



**Ecole Doctorale : Sciences chimiques (ED250)**

Institut de Chimie Radicalaire (UMR7273)

Equipe Chimie Radicalaire Organique et Polymère de Spécialité (CROPS)

**THÈSE DE DOCTORAT**

Discipline : Sciences Chimiques

Spécialité : Biochimie

Soutenu par :

**Chloé MOLLET**

Identification et caractérisations physico-chimiques et pharmacologiques de nouvelles molécules bioactives isolées à partir de venins d'animaux : exemple des peptides antimicrobiens.

Soutenu à Marseille, le 20 Octobre 2017

Composition du jury :

Mme Katy JEANNOT	Maître de Conférences des Universités, Université de Franche-Comté	Rapporteur
Mr Jean-François HERNANDEZ	Directeur de Recherche, Université de Montpellier	Rapporteur
Mme Sylvie REBUFFAT	Professeur, Sorbonne Universités	Examineur
Mr Mimoun AYOUB	Président-Directeur Général de Capua BioServices	Examineur
Mr Christian LEGROS	Professeur, Université d'Angers	Examineur
Mr Marc MARESCA	Maître de Conférences, Université d'Aix-Marseille	Examineur
Mr. Harold DE POMYERS	Président de la société LATOXAN	Invité
Mr Denis BERTIN	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Directeur de Thèse
Mr Kamel MABROUK	Ingénieur de Recherche, Université d'Aix-Marseille	Co-Directeur de Thèse



La recherche de nouvelles molécules bioactives utilisables en thérapeutique est un enjeu majeur de santé publique en particulier dans le traitement de certaines maladies. Dans ce contexte, des venins ont été criblés dans plusieurs domaines pour la recherche de nouveaux agents antidouleurs, anti-tumoraux et principalement antibactériens.

La résistance naturelle des bactéries liée à la surutilisation des antibiotiques dans les thérapies humaines et animales ainsi que dans différents domaines industriels ont entraîné la sélection de bactéries pathogènes résistantes à de multiples médicaments. Depuis les dernières décennies, la résistance aux antibiotiques conventionnels a limité les options thérapeutiques, entraînant une augmentation significative de la mortalité et de la morbidité dans les hôpitaux. En outre, depuis 1970, seules deux nouvelles classes d'antibiotiques, d'oxazolidinones (Linezolid, Pfizer) et de lipopeptides cycliques (Daptomycin, Cubiste) ont été mises sur le marché. Ainsi, les peptides antimicrobiens (PAMs), isolés à partir de sources naturelles, représentent une alternative originale pour remédier à ce problème de santé publique. Les venins constituent une source riche de substances pharmacologiquement actives uniques et novatrices, y compris les PAMs.

Dans notre étude, les propriétés antibactériennes de 200 venins de serpents, de scorpions, d'amphibiens et d'insectes ont été étudiées contre des souches bactériennes non pathogènes et pathogènes. Parmi les venins sélectionnés, au moins six PAMs ont été isolés à partir d'un venin d'insecte. L'identification de ces PAMs a été réalisée grâce à : i) des tests d'inhibition de croissance bactérienne en milieu liquide et solide, ii) des analyses HPLC, pour la purification des composés d'intérêts et iii) des analyses de spectrométrie de masse conjuguées au séquençage et à des analyses en acides aminées, pour la détermination des séquences/structures. Le peptide 1 original, composé de 12 résidus d'acides aminés, inhibe la croissance des bactéries Gram positives (CMI = 6,25 $\mu$ M contre *S. aureus*) et Gram négatives (CMI = 100 $\mu$ M contre *P. aeruginosa*) mais présente une forte hématotoxicité (CMH<sub>50</sub> = 10 $\mu$ M) et donc de faibles indices thérapeutiques (IT= 1,6 et 0,1 respectivement). Une étude de relation structure-activité a été initiée par synthèse chimique en phase solide afin d'obtenir un agent antimicrobien moins toxique. Deux analogues, R<sub>1</sub>W<sub>8</sub> et I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>, présentent respectivement une activité contre les bactéries Gram positives (IT = 18) et Gram négatives (IT > 1000). Les résultats préliminaires de l'étude du mécanisme d'action suggèrent que ces peptides agissent contre les bactéries par perméabilisation de leur membrane cytoplasmique. Ces peptides peuvent servir de modèles pour l'élaboration de nouveaux agents antimicrobiens.

**Mots clés :** venins d'animaux ; résistance bactérienne ; peptides antimicrobiens (PAMs) ; concentration minimum inhibitrice (CMI) ; hématotoxicité ; indice thérapeutique (IT) ; perméabilisation membranaire.

## ABSTRACT

---

The research for new therapeutic molecules is a major public health issue, more particularly in the treatment of certain diseases. In this context, venoms have been screened in several areas in order to identify new painkillers, anti-tumors and mainly antibacterial agents.

Natural resistance of bacteria consecutive to overuse of antibiotics in human and animal therapies as well as in various industrial fields have led to the selection of pathogenic multi-drug resistant bacteria. Over the last few decades, resistance to conventional antibiotics has limited treatment options, resulting in a significant increase in mortality and morbidity in hospitals. Furthermore, since 1970, only two new classes of antibiotics, oxazolidinones (Linezolid, Pfizer) and cyclic lipopeptides (Daptomycin, Cubiste) have been placed on the market. The literature suggests that antimicrobial peptides (AMPs), isolated from natural sources, represent an original alternative to small molecules for the development of new active and non-resistance inducing antibiotics. Venoms are known to be a rich source of unique and innovative pharmacologically active substances, including AMPs.

In our study, the antibacterial properties of 200 venoms of snakes, scorpions, amphibians and insects were studied against non-pathogenic and pathogenic bacterial strains. Of the selected venoms, at least six AMPs were isolated from an insect venom. The identification of these AMPs was carried out by: i) tests for the inhibition of bacterial growth in liquid and solid conditions, ii) HPLC for the purification of compounds from fractions found active and iii) mass spectrometry conjugated with amino acid sequencing for sequences/structures determination.

The original peptide 1, composed of 12 amino acid residues, inhibits the growth of Gram positive bacteria (MIC = 6.25 $\mu$ M against *S. aureus*) and Gram negative (MIC = 100 $\mu$ M against *P. aeruginosa*) but shows high hemotoxicity (HMC<sub>50</sub> = 10  $\mu$ M) and therefore low therapeutic indices (TI = 1.6 and 0.1 respectively). A structure-activity relationship study was initiated by solid-phase chemical synthesis to obtain a less toxic antimicrobial agent. Two analogs, R<sub>1</sub>W<sub>8</sub> and I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>, exhibit respectively activity against Gram positive (TI = 18) and Gram negative (TI > 1000) bacteria. The preliminary results of the action mechanism study suggest that these peptides have a pore-forming action on bacteria cytoplasmic membrane. These peptides can be used as models for the development of new antimicrobial agents.

**Key words :** animal venoms ; bacterial resistance ; antimicrobial peptides (AMPs) ; minimal inhibition concentration (MIC) ; hemotoxicity ; therapeutic index (TI) ; membrane permeabilization.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT  
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:  
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A  
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

*“How you make others feel about themselves says a lot about you”*

inconnu

*« La vie est comme un livre, ne jamais sauter aucun chapitre et continuer de tourner les pages, tôt ou tard on comprendra pourquoi chaque paragraphe était nécessaire. »*

Bernard Werber

s

*A Sami et à Mes parents pour tout,*

*A Thomas, Margaux, Géraldine, Ninouche et Maxou, mes petits bonheurs*

*A Alex, parti trop tôt, et Mes Grands-parents qui sont dans mon cœur*

*A ma famille !*

## REMERCIEMENTS PROFESSIONNEL

---

J'aimerais tout d'abord remercier le Pr. Denis BERTIN, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce projet et pour avoir accepté d'être là en ce jour de soutenance malgré vos nombreuses obligations.

Merci également au Directeur de l'Institut de Chimie Radicalaire et de l'équipe CROPS, le Dr. Didier GIGMES pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire. Merci pour ta bonne humeur, ta générosité et ta bienveillance. Il a toujours été facile et agréable de discuter avec toi sur le plan professionnel et personnel. Ta disponibilité et ton écoute participent à une atmosphère de travail stimulante et agréable.

Mes sincères remerciements vont au Dr. Katy JEANNOT et au Dr. Jean-François HERNANDEZ pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit. Je remercie également l'ensemble des membres du jury. Merci à tous pour votre disponibilité et votre présence et tout particulièrement les Pr. Sylvie REBUFFAT et Christian LEGROS, ainsi que le Dr. Mimoun AYOUB d'être venus de si loin.

Merci bien évidemment à mon encadrant au cours de toutes ces années, le Dr. Kamel MABROUK, pour qui la science ne dort jamais. Merci pour ton dévouement, je sais que tu as toujours voulu le meilleur pour ce projet. Merci pour tes conseils, ton aide et le partage de ton expérience au cours de longs échanges. Merci également de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur de multiples sujets tous plus intéressants et variés les uns que les autres, malheureusement si vastes !

