères testés au cours de mon doctorat, qui avaient été décrits dans la littérature comme spécifiques à une souche bactérienne donnée, sont quelquefois aspécifiques comme par exemple l'aptamère A14 et l'aptamère SA23 qui ont été sélectionnés contre *S. aureus*. Ce problème d'aspécificité auquel nous avons été confrontés dans ce domaine de bactériologie a récemment été commenté, pour les aptamères ciblant des récepteurs de surface cellulaire en oncologie et pour des aptamères ciblant de molécules de faibles poids moléculaires ^{172,173}. Pour éviter des problèmes d'aspécificité, il est donc particulièrement important de bien caractériser un aptamère, ce qui permettra de garantir la reproductibilité et l'efficacité de la fonction de l'aptamère. Idéalement, pour obtenir un aptamère spécifique d'une souche donnée, l'idéal serait d'entreprendre un nouveau SELEX. Par exemple, si nous souhaitions identifier un aptamère spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* dont l'objectif serait de cibler cette bactérie dans son environnement infectieux (par exemple en cas de mucoviscidose), alors la stratégie de SELEX que je développerais serait de réaliser une sélection positive contre une souche de *P. aeruginosa* et des sélections négatives contre des souches de sujet sain des voies hautes des poumons, comme *Neisseria*, *Streptococcus*, *Haemophilus* ¹⁷⁴.

Nous aurions également pu identifier les cibles moléculaires des aptamères. Durant ma thèse, je n'ai pas utilisé de protocole d'identification de cible. D'ailleurs, les aptamères étudiés durant ma thèse ont été sélectionnés et ont été identifiés par un cell-SELEX, ciblant la cellule bactérienne entière. Mais, plusieurs méthodes d'identification de cibles moléculaires pourraient être utilisées. Des expériences de *pull-down*, par exemple, consistent à adsorber un complexe protéique sur des billes pour l'isoler. Les ligands immobilisés sur les billes se lient spécifiquement à un composant ou des composants du complexe, soit par l'intermédiaire d'une étiquette d'affinité, soit par l'intermédiaire d'un anticorps ¹⁷⁵. Dans notre contexte, nous pourrions utiliser des aptamères biotinylés qui seront fixés sur des billes de streptavidine. Ensuite, nous ajouterions des bactéries lysées afin d'avoir tous les composants de bactéries dans l'échantillon. Après des étapes de lavage pour éliminer les molécules non liées, les aptamères liés à leur cible seront récupérés. Nous pourrions par la suite envisager une spectroscopie de masse afin de déterminer les composants du biofilm reconnus par l'aptamère. Un autre exemple repose sur des techniques de génie génétique, qui pourraient être envisagées pour créer des mutants bactériens et les utiliser pour confirmer les cibles moléculaires des aptamères.

D'autre part, nos études sur le ciblage de biofilms par des aptamères (l'un, F23, décrit dans la littérature comme spécifiques de PAO1, et les autres de spécificités différentes) montrent que tous les aptamères testés se lient au biofilm de PAO1 suite à l'émission de fluorescence émise

par chaque fluorophore couplé à chaque aptamère. Des optimisations seraient nécessaires, par exemple l'étude des biofilms vivants (et donc non fixés au PFA). Ommen et al (2022) ont identifié des aptamères se liant aux cellules de biofilm de *S. aureus*¹⁷⁶. L'un de ces aptamères, décrit par Cao et al (2009), a été conjugué aux liposomes encapsulant différents antibiotiques. Après un traitement de 24h *in vitro*, l'ajout des liposomes ciblés par l'aptamère a pu éradiquer le biofilm de *S. aureus*¹⁷⁶.

Même si tel n'était pas l'objectif de ma thèse, nos travaux montrent qu'il n'est pas inenvisageable à l'avenir d'utiliser des aptamères en tant qu'agent diagnostic, par exemple pour mettre rapidement en évidence la présence de souches bactériennes pathogènes dans une flore normale (par exemple, directement suite à l'expectoration de patients atteints de mucoviscidose). Mais mon projet portait particulièrement sur le ciblage thérapeutique. Ainsi, une perspective directe et concrète de mon projet sera de vectoriser les molécules actives issues des remèdes sélectionnés et étudiés dans cette thèse, après leur fractionnement (partie suivie par ma collègue Elora Aubert (UMR7200-LIT) grâce à l'aptamère F23 vers *P. aeruginosa*.

Plusieurs méthodes de conjugaison des aptamères avec des molécules toxiques (thérapeutiques) sont utilisées. Nous pourrions envisager une méthode directe qui consiste à utiliser un linker pour attacher l'aptamère à la molécule d'intérêt. Ou d'utiliser nanoparticules afin de délivrer une molécule ou une combinaison de molécules toxiques vers la bactérie pathogène. Ces nanoparticules pourraient être des liposomes, des dendrimères, ou des nanoparticules d'or. Elles seraient fonctionnalisées à leur surface par l'aptamère F23 pour la partie ciblage et seraient chargées avec ou fonctionnalisées par des molécules ou combinaisons de molécules issues de l'étude des pharmacopées anciennes pour leur action thérapeutique. La figure 47 illustre schématiquement un exemple de liposome conjugué à un aptamère contenant une molécule thérapeutique¹⁷⁷. Un liposome est une petite sphère constituée d'une ou plusieurs couches de lipides qui forment une membrane biologique bilipidique. Le cholestérol et le PEG ajoutés permettent à stabiliser la structure du liposome et à prolonger sa circulation dans l'organisme (figure 47). Lorsque le liposome conjugué à l'aptamère est administré dans l'organisme, il peut cibler spécifiquement les cellules exprimant la cible de l'aptamère. Une fois que le liposome est internalisé dans la cellule, la molécule thérapeutique encapsulée à l'intérieur est libérée pour exercer son action thérapeutique.

Une étude avec des experts dans ce domaine et l'essai de différentes nanoparticules seront nécessaires pour optimiser l'efficacité du système d'administration d'une molécule active.

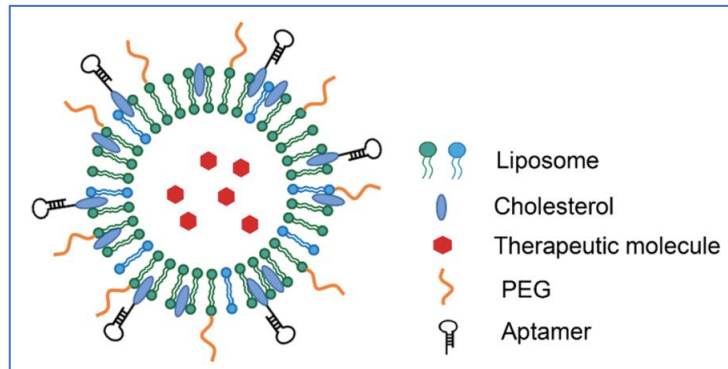


Figure 47 : Schéma illustrant un liposome conjugué à un aptamère. Le liposome comprend également une molécule thérapeutique, ainsi que cholestérol et PEG permettant la stabilité du complexe.

La continuité de ce projet est dans les mains de ma collègue Chaimae Mezhouari (UMR7021-LBP) qui prendra le relais sur l'étude des aptamères sur des mélanges bactériens, sur les biofilms et, plus généralement, sur les stratégies de vectorisation basées sur les aptamères.

REFERENCES

1. Mohr K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology*, 398, 237–272.
2. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80.
3. Bentley R. (2000). Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical reviews*, 100(10), 3801–3826.
4. Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 53(4), 371–382.
5. Hinshaw, H. C., Pyle, M. M., & Feldman, W. H. (1947). Streptomycin in tuberculosis. *The American journal of medicine*, 2(5), 429–435.
6. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (1989). *Microbiology*. Benjamin-Cummings Publishing Company.
7. Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300–305.
8. Courvalin, P. (2008). La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 161(1), 7-12.
9. Moroh, J. L. A. (2013). *Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morinda morindoides* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).
10. Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 182.
11. Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 42(2), 6-21.
12. Goldmann, D. A., Weinstein, R. A., Wenzel, R. P., Tablan, O. C., Duma, R. J., Gaynes, R. P., Schlosser, J., & Martone, W. J. (1996). Strategies to Prevent and Control the Emergence and Spread of Antimicrobial-Resistant Microorganisms in Hospitals. A challenge to hospital leadership. *JAMA*, 275(3), 234–240.
13. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
14. Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, 54, 111-119.
15. Hriouech, S., Akhmouch, A. A., Mzabi, A., Chefchaou, H., Tanghort, M., Oumokhtar, B., Chami, N., & Remmal, A. (2020). The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2020, 4271017.

16. Akhmouch, A. A., Hriouech, S., Mzabi, A., Tanghort, M., Chefchaou, H., Remmal, A., & Chami, N. (2022). Synergistic Action of AMX Associated with 1,8-Cineole and Its Effect on the ESBL Enzymatic Resistance Mechanism. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *11*(8), 1002.
17. Tetard, A., Foley, S., Mislin, G. L. A., Brunel, J. M., Oliva, E., Torrealba Anzola, F., Zedet, A., Cardey, B., Pellequer, Y., Ramseyer, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2021). Negative Impact of Citral on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics. *Frontiers in microbiology*, *12*, 709838.
18. Negash, K. H., Norris, J. K. S., & Hodgkinson, J. T. (2019). Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(18), 3314.
19. Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, *27*(5), 637–657.
20. Wencewicz, T. A., Long, T. E., Möllmann, U., & Miller, M. J. (2013). Trihydroxamate siderophore–fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus*. *Bioconjugate chemistry*, *24*(3), 473–486.
21. Mislin, G. L., & Schalk, I. J. (2014). Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics : integrated biometal science*, *6*(3), 408–420.
22. Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., Idowu, T., Domalaon, R., Schweizer, F., Zhanel, M. A., Lagacé-Wiens, P. R. S., Walkty, A. J., Noreddin, A., Lynch Iii, J. P., & Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*, *79*(3), 271–289.
23. Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, *1*(2), 66–85.
24. Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. U., & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of basic microbiology*, *59*(2), 123–133.
25. Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Frontiers in microbiology*, *8*, 981.
26. Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., Vila, M. M., Teixeira, J. A., & Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological research*, *191*, 51–80.
27. Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, *2*(1), 1–33.
28. Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics*, *9*(1), 24.
29. Steinstraesser, L., Trust, G., Rittig, A., Hirsch, T., Kesting, M. R., Steinau, H. U., & Jacobsen, F. (2011). Colistin-loaded silk membranes against wound infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Plastic and reconstructive surgery*, *127*(5), 1838–1846.
30. Laverty, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2011). The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of molecular sciences*, *12*(10), 6566–6596.
31. Park, S. C., Park, Y., & Hahm, K. S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International journal of molecular sciences*, *12*(9), 5971–5992.

32. Lemaoui, C. E., Layaida, H., Badi, A., & Foudi, N. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, 19(1), 12-19.
33. Hanack, K., Messerschmidt, K., & Listek, M. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Advances in experimental medicine and biology*, 917, 11–22.
34. Tschudin-Sutter, S. (2018). Traitements par anticorps pour les infections bactériennes: exemple du bezlotoxumab. In *Forum Médical Suisse*. doi:10.4414/fms.2018.08011.
35. Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), 8856–8874.
36. Marslin, G., Revina, A. M., Khandelwal, V. K., Balakumar, K., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2015). PEGylated ofloxacin nanoparticles render strong antibacterial activity against many clinically important human pathogens. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 132, 62–70.
37. de Pablo, E., Fernández-García, R., Ballesteros, M. P., Torrado, J. J., & Serrano, D. R. (2017). Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?. *Annals of translational medicine*, 5(22), 448.
38. Diab, R., Khameneh, B., Joubert, O., & Duval, R. (2015). Insights in Nanoparticle-Bacterium Interactions: New Frontiers to Bypass Bacterial Resistance to Antibiotics. *Current pharmaceutical design*, 21(28), 4095–4105.
39. Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(6), 3670–3695.
40. Saad, B., & Said, O. (2011). Medicinal herbs and extracting their active ingredients. *Greco-Arab and Islamic herbal medicine: traditional system, ethics, safety, efficacy and regulatory issues*. Wiley-Blackwell/Wiley, Hoboken, 425-440.
41. Saad, B., & Said, O. (2011). *Greco-Arab and Islamic herbal medicine: traditional system, ethics, safety, efficacy, and regulatory issues*. John Wiley & Sons.
42. Lev, E. (2015). Botanical view of the use of plants in medieval medicine in the eastern Mediterranean according to the Cairo Genizah. *Israel Journal of Plant Sciences*, 62(1-2), 122-140.
43. Mahdizadeh, S., Khaleghi Ghadiri, M., & Gorji, A. (2015). Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances. *Avicenna journal of phytomedicine*, 5(3), 182–202.
44. Castronovo, L. M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., Fani, R., & Maggini, V. (2021). Medicinal Plants and Their Bacterial Microbiota: A Review on Antimicrobial Compounds Production for Plant and Human Health. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2), 106.
45. Lev E. (2007). Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11-14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor-Schechter Genizah collection, Cambridge. *Journal of ethnopharmacology*, 110(2), 275–293.
46. Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology*, 11(6), 371–384.
47. Kumar, K. S., Bhowmik, D., Chiranjib, B., & Tiwari, P. (2010). Allium cepa: A traditional medicinal herb and its health benefits. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 283-291.

