

Mesdames et Messieurs les Membres de la CPFR de la Faculté des Sciences,

Un premier point faible identifié par le jury concerne la justification du choix des cibles LipA et EstA. Bien que ces enzymes soient reconnues comme des facteurs majeurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*, le jury a estimé que leur priorisation n'avait pas été suffisamment explicitée. Cette remarque est pertinente et mérite d'être approfondie. *Pseudomonas aeruginosa* possède plusieurs dizaines de facteurs de virulence majeurs dont une demi-douzaine sont sécrétés ou exposés à la surface et donc accessibles aux VHHs. Les facteurs de virulence sécrétés ou exposés à la surface comprennent: l'exotoxine A (ExoA), les protéases LasA et LasB, la phospholipase C (PlcH) les rhamnolipides, la pyoverdine (Pvd) et les enzymes lipolytiques LipA et EstA. EstA intervient dans la production de rhamnolipides (impliqué dans la mobilité bactérienne) ainsi que dans la formation et la maturation des biofilms (augmentant la protection de la bactérie face au milieu externe) et dans la lyse des cellules hôtes. LipA intervient dans la production d'une série de toxines (ExoA, ExoS et ExoT), de la protéase PrpL et de la pyoverdine. Ainsi, en ciblant LipA et EstA, plusieurs facteurs de virulence extracellulaires majeurs sont ciblés en plus de la formation des biofilms qui constitue un problème majeur dans l'efficacité des antibiotiques. Par ailleurs, le laboratoire NEPTUNS a récemment identifié un VHH inhibant LasB. **Aussi, comme souligné par le jury notre stratégie multi-cibles se situe à l'avant-garde des approches alternatives aux antibiotiques conventionnels, répondant au besoin urgent de nouvelles interventions contre les agents pathogènes multirésistants tout en minimisant la pression de sélection conduisant à l'émergence de résistances.** Dans le cadre de l'anti-virulence, le but est de « désarmer » la bactérie afin de diminuer l'impact de l'infection et permettre soit au système immunitaire de l'hôte soit à un antibiotique d'éliminer la bactérie.

Par ailleurs, le jury a identifié un risque lié au temps potentiellement nécessaire pour confirmer la fonctionnalité des VHHs dirigés contre LipA et EstA. Ce délai pourrait limiter les possibilités de redirection rapide du projet si les résultats initiaux s'avéraient insuffisants. Lorsque LipA est mutée, une baisse significative de la production de pyoverdine est notamment observée. Lorsque EstA est mutée, la bactérie perd sa mobilité ainsi que la capacité de formation du biofilm. L'inhibition de ces deux enzymes en plus de la protéase LasB, devrait donc significativement affaiblir la virulence de la bactérie. Pour donner suite à cette remarque du jury, je propose d'ajouter un extrait concentré de surnageant de culture de *P. aeruginosa* ainsi que des extraits membranaires au cocktails d'antigènes lors des immunisations. Si l'inhibition de LipA ou/et EstA s'avéraient inefficace, les bibliothèques immunes construites pourraient alors être utilisées pour sélectionner des VHHs inhibant d'autres facteurs de virulence. Ceci permettra de rapidement de réorienter le projet vers d'autres cibles si nécessaire. De plus, afin de déterminer le plus rapidement possible si les VHHs inhibiteurs de LipA et EstA ont un impact *in vivo*, je propose de faire en priorité les expériences dans les larves de *Galleria mellonella* avant la caractérisation en détail des propriétés *in vitro* des VHHs inhibiteurs.

Un autre point faible relevé par le jury porte sur le manque de détails concernant les enseignements tirés de mon travail de mémoire et leur intégration concrète dans le projet doctoral. Il faisait directement allusion au fait que mon travail de mémoire ne m'a pas permis de sélectionner des VHHs contre les deux cibles étudiées : un site de phosphorylation porté par un peptide de 71 aa et la protéase LasB. Je n'ai pas suffisamment expliqué qu'il s'agissait de deux cibles particulièrement challenging : moins de 10 VHHs sélectionnés contre des petits peptides sont décrits dans la littérature, et les VHHs se sont révélés être des substrats de choix pour la protéase LasB. Notons que le travail réalisé pendant mon mémoire a été essentiel pour l'isolation (2 mois après la fin de mon mémoire) d'un VHH inhibant effacement LasB ($K_i = 10$ nM). Mon travail de mémoire, et l'expérience de l'équipe NEPTUNS qui a récemment généré des VHHs inhibiteurs contre 5 enzymes, souligne l'importance de la nécessité de tester en parallèle plusieurs stratégies d'immobilisation de l'enzyme cible lors du panning par phage display et de vérifier qu'elle est toujours active après immobilisation. Je n'ai pas clairement indiqué ces éléments lors de l'audition.

Ces remarques constituent des axes d'amélioration constructifs, qui ne remettent ni en cause la faisabilité globale du projet ni son potentiel scientifique. Elles vont me permettre une réflexion sur l'optimisation et la clarification des choix scientifiques. Je demeure pleinement motivé et engagé dans la réussite de ce projet doctoral.

Je vous prie d'agréer, Mesdames, Messieurs, l'expression de mes salutations distinguées.