Merci également au Dr. Harold DE POMYERS, directeur de la société LATOXAN, sans qui cette thèse n'aurait pas pu être possible. Merci pour tous les moyens mis à disposition pour la réalisation des différents projets. Merci également pour votre bienveillance tout au long de ces années. Je tenais également à remercier Bénédicte BOURGEAUD avec qui il est toujours très agréable d'échanger. Malgré la distance, ton accessibilité, ton écoute et ta gentillesse m'ont permis de garder un lien permanent avec la société.

Merci également à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation et au bon déroulement de ce projet. Merci à tous les directeurs qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires à BiosCiencés, à la Timone ou à Angers.

Un merci tout particulier au Dr. Marc MARESCA pour tout ton temps. Toujours débordé et à mille à l'heure, tu as pourtant toujours été très accessible et disponible. Ces trois années et

## REMERCIEMENTS PROFESSIONNEL

---

l'avancement du projet n'auraient pas été les mêmes sans ton aide et tes conseils précieux. Merci également pour ton écoute, ce fut toujours très agréable et stimulant de travailler avec toi.

Un merci très chaleureux à Mr. Pascal MANSUELLE avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler et à partager de nombreuses discussions. Merci pour avoir pris le temps de m'expliquer, de partager votre expérience et de me faire découvrir la protéomique. Merci également à Mme Régine LEBRUN pour sa sympathie et son accueil au sein de la plateforme Protéomique. Un grand merci à vous deux pour votre aide dans la caractérisation de nos produits.

Je tenais également à remercier nos homologues Tunisiens. Merci au Dr. Amor MOSBAH et à ses collaborateurs pour leur aide dans ce projet et leur savoir-faire enrichissant. Un merci tout particulier à Awatef OUERTANI pour ta douceur et ta gentillesse extrême. Je te remercie pour les expériences réalisées en parallèle de ton travail de thèse.

Merci également à Mr Patrick FOURQUET pour votre gentillesse, votre contribution dans ce travail et pour m'avoir permis de suivre les expériences de MS/MS.

Merci à Mr. Jean-Pierre ANDRIEU (IBS, Grenoble) pour la quantification en acides aminés des molécules isolées. Merci également à Mrs. Gilles VALETTE et Guillaume CAZALS du Laboratoire de Mesures Physique (Montpellier) ainsi qu'à Mr. Gilles SCHNELL et Mme Marie-Pierre PAVAGEAU de ThermoFisher pour leurs analyses en HRMS.

Merci également au Pr. Christian LEGROS pour son aide précieuse dans la réalisation de la deuxième partie de ce projet de thèse. Merci pour votre bienveillance et votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire. J'ai réellement apprécié travailler à Angers, en collaboration avec vous. Un grand merci à la gentille et pétillante Claire LEGENDRE pour sa disponibilité et la réalisation de certaines expériences qui ont permis un avancement du projet malgré la distance. Merci également à Lucille CRESPIE pour m'avoir hébergée et accompagnée durant mon premier séjour à Angers, ainsi qu'aux doctorants qui m'ont accueillie et avec lesquels j'ai pu partager de bons moments malgré mes courts séjours.

Merci également aux personnes avec qui j'ai pu travailler sur d'autres projets. Je pense notamment au Dr. Yasmina MECKMOUCHE avec qui j'ai adoré apprendre la FPLC. Merci pour ta bonne humeur, ses bons moments passés ensemble, ton soutien moral et tes bonbons. Merci également au Pr. José LOUIS pour sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité.

## REMERCIEMENTS PROFESSIONNEL

---

Enfin, merci aux directeurs successifs de l'école doctorale, les Pr. Frédéric FAGES et Thierry CONSTANCIEUX pour leur suivi scientifique au cours de ces années et un merci tout particulier à Mme Corinne ESQUIVA. Toujours disponible pour les doctorants, vous êtes quelqu'un sur qui nous pouvons compter. Toujours soucieuse de notre bien-être, je tenais à vous remercier pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Toujours à l'écoute et de bons conseils, vous avez représenté un réel soutien moral.



## REMERCIEMENTS PERSONNEL

---

Cette thèse m'aura également permis de découvrir une nouvelle région très agréable pour son terroir, sa mer et son soleil et de faire de nouvelles rencontres.

La plus belle de toute, ma Marionnette, avec qui j'ai tout vécu, même des discussions de sourds, mais également Mister Salsa Boy ! Merci à vous deux pour avoir été là. Des pages entières ne suffiraient pas à décrire tout ce que nous avons vécu ensemble. Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans vos âneries, vos conseils, votre aide et votre soutien, alors merci !

Laurent ! Formidable collègue de bureau, tu as toujours le mot pour rire ! Présent aussi bien dans les bons que les mauvais moments, je voudrais te remercier pour tes conseils avisés, ta disponibilité et ton soutien.

Merci à toi aussi Sou pour ton aide au cours de cette dernière année de thèse mais également pour ta bonne humeur à toutes épreuves, ton relativisme et tes « c'est bientôt le week-end ! » journaliers dès le mardi matin !

Merci également à tous les doctorants, post-docs et membres de l'équipe CROPS pour les moments partagés ensemble au labo autour d'une HPLC ou d'un bon gâteau et en dehors. Merci en particulier à Adèle, David, Kawtar, Elodie, Daniel, Nico, Elisabetta, Anna, Ségolène, Marion.R....

Je tiens également à remercier les stagiaires qui ont apporté leur aide d'une façon ou d'une autre à ce projet. Merci en particulier à Nelly, Lyse, Céline et Eline pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre amitié. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Merci « à ceux du fond » : Maxime et Valérie, notre maman du 5<sup>ème</sup>, toujours prête à donner main forte et à nous cuisiner de bonnes choses. Merci à vous deux pour nos discussions, votre générosité et vos nombreux conseils.

J'ai également croisé la route d'Hermine avec qui j'ai pu voir quelques manipes. Malgré le peu de moments passés ensemble, j'ai beaucoup apprécié faire ta connaissance. Tu es quelqu'un de très sympathique et agréable. Je te souhaite le meilleur et une bonne continuation dans la réalisation de tes nouveaux projets.

## REMERCIEMENTS PERSONNEL

---

Bien entendu je ne vous oublie pas, vous qui m'êtes si chers, vous qui me connaissez suffisamment pour deviner et savoir tout ce que je ne prononce pas.

Merci à toute ma famille, merci pour tous les moments passés ensemble bien qu'ils aient été trop peu nombreux ses dernières années... Sachez que tout ce chemin n'aurait pas pu être parcouru sans vous. Sachez qu'un merci perdu dans ces quelques pages n'est pas à la hauteur de tout ce que vous m'avez apporté.

Merci à ma nouvelle famille pour leur soutien, leur gentillesse et leur accueil au cours de cette aventure.

Merci en particulier à vous mes chers parents pour votre soutien inconditionnel, votre aide et vos conseils depuis toujours. Jamais je n'aurais pensé en arriver là un jour et cela n'aurait pas été possible sans vous, alors merci !

Et enfin, je souhaiterais remercier mon chéri. Ces mots ne suffiront pas à exprimer tout ce que j'ai sur le cœur et toute la gratitude que je te porte. Tout d'abord, merci pour avoir tenu bon toutes ces années passées ensemble loin l'un de l'autre. Merci pour tous ces « bonne nuit » au téléphone, mais surtout pour ta positivité, ton soutien et ton aide dans les moments difficiles. Tu as été mon pilier au cours de ces années et je suis fière de nous car malgré la distance, la fatigue, le stress...on n'a pas lâché et nous avons réussi à être là un maximum l'un pour l'autre.

---

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---



---

## A

A.A. · *Acide Aminé*

A.A.A. · *Analyse en Acides Aminés*

ABC · *ATP-Binding Cassette*

ACh · *AcétylCholine*

ACN · *Acétonitrile*

AM · *AcétoxyMéthylester*

AMM · *Autorisation de Mise sur le Marché*

AT · *Acide Teichoïque*

ATCC · *American Type Culture Collection*

ATZ · *AnilinoThioaZolinone*

---

## B

BNMI · *Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée*

Boc · *tert-butyloxycarbonyl*

---

## C

Canaux Na<sub>v</sub> · *Canaux sodium dépendants du potentiel*

CIM · *Concentration Minimale Inhibitrice*

CIP · *Collection de l'Institut Pasteur*

CL · *Cardiolipine*

CMB · *Concentration Minimale Bactéricide*

CMI · *Concentration Minimum Inhibitrice*

CPS · *Capsule PolySaccharidique*

CRCM · *Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille*

CROPS · *Chimie Radicalaire Organique et Polymères de Spécialité, Voir*

CTAB · *Cetrimonium bromide*

---

## D

D.A.A. · *Acide α-Aminé*

DAD · *Diode Array Dectector (=PAD chez Waters)*

DIPEA · *N,N-Diisopropyléthylamine*

DMEM · *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO · *DiMéthylSulfOxide*

DPBS · *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

DSMZ · *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen = Collection Allemande de Microorganismes et de culture Cellulaires*