48. Nejabat, M., Salehi, A., Noorani Azad, P., & Ashraf, M. J. (2014). Effects of onion juice on the normal flora of eyelids and conjunctiva in an animal model. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(5), e9678.
49. Zeng, Y., Li, Y., Yang, J., Pu, X., Du, J., Yang, X., Yang, T., & Yang, S. (2017). Therapeutic Role of Functional Components in Alliums for Preventive Chronic Disease in Human Being. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2017, 9402849.
50. Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(1), 1–14.
51. Mikaili, P., Maadirad, S., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., & Sarahroodi, S. (2013). Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(10), 1031–1048.
52. Hosseini, A., & Hosseinzadeh, H. (2015). A review on the effects of *Allium sativum* (Garlic) in metabolic syndrome. *Journal of endocrinological investigation*, 38(11), 1147–1157.
53. Akaberi, M., Sobhani, Z., Javadi, B., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2016). Therapeutic effects of *Aloe* spp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, 759–772.
54. Gupta, V. K., & Malhotra, S. (2012). Pharmacological attribute of *Aloe vera*: Revalidation through experimental and clinical studies. *Ayu*, 33(2), 193–196.
55. Ababutain I. M. (2017). Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Sarcocolla* Gum Resin. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 20(11), 571–576.
56. Lozano, I. (2001). The therapeutic use of *Cannabis sativa* (L.) in Arabic medicine. *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1(1), 63-70.
57. Waweru, J. G. (2015). *Evaluation of the composition, physico-chemical characteristics, surfactant and anti-microbial potential of commiphora abyssinica gum resin* (Doctoral dissertation, University of Nairobi).
58. Su, S., Wang, T., Duan, J. A., Zhou, W., Hua, Y. Q., Tang, Y. P., Yu, L., & Qian, D. W. (2011). Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. *Journal of ethnopharmacology*, 134(2), 251–258.
59. Nadeem, M., Muhammad Anjum, F., Issa Khan, M., Tehseen, S., El-Ghorab, A., & Iqbal Sultan, J. (2013). Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.) A review. *British Food Journal*, 115(5), 743-755.
60. Mzabri, I., Addi, M., & Berrichi, A. (2019). Traditional and modern uses of saffron (*Crocus sativus*). *Cosmetics*, 6(4), 63.
61. Krup, V., Prakash, L. H., & Harini, A. (2013). Pharmacological activities of turmeric (*Curcuma longa* Linn): a review. *J Homeop Ayurv Med*, 2(133), 2167-1206.
62. Niranjana, A., & Prakash, D. (2008). Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.)-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 45(2), 109.
63. Botany, Herbs and Healing In Islamic Science and Medicine. <https://muslimheritage.com/botany-herbs-and-healing-in-islamic-science-and-medicine/>.
64. Uddin, N., Siddiqui, B. S., Begum, S., Ali, M. I., Marasini, B. P., Khan, A., & Choudhary, M. I. (2013). Bioassay-guided isolation of urease and α -chymotrypsin inhibitory constituents from the stems of *Lawsonia alba* Lam. (Henna). *Fitoterapia*, 84, 202–207.
65. Buddhadev, S. G., & Buddhadev, S. S. (2016). Ayurvedic medicinal plant *Lawsonia inermis* Linn.: a complete review. *Pharma Science Monitor*, 7(2).

66. Vohra, K., Garg, V., & Dureja, H. (2019). Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Lens culinaris medikus* seeds: an update. *Current Nutrition & Food Science*, 15(2), 121-129.
67. Pina-Pérez, M. C., & Pérez, M. F. (2018). Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 114-124.
68. Mobli, M., Qaraaty, M., Amin, G., Haririan, I., Hajimahmoodi, M., & Rahimi, R. (2015). Scientific evaluation of medicinal plants used for the treatment of abnormal uterine bleeding by *Avicenna*. *Archives of gynecology and obstetrics*, 292(1), 21–35.
69. Naikwade, P. V., Gaurav, S., Sharayu, D., & Kailas, J. (2014). Evaluation of antibacterial properties of *Musa paradisiaca* L. Leaves. In *Proceeding of the national conference on conservation of natural resources & biodiversity for sustainable development* (pp. 80-84).
70. Ahmad, B. A., Zakariyya, U. A., Abubakar, M., Sani, M. M., & Ahmad, M. A. (2019). Pharmacological activities of banana. *Banana Nutrition-Function and Processing Kinetics*, 1-20.
71. Ogbonna, O. A., Izundu, A. I., Okoye, N. H., & Ikeyi, A. P. (2016). Phytochemical compositions of fruits of three *Musa* species at three stages of development. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(3), 48-59.
72. Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). A review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243, 89-99.
73. Hao, D. C., Gu, X. J., Xiao, P. G., & Peng, Y. (2013). Phytochemical and biological research of *Fritillaria* medicine resources. *Chinese journal of natural medicines*, 11(4), 330–344.
74. Hamarneh, S. (1972). Pharmacy in medieval Islam and the history of drug addiction. *Medical history*, 16(3), 226-237.
75. Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., & Vayalil, P. K. (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food research international*, 44(7), 1812-1822.
76. Bekir, J., Mars, M., Vicendo, P., Ftterich, A., & Bouajila, J. (2013). Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferation activities of pomegranate (*Punica granatum*) flowers. *Journal of medicinal food*, 16(6), 544–550.
77. Nassiri-Asl, M., & Hosseinzadeh, H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy research : PTR*, 23(9), 1197–1204.
78. Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T., & Li, H. B. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(6), 185.
79. Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., Crisponi, G., & Zoroddu, M. A. (2015). Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*, 284, 329-350.
80. Zhu, C., Guo-Qiang, C., Zhi-Xiang, S., Sai-Juan, C., & Zhen-Yi, W. (2001, January). Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: in vitro and in vivo studies. In *Seminars in hematology* (Vol. 38, No. 1, pp. 26-36). WB Saunders.
81. Salvador, J. A., Figueiredo, S. A., Pinto, R. M., & Silvestre, S. M. (2012). Bismuth compounds in medicinal chemistry. *Future medicinal chemistry*, 4(11), 1495–1523.
82. Codiță, I., Caplan, D. M., Drăgulescu, E. C., Lixandru, B. E., Coldea, I. L., Dragomirescu, C. C., Surdu-Bob, C., & Bădulescu, M. (2010). Antimicrobial activity of copper and silver

nanofilms on nosocomial bacterial species. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, 69(4), 204–212.

83. Wu, T. W., & Tsai, F. P. (2016). Comparison of the Therapeutic Effects and Side Effects of Oral Iron Supplements in Iron Deficiency Anemia. *Drug research*, 66(5), 257–261.

84. Mittapally, S., Taranum, R., & Parveen, S. (2018). Metal ions as antibacterial agents. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6-s), 411–419.

85. Fonteh, P. N., Keter, F. K., & Meyer, D. (2011). New bis(thiosemicarbazone) gold(III) complexes inhibit HIV replication at cytostatic concentrations: potential for incorporation into virostatic cocktails. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(9), 1173–1180.

86. Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M. A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 263–274.

87. Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K., & Librowski, T. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology*, 25(1), 11–24.

88. Sun, H., & Zu, Y. (2015). A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 11959–11980.

89. Leroux, V. (2006). *Modélisation d'inhibiteurs du domaine SH2 de la protéine Grb2 par dynamique moléculaire, docking et criblage virtuel* (Doctoral dissertation).

90. Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S. & Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227–1232.

91. Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E., & Petsch, B. (2018). New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Frontiers in immunology*, 9, 1963.

92. Ho, W., Gao, M., Li, F., Li, Z., Zhang, X. Q., & Xu, X. (2021). Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Advanced healthcare materials*, 10(8), e2001812.

93. Thérapie génique · Inserm, La science pour la santé. <https://www.inserm.fr/dossier/therapie-genique/>.

94. Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature reviews Drug discovery*, 16(3), 181–202.

95. Meng, H. M., Liu, H., Kuai, H., Peng, R., Mo, L., & Zhang, X. B. (2016). Aptamer-integrated DNA nanostructures for biosensing, bioimaging and cancer therapy. *Chemical Society reviews*, 45(9), 2583–2602.

96. Goux, E. (2016). *Utilisation d'aptamères impliqués dans des complexe «kissing» pour la détection de petits ligands* (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).

97. Kilgour, M., Liu, T., Dementyev, I. S., & Simine, L. (2022). E2EDNA 2.0: Python Pipeline for Simulating DNA Aptamers with Ligands. *Journal of Open Source Software*, 7(73), 4182.

98. Xiang, D., Zheng, C., Zhou, S. F., Qiao, S., Tran, P. H., Pu, C., Li, Y., Kong, L., Kouzani, A. Z., Lin, J., Liu, K., Li, L., Shigdar, S., & Duan, W. (2015). Superior Performance of Aptamer in Tumor Penetration over Antibody: Implication of Aptamer-Based Theranostics in Solid Tumors. *Theranostics*, 5(10), 1083–1097.

99. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822.

100. Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*, 24(4), 381–403.
101. Mercier, M. C., Dontenwill, M., & Choulier, L. (2017). Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers. *Cancers*, 9(6), 69.
102. Chauveau, F., Aissouni, Y., Hamm, J., Boutin, H., Libri, D., Ducongé, F., & Tavitian, B. (2007). Binding of an aptamer to the N-terminal fragment of VCAM-1. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(22), 6119–6122.
103. Liu, Y., Kuan, C. T., Mi, J., Zhang, X., Clary, B. M., Bigner, D. D., & Sullenger, B. A. (2009). Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. *Biological chemistry*, 390(2), 137–144.
104. Ohuchi S. (2012). Cell-SELEX Technology. *BioResearch open access*, 1(6), 265–272.
105. Zhang, Y., Chen, Y., Han, D., Ocoy, I., & Tan, W. (2010). Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies. *Bioanalysis*, 2(5), 907–918.
106. Chen, F., Zhou, J., Luo, F., Mohammed, A. B., & Zhang, X. L. (2007). Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(3), 743–748.
107. Tang, Z., Parekh, P., Turner, P., Moyer, R. W., & Tan, W. (2009). Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clinical chemistry*, 55(4), 813–822.
108. Kratschmer, C., & Levy, M. (2017). Effect of Chemical Modifications on Aptamer Stability in Serum. *Nucleic acid therapeutics*, 27(6), 335–344.
109. Qi, S., Duan, N., Khan, I. M., Dong, X., Zhang, Y., Wu, S., & Wang, Z. (2022). Strategies to manipulate the performance of aptamers in SELEX, post-SELEX and microenvironment. *Biotechnology advances*, 55, 107902.
110. Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C., & Jayasena, S. D. (1994). Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic acids research*, 22(24), 5229–5234
111. Ni, S., Yao, H., Wang, L., Lu, J., Jiang, F., Lu, A., & Zhang, G. (2017). Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1683.
112. Elskens, J. P., Elskens, J. M., & Madder, A. (2020). Chemical Modification of Aptamers for Increased Binding Affinity in Diagnostic Applications: Current Status and Future Prospects. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4522.
113. Röthlisberger, P., Gasse, C., & Hollenstein, M. (2017). Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2430.
114. Petersen, M., & Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in biotechnology*, 21(2), 74–81.
115. Odeh, F., Nsairat, H., Alshaer, W., Ismail, M. A., Esawi, E., Qaqish, B., Bawab, A. A., & Ismail, S. I. (2019). Aptamers Chemistry: Chemical Modifications and Conjugation Strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 3.
116. Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr, Guyer, D. R., & Adamis, A. P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(2), 123–132.

117. Zhu, G., & Chen, X. (2018). Aptamer-based targeted therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 134, 65-78.
118. Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(7), 537–550.
119. Chen, Z., & Xu, X. (2016). Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy. *Saudi medical journal*, 37(12), 1312–1318
120. Kumar Kulabhusan, P., Hussain, B., & Yüce, M. (2020). Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics*, 12(7), 646.
121. Chandola, C., Kalme, S., Casteleijn, M. G., Urtti, A., & Neerathilingam, M. (2016). Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *Journal of biosciences*, 41(3), 535–561.
122. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
123. Gutiérrez-Santana, J. C., Toscano-Garibay, J. D., López-López, M., & Coria-Jiménez, V. R. (2020). Aptamers coupled to nanoparticles in the diagnosis and treatment of microbial infections. Aptámeros acoplados a nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones microbianas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*, 38(7), 331–337.
124. Zhao, N., You, J., Zeng, Z., Li, C., & Zu, Y. (2013). An ultra pH-sensitive and aptamer-equipped nanoscale drug-delivery system for selective killing of tumor cells. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 9(20), 3477–3484.
125. Zhang, Y., Lai, B. S., & Juhas, M. (2019). Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(5), 941.
126. Yang, X., Zhuo, Y., Zhu, S., Luo, Y., Feng, Y., & Xu, Y. (2015). Selectively assaying CEA based on a creative strategy of gold nanoparticles enhancing silver nanoclusters' fluorescence. *Biosensors & bioelectronics*, 64, 345–351.
127. Zhang, F., Li, S., Cao, K., Wang, P., Su, Y., Zhu, X., & Wan, Y. (2015). A Microfluidic Love-Wave Biosensing Device for PSA Detection Based on an Aptamer Beacon Probe. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(6), 13839–13850.
128. Wang, K., Fan, D., Liu, Y., & Wang, E. (2015). Highly sensitive and specific colorimetric detection of cancer cells via dual-aptamer target binding strategy. *Biosensors & bioelectronics*, 73, 1–6.
129. Ye, X., Shi, H., He, X., Wang, K., He, D., Yan, L., Xu, F., Lei, Y., Tang, J., & Yu, Y. (2015). Iodide-Responsive Cu-Au Nanoparticle-Based Colorimetric Platform for Ultrasensitive Detection of Target Cancer Cells. *Analytical chemistry*, 87(14), 7141–7147.
130. Lee, J., Kang, H. J., Jang, H., Lee, Y. J., Lee, Y. S., Ali, B. A., Al-Khedhairi, A. A., & Kim, S. (2015). Simultaneous imaging of two different cancer biomarkers using aptamer-conjugated quantum dots. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(4), 8595–8604.
131. Hicke, B. J., Marion, C., Chang, Y. F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., Schmidt, P. G., & Warren, S. (2001). Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *The Journal of biological chemistry*, 276(52), 48644–48654.
132. Zhang, P., Zhao, N., Zeng, Z., Feng, Y., Tung, C. H., Chang, C. C., & Zu, Y. (2009). Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89(12), 1423–1432.