---

## E

EDTA · *Acide Ethylène Diamine Tétracétique*

EPS · *ExoPolySaccharide*

ESI · *Electrospray Ionisation = Ionisation Electrospray*

ESKAPE · *Enterococcus faecium, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa et Enterobacter*

---

## F

FD&C Act · *Food, Drug and Cosmetics Act*

FDA · *Food & Drug Administration*

FLIPR® · *Fluorescent Imaging Plate Reader*

Fmoc · *N-α-fluorenylmethyloxycarbonyl*

---

**G**

GlcNAc · *Acide N-acétylGlucosamine*

Gram - · *Gram négative*

Gram + · *Gram positive*

Gro-P · *poly-lycocérophosphate*

---

**H**

HBTU · *1-hydroxybenzotriazole*

HCCA · *Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique*

HOBt · *2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate*

HPLC · *High Performance Liquid Chromatography = Chromatographie Liquide Haute Performance*

HTS · *High Throughput Screening*

---

**I**

IBS · *Institut de Biologie Structurale*

ICR · *Institut de Chimie Radicalaire*

IMM · *Institut de Microbiologie de la Méditerranée*

IP · *Iodure de Propidium*

iSm2 · *Institut des Sciences Moléculaires de Marseille*

---

**L**

L-Ara4N · *4-amino-4-désoxy-L-arabinose*

LB · *Luria Bertani ou Lysogeny Broth*

LBVBGR · *Laboratoire Biotechnologie & Valorisation des Bio-GéoRessources*

LPS · *LipoPolySaccharide*

LTA · *Acides LipoTeichoïques*

---

**M**

MALDI · *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation = Désorption et Ionisation Laser Assistée par Matrice*

MDR · *MultiDRogues*

MEC · *Matrice ExtraCellulaire*

MH · *Mueller Hinton*

MP · *MétalloProtéase*

MS · *Mass Spectrometry = Spectrométrie de Masse*

MTT · *bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium*

MurNAc · *Acide N-acétylMuramique*

MWD · *Multi-Wavelength Detector = multi-longueur d'onde*

---

**N**

*N. meningitidis* · *Neisseria meningitidis*

NCX · *Echangeur sodium-calcium*

NEM · *Nouvelle Entité Moléculaire*

NHEK-Neo · *Kératinocytes humain néonatal sains*

---

**O**

OMS · *Organisation Mondiale de la Santé*

---

**P**

PAD · *Photodiode Array Detector (Waters)*

PAM · *Peptide AntiMicrobien*

PBD · *Penicillin-Binding Protein = Protéine Liant la Pénicilline (PLP)*

PBS · *Phosphate-Buffered Saline*

PC · *PhosphatidylCholine*

PDG · *PeptiDoGlycane*

PE · *PhosphatidylEthanolamine*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

pEtN · *Phosphoéthanolamine*

PG · *PhosphatidylGlycérol*

PITC · *PhénylIsoThioCyanate*

PLA<sub>2</sub> · *PhosphoLipase A<sub>2</sub>*

POPC · *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

POPE · *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine*

POPG · *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol)*

PS · *PhosphatidylSérine*

PSM · *Poste de Sécurité Microbiologique*

PTC · *PhénylThioCarbamylé*

PTH · *PhénylThio-Hydantoïne*

---

### R

R&D · *Recherche et Développement*

RND · *Résistance-Nodulation Division*

RP-HPLC · *Reverse-Phase HPLC = HPLC en phase inverse*

rpm · *rotation par minute*

RT · *Room Température = Température Ambiante*

---

### S

*S. aureus* · *Staphylococcus aureus*

*S. pneumoniae* · *Streptococcus pneumoniae*

*S. salamandra* · *Salamandra salamandra*

*SARM* · *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline*

SM · *SphingoMyéline*

SNC · *Système Nerveux Central*

SNP · *Système Nerveux Périphérique*

SP · *Sérine-Protéase*

SPPS · *Synthèse Peptidique en Phase Solide*

---

### T

TA · *Température Ambiante*

TIS · *Tri-IsopropylSilane*

TOF · *Time Of Flight = temps de vol*

TTX · *Tétrodotoxine*

TTX-R · *Tétrodotoxine-Résistant*

TTX-S · *Tétrodotoxine-Sensible*

---

### U

UFC · *Unité Formant Colonie*

U-HPLC · *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*

UPLC · *Ultra Performance Liquid Chromatography (Waters)*

USDA · *United States Department of Agriculture = Département de l'Agriculture des Etats-Unis*

---

### V

VME · *Vésicule Membranaire Externe*

VTD · *Vératridine*



---

# SOMMAIRE

---

<b>PREAMBULE : CONTEXTE SOCIO-ECONOMIQUE DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>5</b>
<b>I. LES VENINS : DES SUBSTANCES COMPLEXES .....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. GENERALITES.....</b>	<b>5</b>
<b>I.2. COMPOSITION .....</b>	<b>6</b>
<b>I.3. EFFETS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>8</b>
I.3.1. ACTIVITE SUR LE SYSTEME NERVEUX.....	10
I.3.2. ACTIVITE SUR L'HEMOSTASE .....	12
I.3.2.1. Action vasculaire.....	12
I.3.2.2. Action plaquettaire.....	13
I.3.2.3. Action sur la coagulation .....	13
I.3.2.4. Action fibrinolytique.....	14
I.3.3. ACTIVITE CYTOTOXIQUE.....	15
I.3.4. ACTIVITE INFLAMMATOIRE .....	16
I.3.5. ACTIVITE SUR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE.....	17
<b>II. LES VENINS : SOURCES DE MOLECULES THERAPEUTIQUES .....</b>	<b>19</b>
<b>II.1. UTILISATION ANCESTRALE.....</b>	<b>19</b>
<b>II.2. POTENTIEL THERAPEUTIQUE ACTUEL .....</b>	<b>20</b>
<b>- PARTIE A - LES VENINS : DE NOUVELLES SOURCES D'ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>25</b>
<b>I. LES INFECTIONS BACTERIENNES .....</b>	<b>25</b>
<b>II. DE L'AVENEMENT DES ANTIBIOTIQUES A LA RESISTANCE BACTERIENNE .....</b>	<b>28</b>
<b>II.1. L'AVENEMENT DES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2. MODES D' ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>30</b>
<b>II.3. LE DECLIN.....</b>	<b>31</b>
<b>II.4. L'EMERGENCE DES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>33</b>
<b>II.5. MECANISMES D' ACTION DE LA RESISTANCE ANTIBACTERIENNE .....</b>	<b>36</b>
II.5.2. PREVENTION D' ACCES A LA CIBLE .....	38

---

II.5.2.1. Perméabilité réduite.....	38
II.5.2.2. Augmentation de l'efflux.....	38
II.5.2.3. Modification de la cible de l'antibiotique (par mutation ou modification post-traductionnelle).....	41
II.5.2.4. Inactivation de l'antibiotique (par hydrolyse ou modification).....	43
<b>III. DECOUVERTE D'AGENTS ANTIBACTERIENS INNOVANTS : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>45</b>
<b>III.1. LA DECOUVERTE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>46</b>
<b>III.2. ROLE BIOLOGIQUE, STRUCTURE ET DIVERSITE DES PAMs.....</b>	<b>47</b>
<b>III.3. CLASSIFICATION .....</b>	<b>48</b>
III.3.1. LES PEPTIDES LINEAIRES EN HELICE ALPHA .....	49
III.3.2. LES PEPTIDES FORMANT DES FEUILLETS BETA.....	49
III.3.3. LES PEPTIDES A STRUCTURE ETENDUE.....	50
<b>III.4. CARACTERISTIQUES QUI AFFECTENT L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....</b>	<b>50</b>
III.4.1. CARACTERISTIQUES PEPTIDIQUES .....	50
III.4.2. CARACTERISTIQUES BACTERIENNES.....	53
<b>III.5. MODE D'ACTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>53</b>
III.5.1. SPECIFICITE DU MODE D'ACTION DES PAMs AVEC LA MEMBRANE BACTERIENNE .....	53
III.5.2. MODE D'ACTION DES PAMs CATIONIQUES .....	54
III.5.2.1. Diffusion des PAMs jusqu'à la membrane cytoplasmique .....	54
III.5.2.2. Adsorption des PAMs à la membrane cytoplasmique .....	56
III.5.2.3. Mécanismes de mort bactérienne.....	56
<b>III.6. MECANISMES DE RESISTANCE AUX PAMs .....</b>	<b>63</b>
III.6.1. MODIFICATION DE L'ENVELOPPE BACTERIENNE.....	65
III.6.1.1. Modification des charges nettes de surface.....	65
III.6.1.2. Changement structural de surface .....	70
III.6.1.3. Capsule .....	73
III.6.2. POMPES A EFFLUX ET A INFLUX .....	74
III.6.2.1. Pompes à influx .....	74
III.6.2.2. Pompe à efflux.....	75
III.6.3. INACTIVATION/DEGRADATION PROTEOLYTIQUE OU PIEGEAGE DES PAMs .....	75
III.6.3.1. Dégradation protéolytique .....	75
III.6.3.2. Piégeage protéique.....	76
<b>III.7. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES PAMs .....</b>	<b>77</b>