133. Fechter, P., Cruz Da Silva, E., Mercier, M. C., Noulet, F., Etienne-Seloum, N., Guenot, D., Lehmann, M., Vauchelles, R., Martin, S., Lelong-Rebel, I., Ray, A. M., Seguin, C., Dontenwill, M., & Choulier, L. (2019). RNA Aptamers Targeting Integrin $\alpha 5\beta 1$ as Probes for Cyto- and Histofluorescence in Glioblastoma. *Molecular therapy. Nucleic acids*, *17*, 63–77.
134. Hou, J., Yan, D., Liu, Y., Huang, P., & Cui, H. (2020). The Roles of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Human Cancer. *OncoTargets and therapy*, *13*, 13329–13344.
135. Cruz Da Silva, E., Foppolo, S., Lhermitte, B., Ingremeau, M., Justiniano, H., Klein, L., Chenard, M. P., Vauchelles, R., Abdallah, B., Lehmann, M., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., & Choulier, L. (2022). Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity. *Pharmaceutics*, *14*(10), 1980.
136. Marton, S., Cleto, F., Krieger, M. A., & Cardoso, J. (2016). Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to *E. coli*. *PloS one*, *11*(4), e0153637.
137. Kim, Y. S., Song, M. Y., Jurng, J., & Kim, B. C. (2013). Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Analytical biochemistry*, *436*(1), 22–28.
138. Huang, Y., Chen, X., Xia, Y., Wu, S., Duan, N., Ma, X., & Wang, Z. (2014). Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Staphylococcus aureus* enterotoxin A. *Analytical methods*, *6*(3), 690-697.
139. Song, Y., Song, J., Wei, X., Huang, M., Sun, M., Zhu, L., Lin, B., Shen, H., Zhu, Z., & Yang, C. (2020). Discovery of Aptamers Targeting the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Analytical chemistry*, *92*(14), 9895–9900.
140. Liu, X., Wang, Y. L., Wu, J., Qi, J., Zeng, Z., Wan, Q., Chen, Z., Manandhar, P., Cavener, V. S., Boyle, N. R., Fu, X., Salazar, E., Kuchipudi, S. V., Kapur, V., Zhang, X., Umetani, M., Sen, M., Willson, R. C., Chen, S. H., & Zu, Y. (2021). Neutralizing Aptamers Block S/RBD-ACE2 Interactions and Prevent Host Cell Infection. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *60*(18), 10273–10278.
141. Achiko, A. G. (2021). Saliva-based COVID-19 DNA Aptamer Test. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04974203>.
142. Achiko AG Obtains CE Mark for AptameXTM Covid-19 Rapid Test. <https://www.eqs-news.com/news/adhoc/achiko-ag-obtains-ce-mark-for-aptamextm-covid-19-rapid-test/1575171>.
143. Strehlitz, B., Nikolaus, N., & Stoltenburg, R. (2008). Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *8*(7), 4296–4307.
144. McKeague, M., Velu, R., Hill, K., Bardóczy, V., Mészáros, T., & DeRosa, M. C. (2014). Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins*, *6*(8), 2435–2452.
145. Rotherham, L. S., Maserumule, C., Dheda, K., Theron, J., & Khati, M. (2012). Selection and application of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples. *PloS one*, *7*(10), e46862.
146. Barbier, F., Andremont, A., Wolff, M., & Bouadma, L. (2013). Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Current opinion in pulmonary medicine*, *19*(3), 216–228.
147. Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *171*(11), 1209-1223.

148. Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419–426.
149. Lee, E., & Anjum, F. (2020). *Staphylococcus epidermidis*. *StatPearls*
150. Sassi, M., Felden, B., & Augagneur, Y. (2014). Draft Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Strain HG003, an NCTC8325 Derivative. *Genome announcements*, 2(4), e00855-14.
151. Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462.
152. Shariff, M., Aditi, A., & Beri, K. (2018). *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen. *Journal of infection in developing countries*, 12(7), 581–586.
153. Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., & Di Bonaventura, G. (2008). Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS microbiology letters*, 287(1), 41–47.
154. Wang, D. L., Song, Y. L., Zhu, Z., Li, X. L., Zou, Y., Yang, H. T., Wang, J. J., Yao, P. S., Pan, R. J., Yang, C. J., & Kang, D. Z. (2014). Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(4), 681–685.
155. Abdallah, B., Benhassou, H. A., Sbabou, L., Janel-Bintz, R., Choulier, L., Pitchon, V., & Fechter, P. (2023). History as a Source of Innovation in Antimicrobial Drug Discovery. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 16(2), 739-752.
156. Pitchon, V., Aubert, E., Vonthron, C., & Fechter, P. (2022). How history can help present research of new antimicrobial strategies: the case of cutaneous infections' remedies containing metals from the Middle Age Arabic pharmacopeia. *Medicinal Plants as Anti-Infectives*, 459-478.
157. Ya'qub ibn Ishaq Al-Kindi, & Levey, M. (1966). *The Medical Formulary Or Aqrabadhin of Al-Kindi: Translated with a Study of Its Materia Medica by Martin Levey*. University of Wisconsin Press.
158. Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., Ait BenHassou, H., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., Fournel, S., Pitchon, V., & Fechter, P. (2022). Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 71, 126926.
159. Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., & Liu, L. (2017). Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 1913.
160. Kim, C. M., & Shin, S. H. (2009). Effect of iron-chelator deferiprone on the in vitro growth of staphylococci. *Journal of Korean medical science*, 24(2), 289–295.
161. Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 99–107.
162. Wang, K. Y., Zeng, Y. L., Yang, X. Y., Li, W. B., & Lan, X. P. (2011). Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 30(2), 273–278.

163. World Health Organization. (2012). Communicable Diseases Cluster, Stop TB Department. *World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual*.
164. Maillet, M., Janssen, C., & Fraisse, P. (2020). Mycobacterium tuberculosis. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 12, A21-A24.
165. Chahboune, M., Barkaoui, M., Iderdar, Y., Alwachami, N., Mourajid, Y., Ifleh, M., Boumendil, K., Bachar, K., & El Madani, S. (2022). Profil épidémiologique, aspects diagnostiques et évolutifs des patients tuberculeux au centre de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires de Settat, Maroc [Epidemiological profile and diagnostic and evolutionary features of TB patients at the Diagnostic Centre for Tuberculosis and Respiratory Diseases in Settat, Morocco]. *The Pan African medical journal*, 42, 185.
166. Cao, X., Li, S., Chen, L., Ding, H., Xu, H., Huang, Y., Li, J., Liu, N., Cao, W., Zhu, Y., Shen, B., & Shao, N. (2009). Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus. *Nucleic acids research*, 37(14), 4621–4628.
167. Moon, J., Kim, G., Park, S. B., Lim, J., & Mo, C. (2015). Comparison of whole-cell SELEX methods for the identification of Staphylococcus aureus-specific DNA aptamers. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(4), 8884–8897.
168. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 66(2), 86–92.
169. Wang, D. L., Song, Y. L., Zhu, Z., Li, X. L., Zou, Y., Yang, H. T., Wang, J. J., Yao, P. S., Pan, R. J., Yang, C. J., & Kang, D. Z. (2014). Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(4), 681–685.
170. Ning, Y., Cheng, L., Ling, M., Feng, X., Chen, L., Wu, M., & Deng, L. (2015). Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer. *Pathogens and disease*, 73(6), ftv034.
171. Lijuan, C., Xing, Y., Minxi, W., Wenkai, L., & Le, D. (2017). Development of an aptamer-ampicillin conjugate for treating biofilms. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(2), 847–854.
172. Bottari, F., Daems, E., de Vries, A. M., Van Wielendaele, P., Trashin, S., Blust, R., Sobott, F., Madder, A., Martins, J. C., & De Wael, K. (2020). Do Aptamers Always Bind? The Need for a Multifaceted Analytical Approach When Demonstrating Binding Affinity between Aptamer and Low Molecular Weight Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 142(46), 19622–19630.
173. Kelly, L., Maier, K. E., Yan, A., & Levy, M. (2021). A comparative analysis of cell surface targeting aptamers. *Nature communications*, 12(1), 6275.
174. Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., Moffatt, M. F., & Cookson, W. O. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one*, 5(1), e8578.
175. Louche, A., Salcedo, S. P., & Bigot, S. (2017). Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1615, 247–255.
176. Ommen, P., Hansen, L., Hansen, B. K., Vu-Quang, H., Kjems, J., & Meyer, R. L. (2022). Aptamer-Targeted Drug Delivery for Staphylococcus aureus Biofilm. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 814340.

177. Ni, S., Zhuo, Z., Pan, Y., Yu, Y., Li, F., Liu, J., Wang, L., Wu, X., Li, D., Wan, Y., Zhang, L., Yang, Z., Zhang, B. T., Lu, A., & Zhang, G. (2021). Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS applied materials & interfaces*, *13*(8), 9500–9519.

ANNEXES

Annexe 1

PREPARATION DU REMEDE 2

Types d'échantillons des extraits de plantes du Remède 2

- **COMA** : *Commiphora abyssinicae* ou *Commyphora myrrha* ou myrrhe (oléorésine)

COMAA : // extrait acétate d'éthyle, 24H à l'obscurité sous agitation

COMAD : // extrait dichlorométhane, 24H à l'obscurité sous agitation

COMAEH : // extrait éthanol/eau 70/30, 24H à l'obscurité sous agitation

- **ALOF** : *Aloe ferox* ou aloès (suc)

ALOFA : // extrait acétate d'éthyle, 24H à l'obscurité sous agitation

ALOFEH : // extrait éthanol/eau 70/30, 24H à l'obscurité sous agitation

- **ALOF + COMA** : mélange 50/50 des extraits d'aloès et de myrrhe

ALOFCOMA : mélange 50/50 de myrrhe et d'aloès

ALOFCOMAA : // extrait acétate d'éthyle, 24H à l'obscurité sous agitation

ALOFCOMAD : // extrait dichlorométhane, 24H à l'obscurité sous agitation

ALOFCOMAEH : // extrait éthanol/eau 70/30, 24H à l'obscurité sous agitation

Les extractions ont été réalisées au sein de l'UMR 7200-LIT.

Pour chaque plante (ou mélange de plantes), trois extractions non- successives ont été réalisées dans 3 solvants de polarité décroissante : éthanol à 70% EtOH70%, acétate d'éthyle, et dichlorométhane.

Les plantes, en larmes ou blocs, ont été broyées au mortier. Ensuite les extractions ont été réalisées par macération de 72h en renouvelant le solvant d'extraction toutes les 24h, dans des proportions plante/solvant 1/10 (m/V), sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière. Le renouvellement du solvant était fait en filtrant l'extrait : le marc était remis à extraire dans un volume de solvant non-saturé en composés et le filtrat était évaporé afin d'obtenir un extrait sec.

Annexe 2

COMPOSITION ET PREPARATION DES TAMPONS

Préparation du tampon d'hybridation

- Pour 50mL du tampon d'hybridation :

Composant	Solution stock	Concentration finale	Volume de prise
Tris-HCl	1M à pH=7.4	50mM	2.5mL
KCl	3M	5mM	83 μ L
NaCl	3M	100mM	1.6mL
MgCl ₂	1M	1mM	50 μ L
NaN ₃	1%	0.1%	5mL

Compléter à 50mL avec de l'eau distillée dH₂O..

Stériliser en utilisant un filtre à 0,4 μ m.

Préparation du tampon de blocage

- Pour 1mL du tampon de blocage :

Dans 1mL du tampon d'hybridation, nous ajoutons l'albumine du sérum bovin (BSA) pour une concentration finale de 10mg/mL + ARNt (pour une concentration finale de 1 μ g/mL)

Préparation du Paraformaldéhyde 4%

- PFA 16% commercial à diluer dans du PBS 1X filtré.

Article

Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity

Elisabete Cruz Da Silva ^{1,†} , Sophie Foppolo ^{1,†} , Benoît Lhermitte ^{1,2}, Marina Ingremeau ¹, Hélène Justiniano ¹, Lorraine Klein ¹, Marie-Pierre Chenard ^{2,3}, Romain Vauchelles ¹, Basma Abdallah ^{1,4}, Maxime Lehmann ⁵ , Nelly Etienne-Selloum ^{1,6} , Monique Dontenwill ¹  and Laurence Choulier ^{1,*} 

¹ Laboratory of Bioimaging and Pathologies, University of Strasbourg, UMR 7021 CNRS, 67400 Illkirch, France

² Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France

³ Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France

⁴ Laboratory of Biotechnology and Cell Signaling, University of Strasbourg, UMR 7242 CNRS, 67400 Illkirch, France

⁵ EFS Grand Est, INSERM UMRS 1255, 67000 Strasbourg, France

⁶ Department of Pharmacy, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France

* Correspondence: laurence.choulier@unistra.fr; Tel.: +33-(0)-3-68-85-41-14

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Cruz Da Silva, E.; Foppolo, S.; Lhermitte, B.; Ingremeau, M.; Justiniano, H.; Klein, L.; Chenard, M.-P.; Vauchelles, R.; Abdallah, B.; Lehmann, M.; et al. Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1980. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101980>

Academic Editor: Yoshiyuki Hattori

Received: 26 July 2022

Accepted: 14 September 2022

Published: 20 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright:   2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nucleic-acid aptamers are of strong interest for diagnosis and therapy. Compared with antibodies, they are smaller, stable upon variations in temperature, easy to modify, and have higher tissue-penetration abilities. However, they have been little described as detection probes in histology studies of human tissue sections. In this study, we performed fluorescence imaging with two aptamers targeting cell-surface receptors EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$, both involved in the aggressiveness of glioblastoma. The aptamers' cell-binding specificities were confirmed using confocal imaging. The affinities of aptamers for glioblastoma cells expressing these receptors were in the 100–300 nM range. The two aptamers were then used to detect EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ in human glioblastoma tissues and compared with antibody labeling. Our aptafluorescence assays proved to be able to very easily reveal, in a one-step process, not only inter-tumoral glioblastoma heterogeneity (differences observed at the population level) but also intra-tumoral heterogeneity (differences among cells within individual tumors) when aptamers with different specificities were used simultaneously in multiplexing labeling experiments. The discussion also addresses the strengths and limitations of nucleic-acid aptamers for biomarker detection in histology.

Keywords: nucleic-acid aptamers; histofluorescence; multiplexing; cell-surface receptors; detection; EGFR; integrin $\alpha 5\beta 1$; glioblastoma

1. Introduction

Conventional immunohistochemistry (IHC) is a standard diagnostic process in tissue pathology that complements hematoxylin–eosin staining and is commonly used for tumor diagnosis, guiding patient stratification and treatment decision. This tissue-based technique is, however, limited by the labeling of only one biomarker per section of tissue. Yet, unique marker characterization is slowly becoming replaced by tumoral molecular signatures based on mRNA and protein expression data. Multiplex tissue imaging allows the detection of multiple biomarkers in the same tissue section to be performed, revealing the spatial relationships among the cells expressing these biomarkers. Various antibody-based approaches have been developed to detect together several antigens in tissue samples [1–3]. The most common methods use sequential colorimetric or fluorescent staining. Briefly, the classical IHC approach relies on the use of a primary antibody to detect the target of interest and an anti-species secondary antibody labeled with an enzyme or a fluorophore for signal detection. For an example of immunofluorescent detection, horse-radish peroxidase can be

used to catalyze a reaction between tyramide and tyrosine residues on or near the epitope and to covalently deposit a fluorophore on the tissue section [3–5]. Multiplex tissue imaging can also be achieved via sequential staining rounds after the chemical or heat-mediated stripping of antibodies [6]. This detection method does not require labeled primary antibodies, and IHC clinically validated antibodies can be used. Although good results have been achieved using this approach, it is time consuming; the stripping rounds can damage tissues; and secondary antibodies should be carefully considered to avoid cross-reactivity. Staining protocols are simplified and performed faster using primary antibodies directly conjugated to fluorophores or metal isotopes, enzymes, oligonucleotides, etc., which can be used for detection [1]. Conjugation, however, is not a turnkey process and might lead to batch-to-batch variations.