---

---

<b>CHAPITRE II : RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>I. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE VENINS D'ANIMAUX.....</b>	<b>85</b>
<b>I.1. CIBLAGE DES VENINS EN MILIEU LIQUIDE .....</b>	<b>85</b>
<b>I.2. CIBLAGE EN MILIEU SOLIDE.....</b>	<b>88</b>
<b>I.3. COMPARAISON DES METHODES DE CIBLAGE .....</b>	<b>90</b>
<b>II. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTIBACTERIENNES DU VENIN DE <i>POLISTES GALLICUS</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>II.1. TESTS DES FRACTIONS.....</b>	<b>96</b>
<b>II.2. TESTS DES SOUS-FRACTIONS.....</b>	<b>97</b>
<b>II.3. TESTS DES PRODUITS PURIFIES .....</b>	<b>99</b>
<b>III. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES ANTIBACTERIENNES .....</b>	<b>100</b>
<b>III.1. SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF.....</b>	<b>100</b>
<b>III.2. SEQUENÇAGE.....</b>	<b>102</b>
<b>III.3. ANALYSE EN ACIDES AMINES .....</b>	<b>104</b>
<b>III.4. ANALYSE MS/MS .....</b>	<b>104</b>
<b>III.5. COMPARAISON AVEC LA LITTERATURE .....</b>	<b>107</b>
<b>IV. CARACTERISATIONS PHARMACOLOGIQUES.....</b>	<b>111</b>
<b>IV.1. ETUDE PRELIMINAIRE DE RELATION STRUCTURE/ACTIVITE A L'AIDE D'ANALOGUES DE SYNTHESE</b>	<b>111</b>
<b>IV.1.1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE .....</b>	<b>113</b>
<b>IV.1.2. DETERMINATION DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE.....</b>	<b>116</b>
<b>IV.1.3. EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE .....</b>	<b>120</b>
<b>IV.1.4. ETUDE PRELIMINAIRE DU MECANISME D'ACTION .....</b>	<b>122</b>
<b>IV.1.4.2. Tests de perméabilisation .....</b>	<b>123</b>
<b>IV.1.4.3. Caractérisation biophysique.....</b>	<b>131</b>
<b>IV.1.5. ETUDES/CARACTERISATIONS PHARMACOLOGIQUES COMPLEMENTAIRES.....</b>	<b>143</b>
<b>IV.1.5.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide.....</b>	<b>143</b>
<b>IV.1.5.2. Détermination de la CMI sur des souches bactériennes multirésistantes</b>	<b>145</b>
<b>IV.1.5.3. Evaluation de l'activité antifongique.....</b>	<b>149</b>
<b>IV.1.5.4. Comparaison avec des analogues de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) .....</b>	<b>151</b>
<b>V. AUTRES FRACTIONS BIOACTIVES ISOLEES A PARTIR DE VENINS EN COURS D'IDENTIFICATION ET CARACTERISATION ...</b>	<b>156</b>
<b>V.1. ETUDE DE V234.....</b>	<b>156</b>
<b>V.2. ETUDE DE V81.....</b>	<b>160</b>
<b>V.3. ETUDE DE V53.....</b>	<b>165</b>
<b>V.4. ETUDE DE V261.....</b>	<b>166</b>

---

---

V.5. ETUDE DE V139.....	167
<b>CHAPITRE III : CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>169</b>
<b><u>- PARTIE B - LES VENINS : DE NOUVELLES SOURCES DE LIGANDS DES CANAUX SODIUM DEPENDANTS</u></b>	
<b><u>DU POTENTIEL.....</u></b>	<b>175</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.....</b>	<b>177</b>
I. LES CANAUX SODIQUES VOLTAGE DEPENDANTS.....	177
II. STRUCTURE DES CANAUX $Na_v$ .....	178
III. ROLE PHYSIOLOGIQUE.....	179
IV. TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX $Na_v$ .....	180
V. MEDICAMENTS INTERAGISSANT AVEC LES CANAUX $Na_v$ .....	181
VI. ETUDE DE LA REPONSE FONCTIONNELLE DES CANAUX $Na_v$ .....	182
<b>CHAPITRE II : RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>183</b>
I. UTILISATION DE LIGNEES CELLULAIRES EXPRIMANT LES CANAUX NAV POUR LA RECHERCHE DE NOUVEAUX LIGANDS. .....	183
I.1. CARACTERISATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE GH3B6.....	183
I.2. METHODE D'ETUDE DE LA REPONSE FONCTIONNELLE DES CANAUX $Na_v$ .....	185
II. CRIBLAGE DES VENINS INHIBITEURS DES CANAUX $Na_v$ A L'AIDE DE LA SONDE FURA-2 SUR LES CELLULES GH3B6.... .....	186
II.1. CONTROLES INTERNES DE LA MANIPE .....	186
II.2. TESTS DES VENINS ENTIERS.....	187
II.3. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V114 .....	190
II.4. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V16.....	194
II.5. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V118 .....	198
III. CRIBLAGE DES VENINS ACTIVATEURS DES CANAUX $Na_v$ A L'AIDE DE LA SONDE FURA-2 SUR LES CELLULES GH3B6 .. .....	201
<b>CHAPITRE III : CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>205</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>209</b>

---

---

<b>- PARTIE C - PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>211</b>
<b>I. VENINS.....</b>	<b>213</b>
<b>I.1. RECOLTE / STOCKAGE / FOURNISSEUR .....</b>	<b>213</b>
<b>I.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>213</b>
<b>II. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES VENINS .....</b>	<b>213</b>
<b>II.1. CULTURE DES BACTERIES .....</b>	<b>213</b>
II.1.1. REACTIFS/PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE .....	213
II.1.2. LES SOUCHES BACTERIENNES .....	214
II.1.3. CULTURE DES BACTERIES .....	216
II.1.4. CONSERVATION DES BACTERIES PAR CRYOGENIE .....	216
<b>II.2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE .....</b>	<b>216</b>
II.2.1. CRIBLAGE EN MILIEU LIQUIDE .....	216
II.2.2. CRIBLAGE EN MILIEU SOLIDE.....	217
<b>III. EVALUATION DE L'ACTIVITE MODULATRICE DES CANAUX SODIQUES DES VENINS .....</b>	<b>218</b>
<b>III.1. CULTURE DES GH3B6.....</b>	<b>218</b>
III.1.1. MILIEU DE CULTURE ET REACTIFS .....	218
III.1.2. ENTRETIEN DES CELLULES : REPIQUAGE .....	219
III.1.3. REPONSE FONCTIONNELLE : ETUDE DU FLUX CALCIQUE INTRACELLULAIRE.....	220
III.1.3.1. Jn-1 : préparation des cellules.....	221
III.1.3.2. Jn.....	221
<b>IV. PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES MOLECULES ACTIVES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) .....</b>	<b>224</b>
<b>IV.1. REACTIFS .....</b>	<b>224</b>
<b>IV.2. FRACTIONNEMENT DES VENINS PAR HPLC PREPARATIVE .....</b>	<b>225</b>
<b>IV.3. FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS PAR HPLC SEMI-PREPARATIVE.....</b>	<b>226</b>
<b>IV.4. FRACTIONNEMENT ET ANALYSE PAR HPLC ANALYTIQUE .....</b>	<b>226</b>
<b>V. CARACTERISATIONS PHYSICOCHIMIQUES DES MOLECULES ACTIVES .....</b>	<b>226</b>
<b>V.1. SPECTROMETRIE DE MASSE .....</b>	<b>226</b>
V.1.1. MALDI-TOF .....	226
V.1.2. DIGESTION A LA GLUC OU A LA TRYPSINE SUIVIE PAR FRAGMENTATION MS/MS .....	227
V.1.3. SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION (HRMS) .....	228
V.1.3.1. Q-Exactive Plus .....	228
V.1.3.2. Synapt G2-S .....	229
<b>V.2. SEQUENÇAGE N-TERMINAL PAR DEGRADATION D'EDMAN .....</b>	<b>229</b>

---

---

<b>V.3. ANALYSE EN ACIDES AMINÉS .....</b>	<b>231</b>
<b>VI. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE (SPPS).....</b>	<b>231</b>
<b>VI.1. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE .....</b>	<b>231</b>
<b>VI.2. ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE .....</b>	<b>233</b>
<b>VI.3. PURIFICATION DES PEPTIDES NEO-SYNTHÉTISÉS .....</b>	<b>233</b>
<b>VII. CARACTÉRISATIONS PHARMACOLOGIQUES .....</b>	<b>234</b>
<b>VII.1. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMUM INHIBITRICE (CMI) .....</b>	<b>234</b>
<b>VII.2. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTÉRICIDE (CMB).....</b>	<b>235</b>
<b>VII.3. ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ .....</b>	<b>235</b>
VII.3.1. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ HÉMOLYTIQUE.....	235
VII.3.2. DÉTERMINATION DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE .....	236
<b>VII.4. DOSAGE DE LA PÉRMEABILISATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE .....</b>	<b>237</b>
VII.4.1. PÉRMEABILISATION DES MEMBRANES PROCARYOTES.....	237
VII.4.2. PÉRMEABILISATION DES NHEK-NEO .....	238
<b>VII.5. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE SURFACE ET DE L'INTERACTION AVEC LES LIPIDES.....</b>	<b>238</b>
VII.5.1. ÉTUDE DE L'ADSORPTION DES PEPTIDES À L'INTERFACE AIR-EAU .....	238
VII.5.2. ÉTUDE DE L'INSERTION DES PEPTIDES DANS DES MONOCOUCHEs LIPIDIQUES RECONSTITUÉES....	238
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>241</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>289</b>