Another approach, based on nucleic-acid aptamers, is worth exploring to detect one or different molecular biomarkers at the same time in a single tissue section. Aptamers are small RNA or ssDNA sequences that acquire a three-dimensional structure to bind to their targets with high affinities and specificities. They are also referred to as ‘chemical antibodies’ [7]. Besides their relevance for therapeutic applications [8], aptamers offer a promising field of investigation for diagnostic studies, such as histochemistry, *in vivo* molecular imaging, the isolation and detection of cancer cells (including circulating tumoral cells), and the identification of cellular biomarkers or circulating biomarkers in liquid biopsies [9–11]. Aptamers are chemically synthesized. As such, compared with antibodies, they are faster and cheaper to produce and easier to directly conjugate to a wide range of tags with high batch fidelity. Approximately 5–10 times smaller than monoclonal antibodies, they have better tissue-penetration abilities [12], which may be an advantage in histology, when the accessibility of the epitope is reduced, such as in fixed tissue [13], or for multiplexing, when steric hindrance might compromise ligand accessibility. Aptamers are thus emerging diagnostic tools to complement their protein alter egos. Despite all their advantages and since their potential for patient tissue staining was first validated in 2010 [14], only few aptamers have been described so far for staining histological tissue sections ([15] and reviewed by [13,16,17]). Moreover, to our knowledge, only one study refers to aptamer-based multiplexing in tumoral tissue [18].

We are interested in the aptamer-based fluorescent detection of glioblastoma (GBM) biomarkers. GBM is the most common and aggressive brain tumor in adults, with a median overall survival under 20 months [19]. The standard treatment, which consists of maximal tumor resection with adjuvant concomitant radio-chemotherapy, has remained unchanged since 2005 [20]. Many molecular targets have been identified, and a number of targeted therapies under clinical evaluation have been reported. However, so far, they remain inefficient [21]. GBMs, as the name suggests, are characterized by high heterogeneity. Histological features that characterize GBM are the presence of atypia, mitotic activity, increased cell density, necrosis, and the abnormal growth of blood vessels around the tumor [22]. Since 2016, the GBM diagnostic has been based on both histological and molecular characteristics according to the World Health Organization (WHO) classification of tumors of the central nervous system [23]. The recent 2021 WHO classification has added even more molecular features, and one of them to be noted in relation to our study is the EGFR amplification [24]. However, additional reliable biomarkers are urgently needed to better assess the prognosis of GBM patients, some of them being cell-surface protein biomarkers, the expression of which is often remodeled [21,25,26]. In this study, we addressed EGFR (epidermal growth factor receptor) and the $\alpha 5\beta 1$ integrin.

EGFR, a 170 kDa member of the HER gene family of proteins that contains four receptor tyrosine kinases (RTKs), drives the development of solid tumors [27]. Its overexpression leads to aberrant signaling pathways promoting tumor-cell proliferation, growth, survival, differentiation, and angiogenesis. In GBM, EGFR is amplified and/or mutated in more than 40% of cases [28]. After those targeting VEGF (vascular endothelial growth factor) and VEGFR (VEGF receptor), the most frequently reported drugs in GBM targeted therapies are those targeting EGFR. Forty clinical trials in phases II–IV reported in the last 20 years were

based on tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies [21,29]. Integrins, a family of $\alpha\beta$ heterodimeric transmembrane cell-surface adhesion and signaling receptors, are implicated in cell–cell and cell–matrix communication and are expressed in all nucleated cells of multi-cellular animals [30]. In vertebrates, integrins synergize with other receptors, including RTKs. Frequently overexpressed in solid tumors, integrins promote cell survival, proliferation, invasion, and stemness maintenance and are major actors in disease progression and resistance to therapies [31–35]. In GBM, several integrins are overexpressed in tumoral and endothelial cells [36]. Higher expression levels of the fibronectin receptor, integrin $\alpha5\beta1$, are observed in GBM tissue compared with adjacent normal brain tissue [37]. This overexpression was associated with GBM aggressiveness at the RNA [38–40] and protein levels [41].

EGFR and integrin $\alpha5\beta1$ are two cell-surface receptors that share common features in their signaling pathways, leading to the development of compensatory mechanisms implicated in resistance to therapies targeting RTKs [32]. They are targets of therapeutic interest in the fight against the emergence of resistance. Inhibiting these receptors individually displayed poor results in GBM clinical trials [21].

However, combined targeted therapies would certainly prove to be more effective for this highly heterogeneous tumor [42], which emphasizes the importance of patient selection for personalized treatments. Molecular imaging techniques are needed for detecting GBM biomarkers. Our study focused on the use of fluorophore-conjugated nucleic-acid aptamers targeting EGFR and the $\alpha5\beta1$ integrin as detection tools on GBM cells and tissues. Target expression and aptamer binding were first validated in cell lines using flow cytometry and confocal imaging. Aptamers were then further compared to antibodies and used in mono- or multiplexing experiments on formalin-fixed and paraffin-embedded human brain tissues to highlight tumoral heterogeneity. Figure 1 illustrates the experimental design of our study.

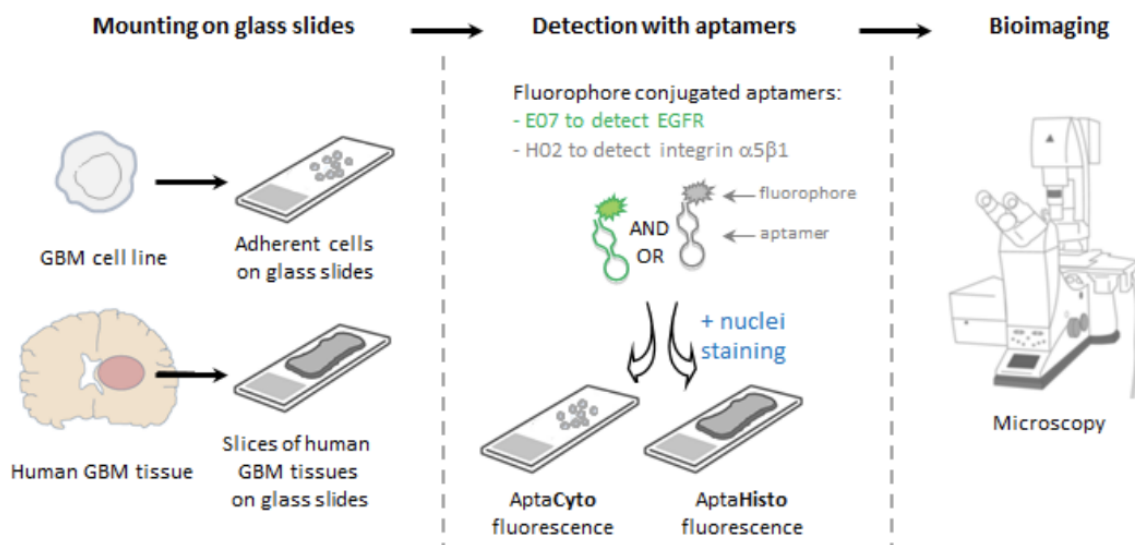


Figure 1. Experimental scheme illustrating the aptafluorescence experiments. After mounting GBM cells or tissues on glass, cells or tissues were incubated with aptamers covalently conjugated to fluorophores. Two aptamers with different specificities were used in this study: aptamer E07 to detect EGFR and aptamer H02 to detect integrin $\alpha5\beta1$. At the end of this manuscript, we also describe a technique in which both aptamers were simultaneously incubated on GBM tissues (multiplexing experiments). Fluorescence microscopy was then realized for bioimaging. Drawings are not to scale.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All nucleic-acid aptamers and chemicals were purchased from IBA Lifesciences (Goettingen, Germany), Eurogentec (Seraing, Belgium), and Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). The sequences of all aptamers from this study are described in Supplementary Table S1.

2.2. Cell Culture

Cell culture media and reagents were from Lonza (Basel, Switzerland) or Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Human GBM cell line U87MG EGFR WT was kindly provided by Dr. Frank Furnari [43]. LN319, MCF7, and MDA-MB-231 were kindly provided by Pr. Monika Hegi (Lausanne, Switzerland) and Dr. Catherine Tomasetto (IGBMC, Illkirch, France), respectively. The cell lines from GBM were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% sodium pyruvate, and 1% non-essential amino acids, in a 37 °C humidified incubator with 5% CO₂. The MCF7 cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), containing 1 g/L glucose and supplemented with 10% FBS, 40 µg/mL gentamicin, and 0.6 µg/mL insulin. The MDA-MB-231 cell line was maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 10% FBS and 40 µg/mL gentamicin.

2.3. Western Blot

Cells were lysed in 1% Triton X-100, NaF [100 mmol/L], NaPPi [10 mmol/L], and Na₃VO₄ [1 mmol/L] in PBS, supplemented with complete anti-protease cocktail (Roche, Basel, Switzerland). A total of 10 µg of protein was separated on precast gradient 4–20% SDS-PAGE gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). After blocking, membranes were probed with primary antibodies targeting EGFR (D38B1, #4267; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), α5 integrin (D7B7G, #98204S; Cell Signaling Technology), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Millipore, Molsheim, France). Immunological complexes were revealed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Promega, Madison, WI, USA) at a 1/10,000 dilution. Revelation was performed with enhanced chemiluminescence (ECL; BioRad) using an LAS4000 imager (GE Healthcare, Dornstadt, Germany). GAPDH was used as housekeeping protein to serve as the loading control for all cell lysate samples. The quantification of non-saturated images was performed with ImageJ software. Analyses were performed on at least three independent experiments.

2.4. Flow Cytometry

For the determination of equilibrium binding affinities using flow cytometry, aptamer E07 was used at different concentrations (5000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 10, and 1 nM). After detachment with 0.2 M EDTA, 300,000 cells were incubated for 30 min with Cy5-labeled aptamers under gentle agitation to avoid cell sedimentation. Cells used as controls were incubated with Cetuximab at 1 µg/mL for 3 min, washed, and then analyzed (counting 10,000 events) using an FACSCalibur flow cytometer (Beckson Dickinson, Le Pont de Claix, France). Flowing software (version 2.5.1, Turku Bioscience, Turku, Finland) was used to analyze data. To determine the equilibrium constant, K_D, experiments were repeated three times, and GraphPad Prism software (version 5.04, Dotmatics, San Diego, CA, USA) was used.

2.5. Fluorescence-Based Assays on Cell Lines

Adherent cells were plated on sterile glass coverslips for one night at 37 °C in culture medium, washed three times, and then saturated for 1 h at room temperature (RT) in selection buffer (phosphate-buffered saline, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂; pH 7.4) containing 2% BSA. Labeled aptamers were denatured at 95 °C for 3 min, incubated on ice for 5 min

before being resuspended in selection buffer, and applied to cells for 30 min at 37 °C. Cells were then washed in selection buffer, fixed for 8 min in 4% paraformaldehyde (PFA), permeabilized for 2 min with 0.2% Triton, and washed again. Then, immunocytochemistry was performed with the following primary antibodies: anti-EGFR (clone D1D4J; Cell Signaling Technology; 1/200) and anti-EEA1 (early endosome antigen 1; clone 14/EEA1; BD Transduction Laboratories; 1/1000). Primary antibodies were added overnight (O/N) at 4 °C, followed by two washes and incubation for 1 h at RT with a secondary antibody conjugated to Alexa 488 or 568 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at a 1 µg/mL final concentration. DAPI was added at 1 µg/mL to visualize nuclei. Washing steps were performed before mounting using fluorescent mounting medium (S3023; Dako, Carpinteria, CA, USA).

2.6. Human Tissue Samples

Twenty patients' histologic fresh-frozen, formalin-fixed, paraffin-embedded GBM tissues were obtained from the tumor collection of the pathology department of Strasbourg University Hospital (Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; declaration number DC-2016-2677t) after obtaining written informed consents from patients. Twenty hematoxylin–eosin-stained paraffin-embedded human tissues, examined by one neuropathologist (B.L.), were confirmed as GBMs according to the 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system [24]. Two human epileptic brain tissue samples were used as non-tumoral tissues. Negative controls were performed either with DAPI alone or, for immunolabeling experiments, without adding primary antibodies (i.e., only secondary antibodies were added).

2.7. Fluorescence-Based Labeling Assays on Human Tissue Samples

Apta- and immunostaining were realized using tissue sections mounted on glass slides. Paraffin-embedded sections were deparaffinized, rehydrated through a graded alcohol series, and subjected to an antigen unmasking protocol. Briefly, sections were boiled at 100 °C for 10 min in target retrieval solution at pH 9 (S2367; Dako), cooled down to RT for 20–40 min, and rinsed briefly in H₂O; then, they were washed in selection buffer. Fresh-frozen sections were fixed in 4% PFA for 10 min at RT and then washed in selection buffer. For aptafluorescence, slides were rinsed for 5 min in H₂O and then in blocking buffer (selection buffer, 2% BSA) in the presence or not of 100 µg/mL tRNA from baker's yeast (R56-36; Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) or yeast tRNA plus salmon sperm DNA (D1626; Sigma-Aldrich) for 1 h in a humid chamber at RT; they were rinsed in H₂O, followed by selection buffer, and drained. Aptamers were denatured at 95 °C for 3 min and incubated on ice for 5 min before dilution in selection buffer to a final concentration of 1 or 2 µM for aptamer H02 targeting the α5 integrin and 500 nM for aptamer E07 targeting EGFR. Aptamers were incubated in tumor sections for 1 h on ice, briefly washed in selection buffer, drained, fixed in 4% PFA, and then washed three times in PBS. For immunofluorescence, slides were rinsed briefly in PBS, washed for 5 min in PBS-T (0.1% Tween-20 in PBS), drained, and then incubated in blocking buffer BB-I (5% goat serum in PBS, 0.1% Triton X-100) for 1 h in a humid chamber. O/N incubation with anti-integrin α5 mAb 1928 (6B8516; Millipore, Molsheim, France; 1/200) in BB-I was followed by 3 washes of 3 min in PBS-T and by an incubation step with a 1/500 dilution of a secondary antibody raised against the host species used to generate the primary antibodies, conjugated to Alexa Fluor 488 or 647 (ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Germany; A-21245, A-11008, or A-11004) in BB-I. Immuno- and aptastaining were followed by staining with DAPI at a 1 µg/mL final concentration for 30 min at RT to visualize cell nuclei. Stained samples were then washed in PBS. Coverslips were mounted using fluorescent mounting medium (S3023; Dako).

2.8. EGFR Immunostaining of Human Tissue Samples

EGFR immunostaining was performed on deparaffinized GBM sections with Benchmark Ultra (Ventana, Roche, Basel, Switzerland). After pre-treatment with Protease 1 for 8 min, the monoclonal antibody clone E30 (DAKO), reactive against the extracellular domain of the EGFR protein, was used at a dilution 1/500 for 32 min. The detection ultraviolet DAB system was used for revelation. Negative controls omitting the primary antibody were included.

2.9. Imaging

Images of apta- and immunofluorescence were acquired using a NanoZoomer S60 digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Iwaka, Japan) and/or a Leica TCS SPE II confocal microscope at 20× or 63× (oil immersion) magnification. For all slide scanning, images were processed at different magnifications using NPD.view2 version 2.7.43. Mean integrated fluorescence intensity on cells and tissues was measured using ImageJ software as previously described [41,44]. The plot profile tool in ImageJ (version 1.50f, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to display a 2D histogram of the intensities of pixels along a line drawn within an image. The statistical analysis of data was performed with ANOVA. Data were analyzed with GraphPad Prism version 5.04 and are represented as means ± SEMs. Hematoxylin–eosin tumors were read using PathScan Viewer software.

3. Results

3.1. Validation of Target Expression and Aptamer Binding to Cell Lines

We recently published the identification of aptamer H02 targeting integrin $\alpha 5\beta 1$ [44]. Its affinity for GBM cell line U87MG expressing integrin $\alpha 5$ was determined using flow cytometry ($K_D = 277.8 \pm 51.8$ nM; Table 1). Using confocal imaging, we showed that this aptamer was able to discriminate among ten GBM cell lines expressing high and low levels of integrin $\alpha 5$. Similarly, in the present study, we first characterized the binding parameters of aptamer E07 targeting EGFR [45] in GBM cells.

Table 1. Affinity (K_D) of the interaction between aptamers and cells, determined using flow cytometry.

Aptamer	Target	Glioblastoma Cell Lines	K_D	Reference
H02	Integrin $\alpha 5\beta 1$	U87MG $\alpha 5+$ (expressing $\alpha 5$ integrin)	277.8 ± 51.8 nM	[44]
E07	EGFR	U87MG EGFR WT (expressing EGFR)	208.7 ± 45.6 nM	Current study

Immunoblots showed that EGFR was expressed in U87 EGFR WT cells but was absent in LN319 (Figure 2A,B). EGFR detection by means of flow cytometry in both cell lines was controlled using anti-EGFR antibody Cetuximab conjugated to Cy5 (Figure 2C, left). The shift in fluorescence intensity to the left confirms the low expression level of EGFR in LN319 compared with the U87 EGFR WT cell line. This difference in fluorescence intensity was also observed for the binding of Cy5-conjugated aptamer E07, named E07-Cy5 (Figure 2C, right). The equilibrium affinity parameter, K_D , of the interaction between E07-Cy5 and U87 EGFR WT cells was determined using flow cytometry (Figure 2D). Briefly, binding events associated with the fluorescence signal of different concentrations of aptamers, ranging from 1 nM to 5 μ M, to a constant number of cells were measured. A K_D of 208.7 ± 45.6 nM was determined by plotting the mean fluorescence of U87 EGFR WT cells against the concentration of the E07 aptamer (Figure 2D, Table 1). For confocal assays, confluent cells were stained with E07-Cy5 at 100 nM for 30 min. After cell fixation, cells were immunolabeled with an anti-EGFR primary antibody and then with a secondary antibody labeled with Alexa 568. The specificity of the E07-Cy5 aptamer was characterized on the two GBM cell lines, U87 EGFR WT and LN319, expressing high and low levels of

EGFR, respectively (Figure 2E). Confocal imaging was also performed on other cell lines: breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 (Figure S1). MDA-MB-231 expressed an intermediate level of EGFR, whereas EGFR was not immunodetected in MCF7 (Figure 2A,B). Confocal imaging shows that aptamer E07 detected EGFR on U87 EGFR WT (Figure 2E) and to a lesser extent on MDA-MB-231 cells (Figure S1). Clearly, EGFR aptalabeling corresponded with EGFR immunolabeling and reflected well the EGFR expression level in these cell lines. Fluorescently labeled aptamer E07 was not detected in the cell lines that did not express EGFR (LN319 and MCF7).

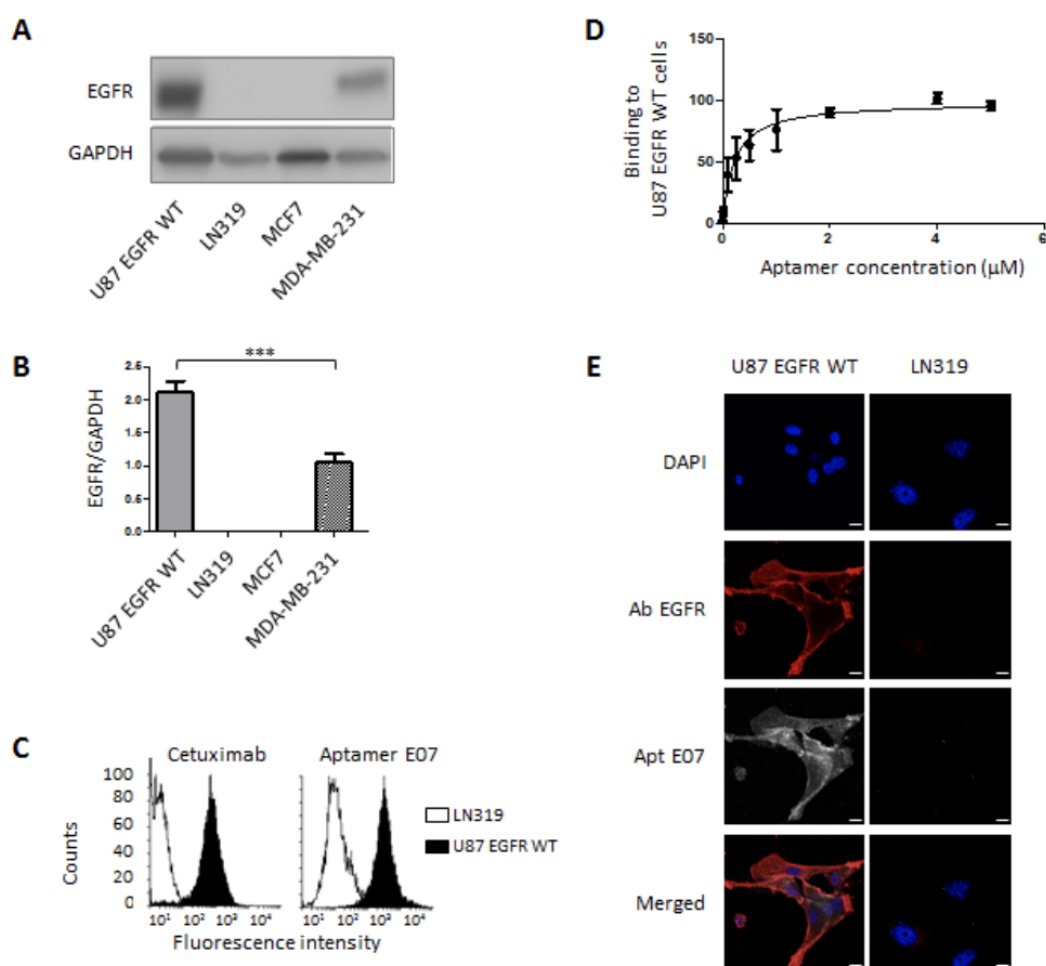


Figure 2. Validation of EGFR expression and E07 aptamer binding to cancer cells. (A,B) Immunodetection of EGFR in different cancer cell lines. (A) Immunoblot showing the expression of EGFR (175 kDa) in U87 EGFR WT, LN319, MCF7, and MDA-MB-231 cell lines. GAPDH (37 kDa) was used as loading control. (B) Quantitative immunoblot analysis. Histograms represent the means \pm SDs of three independent experiments normalized to GAPDH, with *** $p < 0.005$ (non-significant data are not specified). (C,D) Flow cytometry experiments. (C) Left side: Control of EGFR expression via the binding of EGFR antibody Cetuximab conjugated to Cy5 to U87 EGFR WT (black fill) and LN319 cells (black line, white fill). Right side: Comparison of the binding profiles of aptamer E07-Cy5 at 1 μM to U87 EGFR WT cells (black fill) and LN319 cells (black line, white fill). (D) Titration of aptamer

E07. Different concentrations of the E07-Cy5 aptamer (0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 5 μM) were incubated with a constant number of U87 EGFR WT GBM cells and analyzed using flow cytometry. Titration resulted in the determination of the equilibrium affinity parameter, K_D , for the interaction between U87 EGFR WT cells and aptamer E07 (208.7 ± 45.57 nM). (E) Confocal imaging of E07-Cy5 aptamer in two cell lines, LN319 and U87 EGFR WT. Cells were seeded in coverslips and incubated with 100 nM of E07-Cy5 aptamer for 30 min (white). The incubation of antibody anti-EGFR was followed by incubation with a secondary antibody labeled with Alexa 568 (represented in red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μm .

On the basis of their specific cell-binding properties to their respective receptors, we considered the two aptamers, H02 and E07, suitable for integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR detection in human GBM tissues.

3.2. Apta- and Immunodetection of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Paraffin-Embedded and Frozen Glioblastoma Sections

We investigated whether the conditioning of the tumor sections had an influence on aptalabeling using 20 tumor sections from GBM patients. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections were deparaffinized, rehydrated, and subjected to an antigen unmasking protocol. Fresh-frozen sections were fixed in 4% paraformaldehyde. Aptafluorescence and, for comparison, immunofluorescence experiments were performed to detect integrin $\alpha 5\beta 1$ using the cyanine 5-conjugated H02 aptamer, named H02-Cy5, at 2 μM and anti-integrin $\alpha 5$ mAb 1928 followed by a secondary antibody coupled to Alexa 647. mAb 1928 was recently used to detect integrin $\alpha 5$ via the immunostaining of GBM-PDX and FFPE tissues [41,44]. Nuclei stained with DAPI allowed us to select several fields per tumor section with homogeneous tissue distribution for quantification. The integrin $\alpha 5\beta 1$ protein expression level was quantified in each sample using the mean fluorescence intensity (MFI) as recently described using confocal imaging for aptahistofluorescence (AHF) [44] and for immunohistofluorescence (IHF) [41]. IHF showed similar results for FFPE and frozen tissue sections. Similar results were also obtained via IHF and AHF for FFPE sections (Figure 3A). These results highlight a good reproducibility of IHF regardless of tumor section conditioning. They also emphasize the ability of aptamer H02 to detect integrin $\alpha 5\beta 1$ in human FFPE GBM sections. However, the AHF intensities of frozen sections were too low for the detection of integrin $\alpha 5\beta 1$ with aptamer H02 and to be compared with data on FFPE sections (Figure 3A). In the subsequent phases of this study, only FFPE sections were further studied.

3.3. Detection of Integrin $\alpha 5\beta 1$ Using Apta- and Immunohistofluorescence on FFPE GBM Sections Highlighted Inter-Tumoral Heterogeneity

A recent analysis of integrin $\alpha 5$ expression revealed its upregulation as a negative prognostic biomarker of GBM; the analysis was part of a study of the relationship between patient outcome and $\alpha 5$ protein expression levels in a cohort of 95 FFPE GBM sections using IHF [41]. To define the cut-off threshold allowing one to distinguish two groups characterized by low and high integrin $\alpha 5$ expression levels, the median of the MFI (MMFI) was used. In this present study, the same method was applied to compare AHF and IHF on 20 FFPE GBM sections, different from [41]. The distribution of data is shown in Figure 3B, and representative images of sub-populations with IHF and AHF are shown in Figure 3C. Two groups are clearly distinguished, both via IHF and AHF. Moreover, the values of the ratio of high versus low MMFI were similar for IHF (1.8) and AHF (1.6) and matched the value of 1.5 obtained by Etienne-Selloum et al. [41]. The GBM inter-tumoral heterogeneity illustrated by these results is just as likely to be shown with antibody 1928 via IHF or aptamer H02 via AHF. These results demonstrate that imaging and quantifying inter-patient heterogeneity based on integrin $\alpha 5\beta 1$ detection is similarly achievable in FFPE GBM sections, using either an antibody or an aptamer.

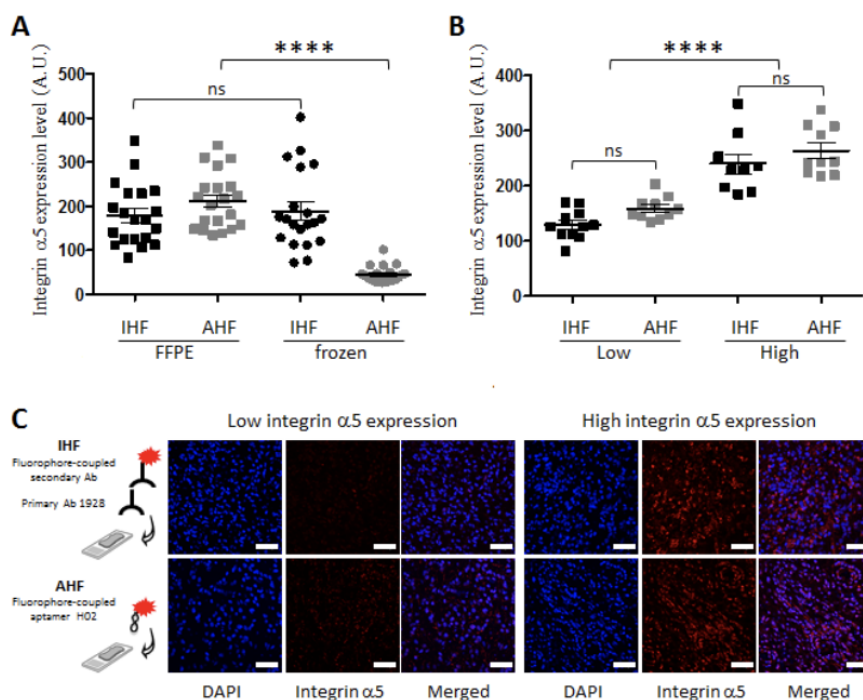


Figure 3. Quantification of integrin $\alpha 5$ expression level in 20 glioblastoma tissues using immunohistochemistry (IHF) and aptahistochemistry (AHF). (A,B) Distribution of cumulative data obtained via IHF (black) and AHF (gray) (A) of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE; squares) and frozen (circles) sections and (B) of FFPE sections only, considering samples showing high or low integrin $\alpha 5$ expression levels expressed as arbitrary units (A.U.). Statistical analyses were performed with Student's t test (**** $p < 0.0001$; ns, not significant). (C) Representative images of low and high integrin $\alpha 5$ expression staining via IHF and AHF are represented (magnification $\times 40$). The drawings on the left (not to scale) symbolize the detection in tumor sections using IHF (as an indirect method of detection, with Ab 1928 and a fluorophore-conjugated secondary antibody) and AHF (as a direct detection method, with fluorophore-coupled aptamer H02). Integrin $\alpha 5$ labeling is represented in red. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 50 μm .