---

# INDEX DES FIGURES

---

FIGURE 1 : LES EFFETS BIOLOGIQUES DES ANIMAUX VENIMEUX AU COURS DU PROCESSUS D'ENVENIMATION, MODIFIE D'APRES DE LIMA ET AL. <sup>30</sup> .....	9
FIGURE 2 : EXEMPLE DE MOLECULES ISSUES DE DIFFERENTS VENINS D'ANIMAUX AGISSANT SUR LE SYSTEME NERVEUX <sup>29</sup> . .....	11
FIGURE 3 : EXEMPLE DE MOLECULES ISOLEES A PARTIR DE VENINS D'ANIMAUX AGISSANT A DIFFERENTES ETAPES DE L'HEMOSTASE <sup>29</sup> .....	14
FIGURE 4 : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'EMPOISONNEMENT ET DE L'ENVENIMATION AUX TOXINES ANIMALES <sup>43</sup> .....	18
FIGURE 5 : SCHEMAS DESCRIPTIFS DES PAROIS DES BACTERIES GRAM-POSITIVE ET GRAM-NEGATIVE <sup>83</sup> .....	26
FIGURE 6 : MODES D'ACTION DES DIFFERENTES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES <sup>107</sup> .....	30
FIGURE 7 : NOMBRE DE NMEs ANTIBACTERIENNES ACCEPTEES ENTRE 1938 ET 2013 <sup>108</sup> .....	31
FIGURE 8 : DEPENSES ENTRE 1993 ET 2003 DANS LA RECHERCHE BIOMEDICALE <sup>103</sup> .....	32
FIGURE 9 : NOMBRE D'ANTIBIOTIQUES DISPONIBLES POUR L'UTILISATION CLINIQUE ENTRE 1938 ET 2013 <sup>108</sup> .....	33
FIGURE 10 : MECANISMES INTRINSEQUES DE RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES. ....	37
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX TYPES DE SYSTEME A EFFLUX BACTERIEN. ....	39
FIGURE 12 : VOIES DE REGULATION DES POMPES MULTIDROGUES. ....	41
FIGURE 13 : MODIFICATION DE LA CIBLE BACTERIENNE.....	42
FIGURE 14 : MODIFICATION DE L'ANTIBIOTIQUE.....	44
FIGURE 15 : STRUCTURE 2D DE LA MELITTINE DU VENIN D'ABEILLE, <i>APIS MELLIFERA</i> <sup>178</sup> .....	47
FIGURE 16 : PAMs ISOLEES A PARTIR DE VENINS DE SCORPIONS, SERPENTS, AMPHIBIENS, ARAIGNEES ET INSECTES. ....	47
FIGURE 17 : STRUCTURE SECONDAIRE ET CONFORMATION DES PAMs EN 3D <sup>178</sup> .....	49
FIGURE 18 : EVENEMENTS MOLECULAIRE CLES DES PAMs CONDUISANT A LA MORT DES BACTERIES GRAM NEGATIVES. .....	55
FIGURE 19 : MORT BACTERIENNE INDUITE PAR DESTABILISATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE SELON LE MODELE "BARREL-STAVE". ....	58
FIGURE 20: MORT BACTERIENNE INDUITE PAR DESTABILISATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE SELON LE MODELE "DES PORES TOROÏDAUX". ....	59

FIGURE 21 : MORT BACTERIENNE INDUITE PAR DESTABILISATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE SELON LE MODELE "CARPET" OU DU TAPIS.....	60
FIGURE 22 : MODES D' ACTIONS INTRA-BACTERIEN DES PAMs <sup>116</sup> .....	61
FIGURE 23 : MECANISMES DE RESISTANCE INTRINSEQUE CHEZ LES BACTERIES GRAM NEGATIVES ET GRAM POSITIVES VIS A VIS DES PAMs. ....	64
FIGURE 24 : ADDITION DE D-ALANINE A L'ACIDE LIPOTEICHOÏQUE. ....	66
FIGURE 25 : MODE D' ACTION DE MPRF CHEZ <i>S. AUREUS</i> .....	67
FIGURE 26 : MODIFICATION DE LA CHARGE NETTE DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE BACTERIENNE PAR ADDITION DE L- LYSINE OU DE L-ALANINE SUR DU PHOSPHATIDYLGLYCEROL. ....	67
FIGURE 27 : MODIFICATION DU LIPIDE A AVEC DU PHOSPHOETHANOLAMINE OU DU 4-AMINO-4-DESOXY-L-ARABINOSE. ....	69
FIGURE 28 : ACYLATION DU LIPIDE A MEDIEE PAR PAGP. ....	72
FIGURE 29 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L' INFLUX OU DE L' EFFLUX DES PAMs A L' INTERIEUR OU A L' EXTERIEUR D' UNE BACTERIE GRAM NEGATIVE. ....	74
FIGURE 30 : PROPORTION DE VENINS ACTIFS ET INACTIFS A 10MG/ML CONTRE QUATRE SOUCHES BACTERIENNES : <i>B. SUBTILIS</i> , <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> ET <i>P. AERUGINOSA</i> (DE GAUCHE A DROITE).....	85
FIGURE 31 : NOMBRE DE VENINS CAPABLES D'INHIBER LA CROISSANCE DE <i>B. SUBTILIS</i> , <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> ET <i>P. AERUGINOSA</i> A 10MG/ML EN FONCTIONS DE LA SOUS-FAMILLE A LAQUELLE ILS APPARTIENNENT. ....	86
FIGURE 32 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE V222 CONTRE DIFFERENTS MICRO-ORGANISMES A 100µg. ....	93
FIGURE 33 : CHROMATOGRAMME DE 250µg DE VENIN <i>POLISTES GALLICUS</i> A 214NM (NOIR) ET 280NM (VERT) OBTENU PAR HPLC ANALYTIQUE SUIVANT UN GRADIENT 0-60% DE TAMPON ACN/10%H <sub>2</sub> O/0,1% TFA EN 60 MINUTES SUR COLONNE C18 NUCLEODUR. ....	95
FIGURE 34 : FRACTIONNEMENT DE 50MG DE VENIN <i>POLISTES GALLICUS</i> SUR HPLC PREPARATIVE SELON UN GRADIENT 0- 80% DE TAMPON B PENDANT 80 MINUTES ET UN DEBIT A 6 ML/MIN SUR COLONNE C18 NUCLEODUR. ....	96
FIGURE 35 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES FRACTIONS DU VENIN <i>POLISTES GALLICUS</i> CONTRE <i>S. AUREUS</i> ET <i>E. COLI</i> . ....	97
FIGURE 36 : PROFIL HPLC PREPARATIVE DE LA ZONE FRACTIONNEE POUR ISOLER LES MOLECULES ANTIBACTERIENNES DU VENIN DE <i>P. GALLICUS</i> . ....	98

FIGURE 37 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES SOUS-FRACTIONS DE F18-F25 DU VENIN *POLISTES GALLICUS* CONTRE *S. AUREUS*. ..... 98

FIGURE 38 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES SOUS-SOUS-FRACTIONS DE F20, F21 ET F22 DU VENIN *POLISTES GALLICUS* CONTRE *S. AUREUS*. ..... 99

FIGURE 39 : CHROMATOGRAMMES DES PRODUITS GAL1 A GAL6 PURIFIES. .... 102

FIGURE 40: SPECTRES MS/MS OBTENUS SUITE A LA DIGESTION DES PEPTIDES GAL2 (EN HAUT, EN BLEU) EN COMPARAISON AVEC GAL1(EN BAS, EN ROSE). ..... 107

FIGURE 41 : REPRESENTATION EN ROUE HELICOÏDALE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUE DES PEPTIDES GAL6 (A) ET GAL5 (B) OBTENUES AU MOYEN DU LOGICIEL EN LIGNE HELIQUEST. .... 109

FIGURE 42 : POURCENTAGE D'HEMOLYSE DES ERYTHROCYTES HUMAINS INDUIT PAR LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS SYNTHETIQUES EN FONCTION DE LEUR CONCENTRATION..... 117

FIGURE 43 : EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE DES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ET (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) SUR DES CELLULES ADHERENTES NHEK-NEO JUSQU'A 1MM..... 121