3.4. Aptahistochemistry to Highlight Intra-Tumoral Heterogeneity

Because of it being a likely major cause of treatment resistance, we then assessed whether intra-tumoral GBM heterogeneity could be detected separately using H02 and E07 aptamers, both of them conjugated to Cyanine 5. The data obtained with aptamers were compared to immunological detection in FFPE tumor sections.

Equally scaled images taken with a Nanozoomer S60 slide scanner showed a very similar staining pattern via AHF with the H02-Cy5 aptamer and via IHF with mAb 1928, followed by a secondary antibody conjugated to Alexa 647. Figure 4A shows two sections of the same tumor slice. Two areas could be identified, with a small and a larger number of cells on the left and on the right of the images, respectively, showing invading cells in the lengthwise central part. A blood vessel was visible in the right median area. As with mAb 1928, aptamer H02 allowed us to distinguish tumoral cells at the tumoral core, invading cells at the invasion border, and the edges of a blood vessel. Integrin $\alpha 5\beta 1$ is indeed expressed by tumoral vessels besides its expression by GBM tumoral cells [46]. Light microscopy with H&E staining of the same area is shown in Figure S2. The comparable staining

patterns using IHF and AHF further supported the specificity of aptamer H02 labeling. Furthermore, the representative image in Figure 4B shows mosaic protein expression, with cells detected by aptamer H02 and with others that were not. These AHF experiments, therefore, enabled the detection of $\alpha 5^+$ and $\alpha 5^-$ cells within the same tumor sections, which, to our knowledge, had never been imaged.

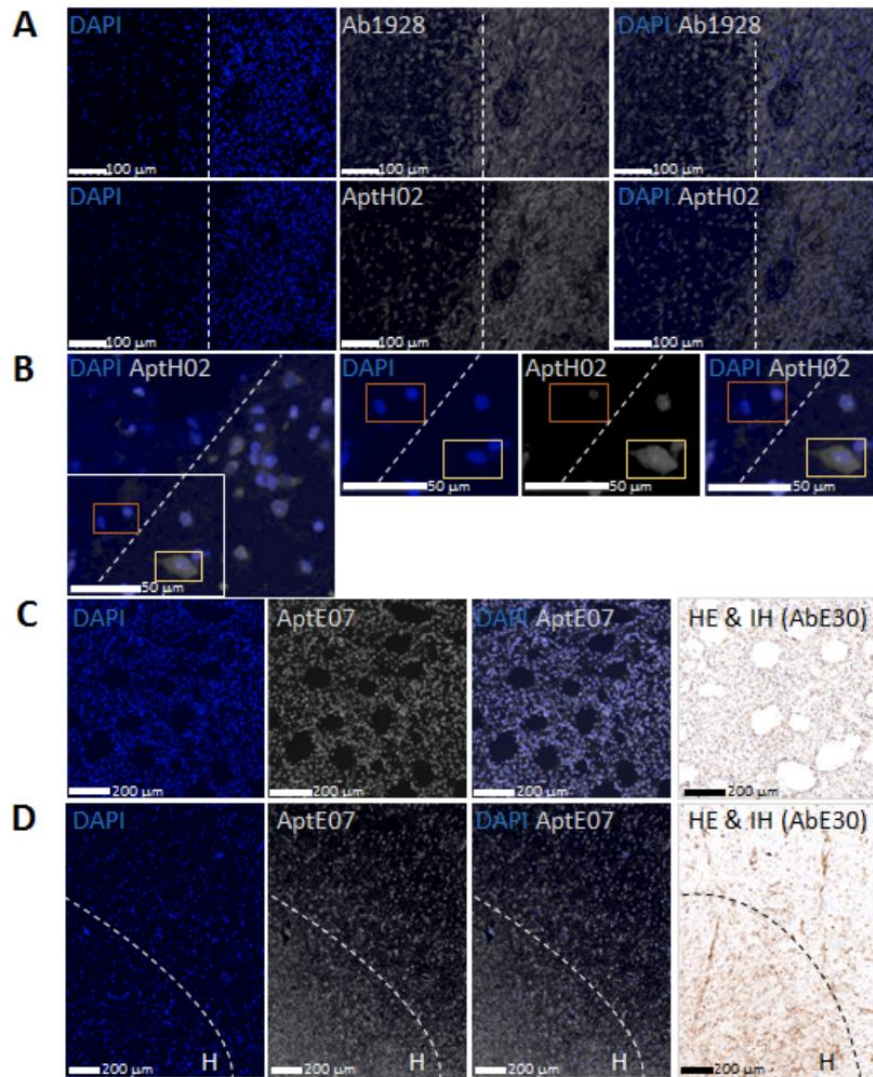


Figure 4. Imaging of intra-tumoral heterogeneity with aptamers targeting integrin $\alpha 5$ and EGFR. (A) Comparison of IHF and AHF for the detection of integrin $\alpha 5$. Equally scaled images taken with a Nanozoomer S60 slide scanner of two adjacent sections of the same tumor allowed us to perform a direct comparison between the fluorescence patterns of cells stained using IHF with antibody 1928 (Ab1928) and an Alexa647-conjugated secondary antibody and using AHF with Cyanine5-conjugated aptamer H02 (AptH02). Detection of integrin $\alpha 5$ is represented in white. DAPI staining is shown in blue. The dotted line delimits two areas with a small and a large number of cells on the left and right sides of the images, respectively. Another representation showing the number of cells in the two areas

is provided in Figure S3. Scale bar = 100 μm . The light microscopy result of an adjacent section is shown in Figure S2. **(B)** Detection of integrin $\alpha 5$ using AHF. This area further shows in more detail two zones delimited by a dotted line: no or very low integrin $\alpha 5$ on the left side and integrin- $\alpha 5$ positive cells on the right side. Magnified images are from the insert, either in single-channel mode or in merged-channel mode. Integrin $\alpha 5$ was detected with Cyanine5-conjugated aptamer H02 (AptH02), represented in white. DAPI staining is represented in blue. The orange and yellow squares show cells unlabeled and labeled with aptamer H02, respectively. Scale bar = 50 μm . **(C,D)** Comparison of AHF (first three images) and immunohistochemistry (image on the right side) for the detection of EGFR. The same zone of the same tumor, identified in non-adjacent sections via fluorescence and light microscopy images, shows similar profiles for EGFR aptamer and antibody staining. Detection was realized using AHF with Cyanine5-conjugated aptamer E07 (AptE07; in white), and nuclei were stained with DAPI (in blue) and using immunohistochemistry with antibody E30 (AbE30) and a horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody. Scale bar = 200 μm . Images in (D) show two areas with high (noted with H) and low cell density.

We also compared EGFR apta- and immunodetection with the E07-Cy5 aptamer or with antibody clone E30 and a horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody. The anti-EGFR antibody and methodology were those used in clinics for EGFR in vitro diagnostic. As far as we know, aptamer E07 has never been reported to detect EGFR in ex vivo experiments. Both the E07 aptamer and the E30 antibody are known to detect the extracellular domain of EGFR proteins [45,47,48]. Corresponding areas from the same tumor showed similar profiles for EGFR aptamer and antibody staining using fluorescence and light microscopy of the tumoral core (Figure 4C) and invasive border (Figure 4D).

The detection profiles of integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR were similar using aptamers and antibodies and revealed that the expression of these two proteins was not homogeneous within tumor sections. The two aptamers used in this study were as effective as specific antibodies in demonstrating the heterogeneous staining pattern within the tumor. We, thus, validated the use of aptamers in aptafluorescence for the detection of two molecular biomarkers and to highlight tumoral heterogeneity in FFPE GBM sections.

3.5. Multiplexing with Aptamers with Different Specificities

Since we demonstrated that aptamers H02 and E07 were separately able to detect integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR, we proposed their simultaneous use in the same tissue sections. In these multiplexing experiments, aptamer H02 was conjugated to cyanine 5 and aptamer E07 to Alexa 488 (Figure 5A). To avoid potential hybridization between them, aptamers H02 and E07 were heat-denatured at 95 $^{\circ}\text{C}$ and renatured separately; then, they were pooled shortly before their application to tissue sections.

Representative images of epileptic brain and GBM tissues are shown in Figure 5B,C, respectively, and the analyses of fluorescence intensities are quantified in Figure 5D,E. While E07 and H02 aptamers did not label non-tumoral tissues (Figure 5B,D), they were efficient in detecting cells expressing EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ within the tumor. Figure 5C,E are of particular interest. Two different patterns were observed. (i) In most areas, all cells were labeled with the two aptamers. This result highlighted, using bioimaging, the already known co-expression and potential crosstalk between EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ in GBM [32]. (ii) However, in some areas, such as the one shown with the gray arrow in Figure 5C,E, one could note a lower fluorescence intensity obtained with the E07 aptamer than in the side areas, which highlighted that dual apta-labeling was not identical among cells within the tumor. This indicated a differentiated expression of both receptors, i.e., equal levels of integrin $\alpha 5\beta 1$ but lower levels for EGFR in this zone compared with adjacent areas.

Hence, these results showed not only areas of co-expression of EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ but also areas where one of these two biomarkers was underexpressed compared with the other, and this was made possible in patient tumor sections using multiplex aptamer detection.

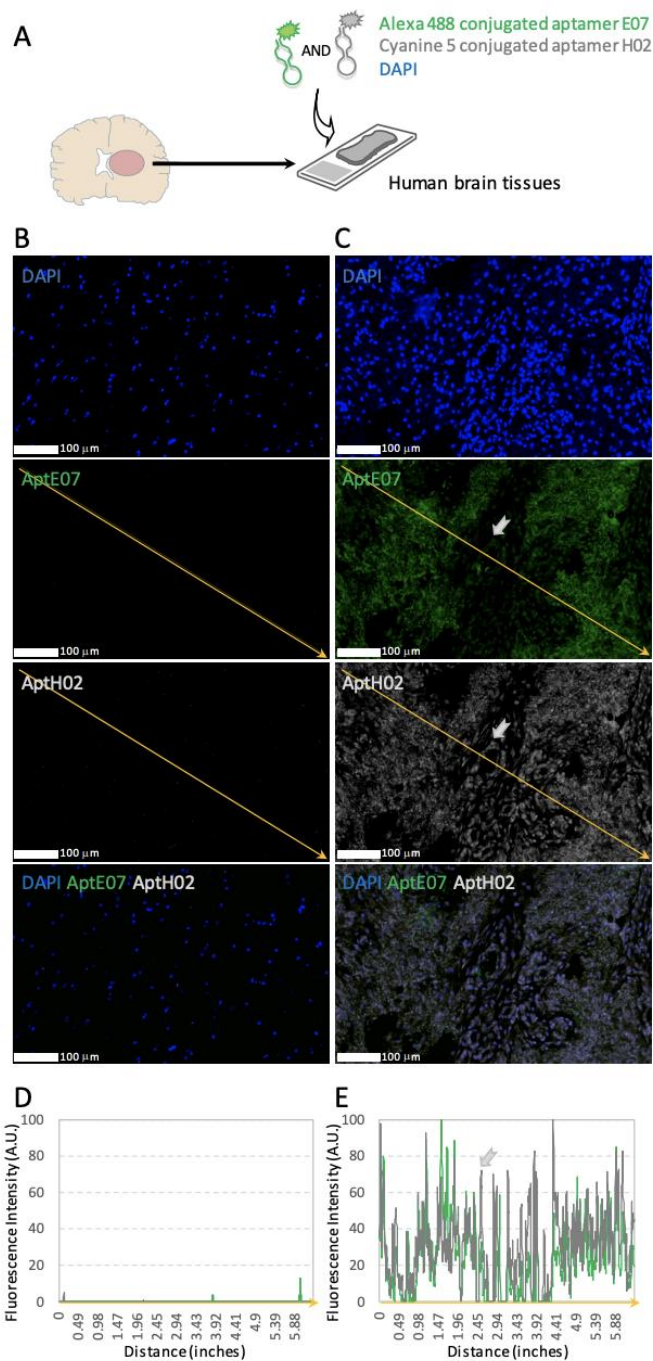


Figure 5. Dual labeling with aptamers targeting integrin $\alpha 5$ and EGFR. (A) Schematic depicting detection via AHF simultaneously using two aptamers, aptamers E07 and H02, conjugated to two different fluorophores (not to scale). In (B,C), we show human epileptic brain and GBM tissues, respectively. DAPI

staining is shown in blue. Detection of EGFR with Alexa 488-conjugated aptamer E07 is represented in green. Detection of integrin $\alpha 5$ with Cyanine5-conjugated aptamer H02 is represented in gray. Images in (B,C) were captured using the same settings to allow us to perform a direct comparison of the staining intensity with a Nanozoomer S60 slide scanner. Scale bar = 100 μm . (D,E) Histograms of normalized fluorescence intensities corresponding to detection with aptamers E07 (in green) and H02 (in gray). Histograms in (D,E) correspond to the fluorescence intensities of B and C, respectively, quantified along the orange diagonal arrow. Histograms show only sparse fluorescence in epileptic tissue (D); they show, in GBM tissue (E), that areas were not uniformly labeled with both aptamers. For example, the gray arrow in (E) shows an area strongly and faintly labeled with aptamers H02 and E07, respectively. This area corresponds to the cells pointed at by the gray arrow in (C).