FIGURE 44 : SUIVI DE LA CINETIQUE DE PERMEABILISATION DES MEMBRANES CYTOPLASMIQUE DE *B. SUBTILIS* (A), *E. COLI* (B), *S. AUREUS* (C) ET *P. AERUGINOSA* (D) PAR LES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (●), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (■), SGAL1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) (x), SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (▲) ET SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (◆). ..... 124

FIGURE 45 : SUIVI DE LA CINETIQUE DE PERMEABILISATION DES MEMBRANES PLASMIQUE DES NHEK-NEO PAR LES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (●), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (■), SGAL1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) (x), SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (▲) ET SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (◆).129

FIGURE 46 : TENSIOACTIVITE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ET (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) SEULS A L'INTERFACE PBS/AIR. .... 132

FIGURE 47 : DETERMINATION DE LA PRESSION D'INSERTION MAXIMALE DES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (A), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (B), SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (C), SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (D) ET SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (E) DANS DIFFERENTES MONOCOUCHE DE LIPIDES PURS. .... 136

FIGURE 48 : INSERTION DES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ET (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) DANS DES MONOCOUCHE DE LIPIDES PURS A UNE PRESSION INITIALE DE 30MN/M. .... 138

FIGURE 49 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), SGAL1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) ET SGAL2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) CONTRE LA CROISSANCE DE CANDIDA ALBICANS A 0,5 ET 1NMOL. .... 149

FIGURE 50 : CHROMATOGRAMME DU VENIN V234 OBTENU PAR HPLC ANALYTIQUE A 214NM. .... 157

FIGURE 51 : CHROMATOGRAMMES DU VENIN V234 ET DE SES SOUS-FRACTIONS, F17.7, F19.6, F21.8, ACTIVES OBTENUS PAR HPLC ANALYTIQUE A 214NM. ....	158
FIGURE 52 : STRUCTURE DU SAMANDARIN ET DE L'O-ACETYLSAMANDARINE (A), DE LA SAMANDARONE (B) ET DU 17A-AZA-D-HOMOANDROST-5-EN-3BETA-OL (C). ....	159
FIGURE 53 : STRUCTURE DE L'AGELASINE. ....	160
FIGURE 54 : CHROMATOGRAMMES DE LA FRACTION F2.0.3 A 280NM (A) ET 280NM (B) OBTENU PAR UPLC. ....	160
FIGURE 55 : SPECTRE DE MASSE DU PRODUIT ELUE A 2,34MIN. SPECTRE OBTENU EN MODE POSITIF (MS+) ....	161
FIGURE 56 : SPECTRE DE MASSES MS+ DU PIC A 2,56MIN DE LA FRACTION F2.0.3 DU VENIN V81. ....	161
FIGURE 57 : CHROMATOGRAMMES DE LA FRACTION F2.3 A 280NM (A) ET 280NM (B) OBTENU PAR UPLC. ....	162
FIGURE 58 : SPECTRES MS + (EN HAUT) ET MS- (EN BAS) DE LA FRACTION F2.3. ....	163
FIGURE 59 : SPECTRE DE MASSE MS/MS DE L'ION 615 DA. ....	163
FIGURE 60 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR HPLC ANALYTIQUE C18 DU VENIN V53 (EN NOIR) ET DE SA FRACTION ACTIVE, F8 (EN ROSE). ....	165
FIGURE 61 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR HPLC ANALYTIQUE C18 DU VENIN V261 (EN NOIR) ET DE SA FRACTION ACTIVE, F13 (EN ROSE). ....	166
FIGURE 62 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR HPLC ANALYTIQUE C18 DU VENIN V139 (EN NOIR) ET DE SES FRACTIONS ACTIVES, F8 ET F9 (EN ROSE ET BLEU RESPECTIVEMENT). ....	167
FIGURE 63 : TOPOLOGIE MOLECULAIRE DES SITES DE LIAISON DE DIFFERENTES TOXINES D'ORIGINE NATURELLE SUR LA SOUS-UNITE DU CANAL $Na_v$ . ....	181
FIGURE 64 : PROFIL D'EXPRESSION DES ISOFORMES DE CANAUX $Na_v$ DES CELLULES GH3B6. ....	184
FIGURE 65 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DE VTD $\pm$ TTX, TRITON ET HBSS. ....	186
FIGURE 66 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DE VENIN + VTD. ....	187
FIGURE 67 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DE VENIN + VTD. ....	188
FIGURE 68 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V114 ET DE SES FRACTIONS + VTD 10 $\mu$ M. ....	190

FIGURE 69 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V114 ET DE SES FRACTIONS ACTIVES + VTD (10 $\mu$ M). .....	191
FIGURE 70 : CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS F17 A F21 (QUANTITE ACTIVE) OBTENUES PAR HPLC ANALYTIQUES A 214NM.....	192
FIGURE 71 : COMPARAISON DES CHROMATOGRAMMES DE LA FRACTION F18 ANALYSEE AU MOYEN D'UNE COLONNE C18 (PROFIL NOIR) ET D'UNE COLONNE RP-MAB (PROFIL VERT). .....	193
FIGURE 72 : PROFIL DE FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION V114-F18 A 214NM. ....	193
FIGURE 73 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DE LA FRACTION F18 DU VENIN V114 ET DE SES SOUS-FRACTIONS + VTD 10 $\mu$ M. ....	194
FIGURE 74 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V16 NON DILUE, DILUE AU 1/10 <sup>EME</sup> ET AU 1/1000 <sup>EME</sup> AINSI QUE DE SES FRACTIONS +VTD (10 $\mu$ M). ....	195
FIGURE 75 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V16 DILUE AU 1/10 <sup>EME</sup> ET AU 1/1000 <sup>EME</sup> ET DE SES FRACTIONS ACTIVES NON DILUEES +VTD.....	196
FIGURE 76 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES FRACTIONS F16, F17, F21 ET F22 +VTD (10 $\mu$ M).....	197
FIGURE 77 : CHROMATOGRAMMES DU VENIN V16 (200 $\mu$ G – EN NOIR) ET DE LA FRACTION ACTIVE F16 (QUANTITE ACTIVE – EN VERT) OBTENUES PAR HPLC ANALYTIQUES A 214NM. ....	197
FIGURE 78 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V118 ET DE SES FRACTIONS +VTD (10 $\mu$ M).....	198
FIGURE 79 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DU VENIN V118 ET DE SES FRACTIONS ACTIVES F17, F18 ET F19 +VTD (10 $\mu$ M). ....	199
FIGURE 80 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DES FRACTIONS V118-F17, F18 ET F19 NON DILUEES ET DILUEES AU 1/10 <sup>EME</sup> , 1/100 <sup>EME</sup> ET 1/1000 <sup>EME</sup> +VTD (10 $\mu$ M). ...	199
FIGURE 81 : CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS V118-F17, F18 ET F19 OBTENUS PAR HPLC ANALYTIQUE EN PHASE INVERSE (COLONNE C18).....	200
FIGURE 82 : MESURES DE MOBILISATION DU $Ca^{2+}$ INTRACELLULAIRE DES CELLULES GH3B6 EN PRESENCE DE LA FRACTION V118-F13 TESTEE COMME ANTAGONISTE +VTD (10 $\mu$ M) ET ANTAGONISTE $\pm$ TTX(1 $\mu$ M). ....	201
FIGURE 83: PLAN D'EXPERIENCE POUR L'EVALUATION ANTIBACTERIENNE DES VENINS, DES FRACTIONS ET DES PRODUITS PURS EN MILIEU LIQUIDE ET GELOSE. ....	216
FIGURE 84 : STRUCTURE ET PROPRIETES SPECTRALES DE LA SONDE FURA-2. ....	220