4. Discussion

Tumoral heterogeneity, which encompasses both inter-tumoral heterogeneity (differences observed at the population level) and intra-tumoral heterogeneity (differences among cells within individual tumors), affects treatment response. It is the key to understand treatment failure, notably in GBM, where multiple distinct populations of tumoral cells confer survival advantage as well as resistance to therapies and for which drug treatment remains largely inefficient. Technical advances have helped to reveal GBM heterogeneity at the DNA and RNA levels. However, as gene expression data do not often highly correlate with variations in protein expression, reliable and easily implementable methods are needed to identify molecular targets at the protein level [49]. A large amount of information is missing in histology due to methodological and tool limitations. Though essential for a better understanding of pathological processes and for the development of personalized therapeutic strategies, the simultaneous detection of multiple biomarkers is not systematically studied [50]. The detection of multiple proteins in IHC, the standard method for the *in situ* detection of FFPE tissue, is performed on consecutive sections. The localization of different biomarkers is particularly difficult when sections are not successive, and the co-localization of markers cannot be assessed at the level of the single cell [3]. Moreover, antibodies, used for the last 40 years, have been proven to be at times unreliable, mainly due to reagent variations [9]. High-quality, reliable molecules are essential for detection, and a transition towards affinity molecules defined by their sequence has recently been proposed [51,52]. For histofluorescence multiplexing approaches, aptamers appear to be particularly suitable. Due to their smaller size compared with antibodies, they can better penetrate in tissues [12]. Aptamers are chemically synthesized, which means that they do not vary from batch to batch. Fluorophores can easily be directly conjugated to aptamers, and these constructs are detected in multiplexing fluorescent experiments when aptamers with different specificities are conjugated to different fluorophores. The AHF technique is fast and easy to implement, and our results highlight its use to detect GBM heterogeneity in FFPE tissue samples. However, a number of considerations must be taken into account to avoid the misinterpretation of the histological data.

A very recent comparative analysis of cell-surface-targeting aptamers indicated that the characterization of many of these molecules was largely confounded by a lack of uniform assessment. Kelly et al. [53] compared the ability of 15 different aptamers from the literature and surveyed them particularly for their *in vitro* cell-binding capacities. The targets included PSMA, EGFR, hTfR, HER2, AXL, EpCAM, and PTK7. Only 5 out of the 15 aptamers showed receptor-specific activity, and among these five aptamers was aptamer E07, which supported the selection of this aptamer in our experiments. As in this study, we considered the use of well-documented aptamers to be important, particularly those studied for their binding to identified biomarkers on cells, to have a better chance to find them to be suitable for histological detection. Aptamers are identified through an *in vitro* evolution process called SELEX, which stands for 'Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment' [54,55]. It starts with an initial RNA or ssDNA library containing 10^{14} – 10^{15} oligonucleotides and involves iterative cycles of selection towards targets, including small molecules, proteins, peptides, toxins, whole cells, and tissues. Different SELEX

processes have been developed for the selection of aptamers targeting tumor biomarkers, with the two main ones being protein- and cell-SELEX [56]. Another selection method allows one to identify aptamers on tissues, called tissue-SELEX. This method is the best suited for further applications of selected aptamers in histology. However, the a posteriori identification of molecular targets has rarely been performed [18,57] and is difficult to achieve. In our study, we, therefore, chose aptamers already well characterized in the literature for their cell-binding properties, namely, aptamers E07 and H02. Moreover, upstream of histofluorescence, we supplemented published data with cytofluorescence experiments using flow cytometry and confocal imaging. We used appropriate receptor-expressing GBM cells and included negative cells for receptor expression (Figure 2). The affinities of aptamers for their targets were determined under conditions that were as close as possible to 'natural' conditions (i.e., affinities for cells). We showed that K_D of aptamer H02 differed 3.8-fold in the interactions aptamer–recombinant integrin $\alpha 5\beta 1$ and aptamer–cell [44]. This difference was much higher for aptamer E07, as a very high binding affinity (2.4 ± 0.2 nM) was determined for the interaction between [α -32P]-ATP-labeled aptamer E07 and the recombinant human EGFR protein using filter binding assays [45], while much lower affinities were determined for the interaction between aptamer E07 and the U87 EGFR WT cell line (Table 1; 208.7 ± 45.6 nM) or EGFR-expressing pancreatic cells (26–67 nM [48]). These differences may have certainly been due to the different techniques used, but they may have also been due to the differences in the conformations of soluble recombinant proteins and cell-surface proteins, to the functional bioavailability of receptors in a cellular context, and thus to the different SELEX process used for aptamer identification, i.e., hybrid-SELEX, composed of cell- and protein-SELEXs, and protein-SELEX, for the identification of aptamers H02 [44] and E07 [45], respectively. Nevertheless, the cellular affinities determined in our study were of the same order of magnitude as those reported in the literature for the interaction of most aptamers targeting cell-surface receptors [56].

Then, since aptamers, similarly to antibodies, might recognize epitopes on cells and not on FFPE tissues, immunolabeling was conducted alongside aptahistofluorescence with antibodies and aptamers with the same specificities (Figures 3 and 4). An indirect method was used for immunolabeling, which consisted of the successive incubation of anti- $\alpha 5$ or anti-EGFR antibodies followed by secondary antibodies. AHF is a direct method, as aptamers are directly conjugated to fluorophores; it is, therefore, faster than IHC. The binding intensities determined using AHF correlated with the localization of EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ detected using immunolabeling. Moreover, the labeling of GBM tissues with aptamer H02 targeting integrin $\alpha 5\beta 1$ confirmed the results previously obtained with anti-integrin $\alpha 5\beta 1$ antibody 1928 [41], highlighting inter-patient heterogeneity. In our study, we did not observe the superior staining of a single aptamer compared with primary antibody staining, as recently described by Gomes de Castro et al. using super-resolution microscopy [58], but rather similar staining for cell receptors was detected with aptamers in comparison with antibodies using confocal imaging and a digital slide scanner. Within the same GBM section, by means of AHF using H02, we observed intra-tumoral heterogeneity, showing that different regions of the same tumor contained cells with different protein expression levels. Different areas were observed: (i) some very intensely labeled in the tumoral core and in perivascular areas and (ii) others with less labeling in the tumor periphery, where invading cells could be detected, (iii) but also areas with cells that did not express integrin $\alpha 5\beta 1$.

Last but not least, the issue of autofluorescence must be considered before performing AHF and/or IHF experiments on tissues, as it complicates the data analyses. The natural fluorescence of red blood cells occurs at several wavelengths, so the distinction between test fluorescence and endogenous fluorescence is difficult [59]. Areas and at times even whole tumor sections that were highly necrotic could not be analyzed in AHF and IHF with fluorescent reporters that absorbed light at wavelengths below 600 nm. Practically, classical controls were performed; these consisted of the analysis of slices stained with DAPI alone or without the addition of primary antibodies for immunolabeling experiments and

imaged with three filters. In addition, for EGFR and integrin $\alpha 5\beta 1$ detection, we performed experiments with secondary antibodies and aptamers, both conjugated to Cyanine 5 or Alexa 647, as autofluorescence was absent, with far-red-emitting dyes (optical windows above 600 nm, as recommended [59]). Thus the selectiveness of the aptamers could be analyzed and compared to that of the antibodies in adjacent slices. For multiplexing experiments, to simultaneously detect integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR in the same slice, we used aptamer H02 conjugated to Cyanine 5 and aptamer E07 conjugated to Alexa 488, respectively. Hence, the use of the E07 aptamer conjugated to cyanine 5 or Alexa 488 allowed the data to be compared, thus invalidating areas with autofluorescence.

A few studies describe aptamers for multiplexing experiments. For example, the seminal paper by Dr. Zu and his team showed the combination of an aptamer targeting CD4 and antibodies to phenotype cells from lymph nodes, bone marrow, and pleural fluid [60]. However, to our knowledge, only one other multiplexing study simultaneously combining two or more aptamers on pathological human solid tissue has been carried out so far. Zama and collaborators identified three DNA aptamers to post-operative lung carcinoma tissues [61], described their use in AHC for tumoral tissue characterization, and proposed that a pair of aptamers able to bind to tumor stroma be used for tumor intraoperative visualization [18]. In our study, having ensured that H02 and E07 aptamers could detect integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR, respectively, on cells and tissues, having compared their tissue detection efficiency to that of antibodies specific to integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR, and having checked their tissue binding profile when coupled to different fluorophores, we finally evaluated them in multiplexing experiments. The multi-detection experiments consisted in simultaneously labeling the two biomarkers, integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR, with the two aptamers, H02 and E07, covalently conjugated to two different fluorophores emitting at different and non-overlapping wavelengths (Alexa 488 for E07 and Cyanine 5 for H02). In practice, the aptamers were heated and then cooled separately to avoid inter-aptamer pairing; then, they were mixed and deposited on the GBM sections. Our results on human GBM tumoral tissues showed two different profiles: homogeneous or heterogeneous staining (Figure 5). The labeling of cells with both H02 and E07 aptamers suggested that they expressed both integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR. Other tumor areas showed a less uniform pattern, with one of the two biomarkers being underexpressed.

Our data indicated that AHF was as sensitive as immunodetection and could be used to simultaneously detect biomarkers in the same tumor section and to reveal the spatial proximity between them. This study showed for the first time the application of fluorescent aptamers in multiplexing imaging experiments to label two biomarkers in human GBM tissues. These results confirmed functional results establishing a cross-talk between integrins and EGFR in several tumors, including gliomas [32,62], and raised the possibility that for EGFR- and integrin $\alpha 5\beta 1$ -positive patients, combined therapies based on the dual inhibition of both receptors might be of interest.

5. Conclusions

Though the road to using aptamers for the measurement of biomarker expression in tumors is still long, as only a few studies on aptamers have been conducted, our results confirm that aptamers could be alternative molecular probes for histology. Their unique properties would offer advantages in clinics over antibodies, such as shorter reaction time, identical or higher labeling properties, no cross-immunoreactivity issues, and far from being the least, the possibility of easy multiplex analyses, without stripping, of the same section, thus also reducing the need for valuable precious materials such as those from rare donors. We demonstrated the application value of AHF in the detection of integrin $\alpha 5\beta 1$ and EGFR, two biomarkers with wide-ranging cooperation in GBM. We believe that aptamers might have a role to play in multiplexing experiments either using multiple aptamers or through combinations of aptamers/antibodies for the detection of different biomarkers, as alternatives to classical IHC for tumor diagnosis, representing a step towards the multiparameter analysis of whole section tissues.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14101980/s1>, Table S1: Information on aptamers used in this study, Figure S1: Detection of EGFR using IHF and AHF in MCF7 and MDA-MB-231 cells, Figure S2: Light microscopy with H&E dye of a section adjacent to that shown in Figure 4, Figure S3: Surface plot showing the intensity profile of cells represented in Figure 4A.

Author Contributions: Conceptualization, L.C.; methodology, E.C.D.S., S.F., L.K., M.L., H.J., B.A., R.V., B.L., N.E.-S., M.D. and L.C.; formal analysis, E.C.D.S., S.F., B.L., M.-P.C., M.L. and L.C.; investigation, E.C.D.S., S.F. and L.C.; writing—original draft preparation, E.C.D.S. and L.C.; writing—review, L.C. and E.C.D.S.; project administration, L.C.; funding acquisition, L.C. All authors have contributed to writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research study was supported by Ligue Contre le Cancer (CCIG-GE S19R417C). Elisabete Cruz Da Silva was a doctoral fellow at the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and Lorraine Klein was supported by ITI InnoVec (IdEx (ANR-10-IDEX-0002), SFRI (ANR-20-SFRI-0012)).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with CPP 09/39-N°AC-2008-438/N°DC-2009-1016.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study under declaration number DC-2016-2677t.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be provided by the corresponding author upon request.