---

# INDEX DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : GROUPES DE PROTEINES PRESENTS DANS DIFFERENTS VENINS D'ANIMAUX. ....	10
TABLEAU 2: HISTORIQUE DE L'INTRODUCTION ET DE L'APPROBATION DES DIFFERENTES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES <sup>103</sup> . 29	29
TABLEAU 3 : EXEMPLE DE PAMS ISSUS DE VENINS D'ANIMAUX INDUISANT UNE PERMEABILISATION MEMBRANAIRE <sup>86</sup> .57	57
TABLEAU 4 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE VENINS DECRITS DANS LA LITTERATURE PAR COMPARAISON D'UN TEST EN MILIEU LIQUIDE ET PAR DIFFUSION EN MILIEU GELOSE. ....	89
TABLEAU 5 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE VENINS INACTIFS EN MILIEU LIQUIDE, NON DECRITS DANS LA LITTERATURE, EN MILIEU SOLIDE A HAUTEUR DE 100µG. ....	89
TABLEAU 6 : MASSES GLOBALES DES DIFFERENTS ECHANTILLONS PURIFIES. ....	100
TABLEAU 7 : TABLEAU RECAPITULATIF DES MASSES DES PRODUITS GAL1, 2, 3, 4, 5 ET 6 PURS. ....	101
TABLEAU 8 : TABLEAU RECAPITULATIF DES SEQUENCES OBTENUES PAR SEQUENÇAGE N-TERMINAL. ....	102
TABLEAU 9 : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES GAL1, 2, 3, 4, 5 ET 6. ....	104
TABLEAU 10 : SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES GAL1 A GAL6. ....	106
TABLEAU 11 : MASSES ET SEQUENCES DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS GAL1, 2, 3, 4, 5 ET 6 ISOLES A PARTIR DU VENIN DE GUEPE <i>POLISTES GALLICUS</i> . ....	108
TABLEAU 12 : SEQUENCES DES PEPTIDES ISOLES A PARTIR DE VENIN DE GUEPES SOCIALES PRESENTANT UNE FORTE HOMOLOGIE AVEC CELLE DE GAL1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> ). ....	110
TABLEAU 13 : CARACTERISTIQUES DU PEPTIDE SYNTHETIQUE sGAL1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> ) ET DE SES ANALOGUES. ....	112
TABLEAU 14 : CARACTERISTIQUES DU PEPTIDE SYNTHETIQUE sGAL2(I <sub>1</sub> L <sub>17</sub> ) ET DE SES ANALOGUES. ....	112
TABLEAU 15 : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE DES PEPTIDES SYNTHETIQUES CONTRE LA CROISSANCE DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i> , <i>S. AUREUS</i> , <i>E. COLI</i> ET <i>B. SUBTILIS</i> . ....	113
TABLEAU 16 : CONCENTRATION MINIMALE HEMOLYTIQUE 50% ET 100% DES PEPTIDES SYNTHETIQUES SUR DES ERYTHROCYTES DE SANG HUMAIN ET INDICES THERAPEUTIQUES CORRESPONDANT. ....	117
TABLEAU 17 : COMPARAISON DES CMH <sub>50</sub> OBTENUES SUITE A LA MISE EN PRESENCE DES PEPTIDES SYNTHETIQUES AVEC DES HEMATIES HUMAINES ET DES HEMATIES DE MOUTON. ....	119
TABLEAU 18 : VALEURS DES PRESSIONS D'INSERTIONS MAXIMALES DES PEPTIDES sGAL1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> ), sGAL1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> ), sGAL1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> ), sGAL1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> ) ET sGAL1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> ) DANS LES DIFFERENTES MONOCOUCHEs DE LIPIDES PURS. ....	137

TABLEAU 19 : PROPORTION MOYENNE DES CARDIOLIPINES (CL), PHOSPHATIDYLGLYCEROL (POPG) ET PHOSPHATIDYL-  
ETANOLAMINE (POPE) PAR RAPPORT AUX LIPIDES TOTAUX PRESENTS DANS LES MEMBRANES CYTOPLASMIQUES D’*E.*  
*COLI*, DE *P. AERUGINOSA*, *B. SUBTILIS* ET *S. AUREUS*<sup>224,446</sup> ..... 141

TABLEAU 20 : DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE DE SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), SGAL1(K<sub>1</sub>I<sub>10</sub>),  
SGAL1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ET SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) CONTRE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES..... 144

TABLEAU 21 : CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES PEPTIDES SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), SGAL1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>),  
SGAL1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) CONTRE LA CROISSANCE DE *P. AERUGINOSA* FQR, *SARM* ET *B. SUBTILIS* NISINE R,  
AINSI QUE LEURS INDICES THERAPEUTIQUES CORRESPONDANT. .... 146

TABLEAU 22 : SEQUENCES DE SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ET DE SES ANALOGUES. .... 151

TABLEAU 23 : CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DE SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), SP-PROTONECTINE(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>),  
SP/POLYBIA-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ET SPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) CONTRE LA CROISSANCE DE *P. AERUGINOSA*, *P. AERUGINOSA* FQR, *S.*  
*AUREUS*, *SARM*, *E. COLI*, *B. SUBTILIS* ET *B. SUBTILIS* NISINE R..... 152

TABLEAU 24 : ACTIVITE HEMOLYTIQUE DE SP-PROTONECTINE(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), SP/POLYBIA-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ET SPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) EN  
COMPARAISON A SGAL1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) ET SGAL1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) SUR DES ERYTHROCYTES HUMAINS, AINSI LEUR INDICE  
THERAPEUTIQUE POUR LES DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES. CHM<sub>50</sub> ET CHM<sub>100</sub> = CONCENTRATION  
MINIMALE INDUISANT 50% ET 100% D’HEMOLYSE RESPECTIVEMENT. .... 154

TABLEAU 25 : CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES (MASSES, FORMULES BRUTES) DES MOLECULES IDENTIFIEES AU  
SEIN DES FRACTIONS F17.7, F19.6 ET F21.8 DU VENIN V234..... 158

TABLEAU 26 : DISTRIBUTION ET CLASSIFICATION DES DIFFERENTS ISOFORMES DES CANAUX N<sub>AV</sub> EN FONCTION DE LEUR  
SENSIBILITE A LA TTX. .... 178

TABLEAU 27 : TABLEAU RECAPITULATIF DES VENINS CAPABLES D’ACTIVER LES CANAUX N<sub>AV</sub>. .... 203

TABLEAU 28 : DESIGNATION ET REFERENCES DES MILIEUX POUR CULTURE BACTERIENNE. .... 214

TABLEAU 29 : SUPPLEMENTS POUR CULTURE BACTERIENNE EN MILIEU SOLIDE..... 214

TABLEAU 30 : DESIGNATION ET REFERENCES DES SOUCHES BACTERIENNES. .... 215

TABLEAU 31 : DESIGNATION ET REFERENCE DES LEVURES..... 215

TABLEAU 32 : MILIEU DE CULTURE, SUPPLEMENTS ET REACTIFS UTILISES POUR LA CULTURE DES GH3B6. .... 219

TABLEAU 33 : REACTIFS ET PROTOCOLES DE PREPARATION DES SOLUTIONS MERES CONSTITUANT LE TAMPON DE MESURE  
HBSS COMPLET. .... 221

TABLEAU 34 : REACTIFS ET PROTOCOLES DE PREPARATION DES SOLUTIONS MERES CONSTITUANT LE MIX DE CHARGE DE LA  
SONDE FURA-2AM..... 222

## INDEX DES TABLEAUX

---

TABLEAU 35 : PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	222
TABLEAU 36 : GRADIENT D'ELUTION DES PTH-AA. ....	230
TABLEAU 37 : DESIGNATION ET REFERENCES DES LIPIDES PURS BACTERIENS ET EUCARYOTES. ....	239



---

**INDEX DES ANNEXES**

---

ANNEXE 1 : SPECTRE DE MASSE DE GAL1 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	289
ANNEXE 2 : SPECTRE DE MASSE DE GAL2 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	290
ANNEXE 3 : SPECTRE DE MASSE DE GAL3 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	291
ANNEXE 4 : SPECTRE DE MASSE DE GAL4 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	292
ANNEXE 5 : SPECTRE DE MASSE DE GAL5 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	293
ANNEXE 6 : SPECTRE DE MASSE DE GAL6 OBTENU PAR MALDI TOF + ZOOM.....	294
ANNEXE 7 : SPECTRE MALDI-TOF MS/MS DE GAL1 (EN HAUT) + SPECTRE MALDI-TOF MS OBTENU APRES DIGESTION A LA GLUC (EN BAS).....	295
ANNEXE 8 : SPECTRE MALDI-TOF MS/MS DE GAL2 .....	296
ANNEXE 9 : SPECTRE MALDI-TOF MS/MS DE GAL3 (EN HAUT) + SPECTRE MALDI-TOF MS OBTENU APRES DIGESTION A LA GLUC (EN BAS).....	297
ANNEXE 10 : SPECTRE MALDI-TOF MS/MS DE GAL4 (EN HAUT) + SPECTRE MALDI-TOF MS OBTENU APRES DIGESTION A LA GLUC (EN BAS). .....	298



## PRÉAMBULE

---

### Contexte socio-économique de l'industrie pharmaceutique

Depuis 1950, la Food & Drug Administration (FDA) des Etats-Unis a approuvé la mise sur le marché de plus de 1500 médicaments <sup>1,2,FDAwebsite</sup>. En 70 ans, le rôle clé promulgué par l'industrie pharmaceutique a ainsi permis d'améliorer significativement la santé publique avec une augmentation de l'espérance de vie de 2 mois en moyenne chaque année <sup>1</sup>. Cependant, depuis le milieu des années 90s, l'industrie pharmaceutique a atteint un état de crise <sup>3</sup>.

Malgré une forte hausse des investissements dans la Recherche et le Développement (R&D), s'élevant jusqu'à 50 milliards de dollars par an, le nombre de médicaments approuvés annuellement n'est pas plus important que dans les années 1980. En effet, à la fin de cette période, plus de 60 Nouvelles Entités Moléculaires (NEMs) étaient acceptées par année <sup>4</sup>.

Si les nouvelles techniques de découvertes ont permis d'augmenter le nombre de molécules dans le portefeuille des industries pharmaceutiques, le nombre de nouvelles entités moléculaires approuvées par an stagne à 25-30. Ce bilan mitigé peut s'expliquer, entre autres, par le renforcement des procédures d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) qui a entraîné une sévère augmentation des taux d'attrition<sup>a</sup>. Ils s'élèvent à environ 70% en étude préclinique et clinique de phase II <sup>3</sup>. Associés à l'allongement des phases de R&D, le temps nécessaire à la commercialisation et le coût de développement d'un nouveau médicament ont considérablement augmenté. Ceux-ci sont passés, en moyenne, de 199 millions de dollars en 1979 à 1500 millions en 2012 <sup>5</sup>.