Acknowledgments: We thank Florence Guénard from Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. We also thank Dominique Massotte (Institute of Cellular and Integrative Neuroscience, University of Strasbourg) for support during image acquisition with NanoZoomer S60. We are grateful to Anne Chrétien for her help on an illustration in Figure 1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Parra, E.R.; Francisco-Cruz, A.; Wistuba, I.I. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers* **2019**, *11*, 247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Francisco-Cruz, A.; Parra, E.R.; Tetzlaff, M.T.; Wistuba, I.I. Multiplex Immunofluorescence Assays. In *Biomarkers for Immunotherapy of Cancer. Methods in Molecular Biology*; Humana: New York, NY, USA, 2020; Volume 2055, pp. 467–495. [\[CrossRef\]](#)
3. Blom, S.; Paavola, L.; Bychkov, D.; Turkki, R.; Mäki-Teeri, P.; Hemmes, A.; Välimäki, K.; Lundin, J.; Kallioniemi, O.; Pellinen, T. Systems Pathology by Multiplexed Immunohistochemistry and Whole-Slide Digital Image Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Lee, C.-W.; Ren, Y.J.; Marella, M.; Wang, M.; Hartke, J.; Couto, S.S. Multiplex Immunofluorescence Staining and Image Analysis Assay for Diffuse Large B Cell Lymphoma. *J. Immunol. Methods* **2020**, *478*, 112714. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Van Gijlswijk, R.P.M.; Zijlmans, H.J.M.A.A.; Wiegant, J.; Bobrow, M.N.; Erickson, T.J.; Adler, K.E.; Tanke, H.J.; Raap, A.K. Fluorochrome-Labeled Tyramides: Use in Immunocytochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, *45*, 375–382. [\[CrossRef\]](#)
6. Bolognesi, M.M.; Manzoni, M.; Scalia, C.R.; Zannella, S.; Bosisio, F.M.; Faretta, M.; Cattoretti, G. Multiplex Staining by Sequential Immunostaining and Antibody Removal on Routine Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem.* **2017**, *65*, 431–444. [\[CrossRef\]](#)
7. Zhou, G.; Wilson, G.; Hebbard, L.; Duan, W.; Liddle, C.; George, J.; Qiao, L. Aptamers: A Promising Chemical Antibody for Cancer Therapy. *Oncotarget* **2016**, *7*, 13446–13463. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202. [\[CrossRef\]](#)
9. Bauer, M.; Strom, M.; Hammond, D.S.; Shigdar, S. Anything You Can Do, I Can Do Better: Can Aptamers Replace Antibodies in Clinical Diagnostic Applications? *Molecules* **2019**, *24*, 4377. [\[CrossRef\]](#)
10. Roy, D.; Pascher, A.; Juratli, M.A.; Sporn, J.C. The Potential of Aptamer-Mediated Liquid Biopsy for Early Detection of Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5601. [\[CrossRef\]](#)
11. Zamay, A.S.; Zamay, G.S.; Kolovskaya, O.S.; Zamay, T.N.; Berezovski, M.V. Aptamer-Based Methods for Detection of Circulating Tumor Cells and Their Potential for Personalized Diagnostics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *994*, 67–81. [\[CrossRef\]](#)
12. Xiang, D.; Zheng, C.; Zhou, S.-F.; Qiao, S.; Tran, P.H.-L.; Pu, C.; Li, Y.; Kong, L.; Kouzani, A.Z.; Lin, J.; et al. Superior Performance of Aptamer in Tumor Penetration over Antibody: Implication of Aptamer-Based Theranostics in Solid Tumors. *Theranostics* **2015**, *5*, 1083–1097. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Bauer, M.; Macdonald, J.; Henri, J.; Duan, W.; Shigdar, S. The Application of Aptamers for Immunohistochemistry. *Nucleic Acid Ther.* **2016**, *26*, 120–126. [[CrossRef](#)]
14. Zeng, Z.; Zhang, P.; Zhao, N.; Sheehan, A.M.; Tung, C.-H.; Chang, C.-C.; Zu, Y. Using Oligonucleotide Aptamer Probes for Immunostaining of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Mod. Pathol.* **2010**, *23*, 1553–1558. [[CrossRef](#)]
15. Malicki, S.; Pucelik, B.; Żyła, E.; Benedyk-Machaczka, M.; Gałań, W.; Golda, A.; Sochaj-Gregorczyk, A.; Kamińska, M.; Encarnaçao, J.C.; Chruścicka, B.; et al. Imaging of Clear Cell Renal Carcinoma with Immune Checkpoint Targeting Aptamer-Based Probe. *Pharm. Basel Switz.* **2022**, *15*, 697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bukari, B.A.; Citartan, M.; Ch'ng, E.S.; Bilibana, M.P.; Rozhdstvensky, T.; Tang, T.-H. Aptahistochemistry in Diagnostic Pathology: Technical Scrutiny and Feasibility. *Histochem. Cell Biol.* **2017**, *147*, 545–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sun, H.; Tan, W.; Zu, Y. Aptamers: Versatile Molecular Recognition Probes for Cancer Detection. *Analyst* **2016**, *141*, 403–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zamay, G.S.; Ivanchenko, T.I.; Zamay, T.N.; Grigorieva, V.L.; Glazyrin, Y.E.; Kolovskaya, O.S.; Garanzha, I.V.; Barinov, A.A.; Krat, A.V.; Mironov, G.G.; et al. DNA Aptamers for the Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *6*, 150–162. [[CrossRef](#)]
19. Poon, M.T.C.; Sudlow, C.L.M.; Figueroa, J.D.; Brennan, P.M. Longer-Term (≥ 2 Years) Survival in Patients with Glioblastoma in Population-Based Studies Pre- and Post-2005: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11622. [[CrossRef](#)]
20. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)]
21. Cruz Da Silva, E.; Mercier, M.-C.; Etienne-Selloum, N.; Dontenwill, M.; Choulier, L. A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers* **2021**, *13*, 1795. [[CrossRef](#)]
22. Kros, J.M. Grading of Gliomas: The Road from Eminence to Evidence. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
24. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncology* **2021**, *23*, 1231–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu. Rev. Pathol.* **2014**, *9*, 1–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jacobi, N.; Seeboeck, R.; Hofmann, E.; Eger, A. ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology. *Cancers* **2017**, *9*, 33. [[CrossRef](#)]
27. Olayioye, M.A.; Neve, R.M.; Lane, H.A.; Hynes, N.E. The ErbB Signaling Network: Receptor Heterodimerization in Development and Cancer. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3159–3167. [[CrossRef](#)]
28. Frederick, L.; Wang, X.-Y.; Eley, G.; James, C.D. Diversity and Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Human Glioblastomas. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1383–1387.
29. Eskilsson, E.; Røslund, G.V.; Solecki, G.; Wang, Q.; Harter, P.N.; Graziani, G.; Verhaak, R.G.W.; Winkler, F.; Bjerkvig, R.; Miletic, H. EGFR Heterogeneity and Implications for Therapeutic Intervention in Glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2018**, *20*, 743–752. [[CrossRef](#)]
30. Lowell, C.A.; Mayadas, T.N. Overview-Studying Integrins in Vivo. In *Integrin and Cell Adhesion Molecules. Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; Volume 757, pp. 369–397. [[CrossRef](#)]
31. Blandin, A.-F.; Renner, G.; Lehmann, M.; Lelong-Rebel, I.; Martin, S.; Dontenwill, M. B1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 279. [[CrossRef](#)]
32. Cruz da Silva, E.; Dontenwill, M.; Choulier, L.; Lehmann, M. Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 692. [[CrossRef](#)]
33. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Desgrosellier, J.S.; Cheresh, D.A. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Harburger, D.S.; Calderwood, D.A. Integrin Signalling at a Glance. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 159–163. [[CrossRef](#)]
36. Paolillo, M.; Serra, M.; Schinelli, S. Integrins in Glioblastoma: Still an Attractive Target? *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, 55–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gingras, M.C.; Roussel, E.; Bruner, J.M.; Branch, C.D.; Moser, R.P. Comparison of Cell Adhesion Molecule Expression between Glioblastoma Multiforme and Autologous Normal Brain Tissue. *J. Neuroimmunol.* **1995**, *57*, 143–153. [[CrossRef](#)]
38. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; et al. Integrin A5β1 Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the P53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3463–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Freije, W.A.; Castro-Vargas, F.E.; Fang, Z.; Horvath, S.; Cloughesy, T.; Liau, L.M.; Mischel, P.S.; Nelson, S.F. Gene Expression Profiling of Gliomas Strongly Predicts Survival. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6503–6510. [[CrossRef](#)]

40. Phillips, H.S.; Kharbanda, S.; Chen, R.; Forrest, W.F.; Soriano, R.H.; Wu, T.D.; Misra, A.; Nigro, J.M.; Colman, H.; Soroceanu, L.; et al. Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 157–173. [[CrossRef](#)]
41. Etienne-Selloum, N.; Prades, J.; Bello-Roufai, D.; Boone, M.; Sevestre, H.; Trudel, S.; Caillet, P.; Coutte, A.; Desenclos, C.; Constans, J.-M.; et al. Expression Analysis of A5 Integrin Subunit Reveals Its Upregulation as a Negative Prognostic Biomarker for Glioblastoma. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 882. [[CrossRef](#)]
42. Wen, P.Y.; Weller, M.; Lee, E.Q.; Alexander, B.M.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Barthel, F.P.; Batchelor, T.T.; Bindra, R.S.; Chang, S.M.; Chiocca, E.A.; et al. Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions. *Neuro-Oncology* **2020**, *22*, 1073–1113. [[CrossRef](#)]
43. Bonavia, R.; Inda, M.M.; Vandenberg, S.; Cheng, S.-Y.; Nagane, M.; Hadwiger, P.; Tan, P.; Sah, D.W.Y.; Cavenee, W.K.; Furnari, F.B. EGFRvIII Promotes Glioma Angiogenesis and Growth through the NF-KB, Interleukin-8 Pathway. *Oncogene* **2012**, *31*, 4054–4066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fechter, P.; Cruz Da Silva, E.; Mercier, M.-C.; Noulet, F.; Etienne-Seloum, N.; Guenot, D.; Lehmann, M.; Vauchelles, R.; Martin, S.; Lelong-Rebel, I.; et al. RNA Aptamers Targeting Integrin A5β1 as Probes for Cyto- and Histofluorescence in Glioblastoma. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *17*, 63–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Li, N.; Nguyen, H.H.; Byrom, M.; Ellington, A.D. Inhibition of Cell Proliferation by an Anti-EGFR Aptamer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Schaffner, F.; Ray, A.M.; Dontenwill, M. Integrin A5β1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* **2013**, *5*, 27–47. [[CrossRef](#)]
47. Torp, S.H.; Bringedal, K.; Dalen, A. Immunohistochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptor in Human High-Grade Astrocytomas—a Comparison between Frozen- and Paraffin Sections. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2005**, *24*, 89–92.
48. Kratschmer, C.; Levy, M. Targeted Delivery of Auristatin-Modified Toxins to Pancreatic Cancer Using Aptamers. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2018**, *10*, 227–236. [[CrossRef](#)]
49. Becker, A.P.; Sells, B.E.; Haque, S.J.; Chakravarti, A. Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Cancers* **2021**, *13*, 761. [[CrossRef](#)]
50. Tan, W.C.C.; Nerurkar, S.N.; Cai, H.Y.; Ng, H.H.M.; Wu, D.; Wee, Y.T.F.; Lim, J.C.T.; Yeong, J.; Lim, T.K.H. Overview of Multiplex Immunohistochemistry/Immunofluorescence Techniques in the Era of Cancer Immunotherapy. *Cancer Commun. Lond. Engl.* **2020**, *40*, 135–153. [[CrossRef](#)]
51. Bradbury, A.; Plückthun, A. Reproducibility: Standardize Antibodies Used in Research. *Nature* **2015**, *518*, 27–29. [[CrossRef](#)]
52. Bradbury, A.R.M.; Plückthun, A. Getting to Reproducible Antibodies: The Rationale for Sequenced Recombinant Characterized Reagents. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **2015**, *28*, 303–305. [[CrossRef](#)]
53. Kelly, L.; Maier, K.E.; Yan, A.; Levy, M. A Comparative Analysis of Cell Surface Targeting Aptamers. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mercier, M.-C.; Dontenwill, M.; Choulier, L. Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers. *Cancers* **2017**, *9*, 69. [[CrossRef](#)]
57. Li, S.; Xu, H.; Ding, H.; Huang, Y.; Cao, X.; Yang, G.; Li, J.; Xie, Z.; Meng, Y.; Li, X.; et al. Identification of an Aptamer Targeting HnRNP A1 by Tissue Slide-Based SELEX. *J. Pathol.* **2009**, *218*, 327–336. [[CrossRef](#)]
58. Gomes de Castro, M.A.; Höbartner, C.; Opazo, F. Aptamers Provide Superior Stainings of Cellular Receptors Studied under Super-Resolution Microscopy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173050. [[CrossRef](#)]
59. Whittington, N.C.; Wray, S. Suppression of Red Blood Cell Autofluorescence for Immunocytochemistry on Fixed Embryonic Mouse Tissue. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2017**, *81*, 2–28. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, P.; Zhao, N.; Zeng, Z.; Chang, C.-C.; Zu, Y. Combination of an Aptamer Probe to CD4 and Antibodies for Multicolored Cell Phenotyping. *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, *134*, 586–593. [[CrossRef](#)]
61. Zamay, G.S.; Kolovskaya, O.S.; Zamay, T.N.; Glazyrin, Y.E.; Krat, A.V.; Zubkova, O.; Spivak, E.; Wehbe, M.; Gargaun, A.; Muharemagic, D.; et al. Aptamers Selected to Postoperative Lung Adenocarcinoma Detect Circulating Tumor Cells in Human Blood. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1486–1496. [[CrossRef](#)]
62. Blandin, A.-F.; Cruz Da Silva, E.; Mercier, M.-C.; Glushonkov, O.; Didier, P.; Dedieu, S.; Schneider, C.; Devy, J.; Etienne-Selloum, N.; Dontenwill, M.; et al. Gefitinib Induces EGFR and A5β1 Integrin Co-Endocytosis in Glioblastoma Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 2949–2962. [[CrossRef](#)]

Basma Abdallah

Caractérisation & vectorisation de nouvelles molécules anti-infectieuses issues de la pharmacopée médiévale arabe.

Résumé

Depuis l'antiquité, l'homme a su exploiter la diversité de son environnement pour ses besoins quotidiens (se nourrir, soulager ses souffrances physiques...) se basant sur des ingrédients naturels. Cette thèse porte plus particulièrement sur l'étude et la valorisation de pharmacopées anciennes à travers des outils technologiques modernes. Dans un premier temps, des arguments en faveur d'une rationalité dans leur élaboration ont été rassemblés et analysés. Deux remèdes issus de la pharmacopée médiévale arabe et prescrits contre des infections cutanées ont été étudiés. Le premier, simple et à base de métaux, a montré une synergie d'action à la fois antibactérienne contre les bactéries d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et anti-inflammatoire. Cette synergie est probablement l'une des clés de l'efficacité de ces thérapies anciennes. Le deuxième, encore en cours d'étude, nous a permis de lancer des études sur le pouvoir chélateur de fer de ces remèdes : certains ingrédients peuvent en effet priver les bactéries de fer, élément essentiel à leur survie. Enfin, dans une perspective de stratégie de vectorisation, nous avons étudié par microscopie confocale, les propriétés de liaison d'aptamères aux bactéries PAO1, *E. coli* et *S. aureus*. Les aptamères sont des oligonucléotides ADN ou ARN simple brin, considérés comme alternatifs aux anticorps. Nous avons identifié deux aptamères (issus de la littérature) liant respectivement les bactéries PAO1 et *E. coli*. L'un de ces aptamères permet de discriminer les PAO1 de *S. aureus*. Une perspective directe et concrète de mon projet sera de vectoriser les molécules actives issues des remèdes sélectionnés et étudiés dans cette thèse, après leur fractionnement, grâce à des aptamères.

Mots clefs : Antibiorésistance, aptamères, bactéries pathogènes, pharmacopée médiévale arabe.

Abstract

Throughout history, humans have always known how to exploit the diversity of the environment for daily needs (to feed themselves, to relieve their suffering...), based on therapeutic remedies. This thesis specifically focuses on the study and valorization of ancient pharmacopoeias using modern technological tools. Firstly, arguments in favor of a rationale in their formulation have been gathered and analyzed. Two remedies derived from medieval Arab pharmacopoeia and prescribed for skin infections were studied. The first one, simple and metal-based, demonstrated a dual action as antibacterial against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* bacteria and as anti-inflammatory. This synergy is likely one of the keys to the effectiveness of these ancient therapies. The second remedy, still under study, enabled us to initiate research on the chelating power of iron of these remedies: certain ingredients can indeed deprive bacteria of iron, an essential element for their survival. Finally, in the context of a vectorization strategy, we investigated, using confocal microscopy, the binding properties of aptamers to PAO1, *E. coli*, and *S. aureus* bacteria. Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotides, considered as alternatives to antibodies. We identified two aptamers (from the literature) that respectively bind to PAO1 and *E. coli* bacteria. One of these aptamers allows to discriminate between PAO1 and *S. aureus*. A concrete perspective of my project will be to vectorize the active molecules derived from the selected and studied remedies in this thesis, after their fractionation, using aptamers.

Keywords: Antibiotic resistance, aptamers, medieval Arab pharmacopoeia, pathogen bacteria.