L'apparition de médicaments génériques et l'essoufflement des découvertes ont également contribué à un fort ralentissement de la productivité de la R&D <sup>6</sup>. La diminution des produits

---

<sup>a</sup> Taux d'échec des molécules n'ayant pas pu arriver sur le marché (nombre de molécules n'atteignant pas le marché).

d'origine naturelle dans le processus de découverte de nouveaux médicaments face à leurs homologues purement synthétiques jouerait en outre un rôle prépondérant <sup>7</sup>.

De tous temps, les produits d'origine naturelle ont été utilisés par l'Homme pour le traitement de maladies. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, ils sont encore considérés comme une source précieuse de substances médicamenteuses et ce malgré les progrès de la biologie moléculaire et de la chimie organique qui permettent la synthèse de molécules médicamenteuses sophistiquées moins onéreuses et plus efficaces <sup>8</sup>.

Dans les années 1950, 50% des médicaments sont d'origine naturelle avec notamment la mise sur le marché d'agents encore largement distribués aujourd'hui tels que des antitumoraux (Taxol, vinblastine ou doxorubicine), des immunosuppresseurs pour les transplantations d'organes (cyclosporine et rapamycine) ou des cholestérolacteurs (les statines) <sup>8,9</sup>. Néanmoins, au début des années 90, les tendances de l'industrie pharmaceutique évoluent vers le criblage à haut débit ou « High-Throughput Screening » (HTS) de banques de molécules. En raison de la pression constante sur le marché pour trouver des « blockbusters<sup>b</sup> » et éblouies par le potentiel de la chimie de synthèse combinatoire pour identifier rapidement un très grand nombre de nouveaux composés, la plupart des entreprises réduisent ou mettent fin à leurs programmes de découverte de médicaments naturels, et ce malgré le succès non prouvé de ses nouvelles approches <sup>8,9</sup>. En effet, le coût des produits naturels, la limitation des stocks, leur complexité structurelle élevée qui ralentit le processus d'identification, de purification et de caractérisation et le risque de redécouvrir des composés connus sont alors des facteurs limitant la compatibilité des sources naturelles avec le criblage HTS <sup>8,9</sup>.

Pourtant, les attentes initiales de la chimie combinatoire n'ont pas été atteintes : le nombre de nouvelles approbations de NEM diminuant chaque année et ce en dépit des investissements importants et des millions de composés synthétiques purs examinés <sup>9</sup>.

Ainsi, moins de 0,001% des molécules issues de cette chimie (chimie combinatoire associée au HTS) ont été commercialisées alors que dans la même période 0,3% des NEMs sont issues de métabolites d'origine naturelle <sup>10</sup>. Par ailleurs, bien que faiblement exploitées, les sources naturelles ont continué à produire des entités prospères, avec 19 NEMs commercialisées entre

---

<sup>b</sup> Blockbuster = Médicament générant plus d'un milliard de dollars de chiffre d'affaires

2005 et 2010 : 7 produits naturels, 10 produits naturels semi-synthétiques et 2 produits naturels dérivés <sup>9,11</sup>. Dans le même temps, la chimie combinatoire a évolué et des progrès ont été réalisés dans les domaines émergents tels que la biochimie, la catalyse enzymatiques et les biotechnologies. Les techniques de déconvolution pour la purification et de caractérisation (telles que la HPLC-MS, la RMN) de composés bioactifs à partir de mélanges se sont développées, simplifiées et ont gagné en rapidité <sup>12</sup>. L'avènement de la biologie moléculaire et la synthèse chimique associées au développement de l'informatique, la robotique et plus récemment aux nanotechnologies a permis au criblage haut débit de gagner en efficacité et en pertinence en s'axant sur les cibles humaines. Ces approches novatrices associées aux précédents échecs du marché du médicaments ont délivré des leads<sup>°</sup> dans les domaines clés tels que la cancérologie, l'immunosuppression, les anti-infectieux ou les maladies métaboliques, et ont ravivé l'intérêt pour les produits naturels comme une source de NEM <sup>7</sup>.

Malgré le vieillissement de la population et l'amélioration du niveau de vie dans les pays émergents, les besoins thérapeutiques sont élevés dans les domaines tels que l'oncologie les maladies cardio-vasculaires ou les infections rendant indispensable l'exploitation des produits d'origine naturelle. De plus, en 2008, l'OMS indiquait que 67% des pathologies recensées n'avaient pas encore de traitement suffisant. Ces données suggèrent une pérennité de la croissance du marché mondiale du médicament et l'exploitation des ressources naturelles nécessitant la protection de notre environnement (faune et flore) dans des conditions durables afin de maintenir les opportunités de découverte de nouveaux agents médicinaux et biologiques naturels <sup>6,7</sup>.

Ainsi la recherche et le développement de nouvelles structures de molécules développées à partir de sources naturelles participent aux progrès de la science moderne et de l'industrie. La Nature a été et continuera d'être une source majeure pour la découverte de nouvelles pistes structurelles et le développement efficace des médicaments dépendra de collaborations multidisciplinaires <sup>4,13</sup>. Parmi les nombreuses sources naturelles, les venins apparaissent comme ayant un fort potentiel thérapeutique. La spécificité et la stabilité des protéines et des autres composants des venins en font une source précieuse de molécules actives pour la découverte de médicaments <sup>14</sup>.

---

<sup>°</sup> Lead = Médicament « tête de série » pouvant devenir un candidat médicament (Hit modifié et caractérisé)



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

## I. Les venins : des substances complexes

### I.1. Généralités

Les venins sont des sécrétions toxiques d'animaux venimeux qui sont synthétisées et stockées dans une glande exocrine spécialisée, la glande à venin, ou dans les différents tissus du corps. Ils jouent un rôle important dans la prédation mais également comme moyen de défense contre d'éventuels agresseurs. Une faible dose de ces composés dans l'organisme d'un autre animal cause des dommages douloureux pouvant parfois conduire à la mort. Certains animaux, tels que les serpents, utilisent leur venin pour immobiliser leur proie, alors que d'autres l'utilisent pour augmenter la durée de leur alimentation <sup>15-17</sup>.

Chez les animaux venimeux dits « actifs » l'envenimation est effectuée au moyen d'un appareil inoculateur dont la localisation et l'anatomie sont variables selon les espèces. De nombreux animaux (milles-pattes, araignées, serpents) disposent de crochets au niveau buccal qui leurs permettent l'injection du venin lors de la morsure ou de la pique. Lorsque la glande venimeuse dérive d'une glande annexe du tube digestif de l'animal, la capture et l'immobilisation des proies ou agresseurs sont alors souvent accompagnées par un début de digestion des tissus. Chez les arthropodes (scorpions, hyménoptères) l'enveniment est provoqué par piqûre à l'aide d'un dard abdominal postérieur. Les poissons ont des glandes connectées à des épines/aiguillons présents au niveau des nageoires, des opercules ou des branchies. Quant aux cnidaires, animaux majoritairement aquatiques (anémones, méduses) de la famille des cnidoblastes, ils disposent de cellules venimeuses présentes sur les tentacules, qui libèrent le venin <sup>15,18</sup>.

Au contraire, l'envenimation des animaux dits « passifs » tels que les amphibiens (grenouilles, salamandres) s'effectue par contact <sup>19</sup>. Dépourvues d'appareil d'inoculation spécial, leurs glandes sont présentes à divers endroits cutanés <sup>15</sup>. Le venin pénètre alors dans l'organisme suite à une blessure ou par franchissement d'une muqueuse externe, notamment par ingestion.

Chez l'Homme, les envenimations constituent un réel problème de santé publique. Considérées comme maladies négligées par l'OMS, elles surviennent dans 99% des cas dans les pays en

développements<sup>20</sup>. Les piqûres d'arthropodes infligées par les abeilles, les guêpes, les fourmis, les araignées, les scorpions et, dans une moindre mesure, les millipèdes et les mille-pattes, représentent la cause la plus fréquente d'envenimement par les animaux. Cependant, 80% des décès par envenimation dans le monde sont causés à la suite d'une morsure de serpent<sup>21</sup>.

D'après Chippaux, il y aurait 5 à 6 millions de morsures de serpents qui se produisent chaque année, dont 2,5 millions conduisent à des cas d'envenimement, entraînant au moins 100 000 décès et environ 3 fois plus d'amputations et d'incapacités définitives. Sans compter sur les victimes non déclarées qui pourraient représenter 60% des cas<sup>20,22,23</sup>. Les scorpions, quant à eux, représentent plus de 1,2 millions de piqûres par an. Bien que seulement 30 espèces sur les 1500 référencées sont dangereuses pour l'Homme, 3000 piqûres sont fatales représentant 15% et la deuxième cause de décès par envenimation par an<sup>21,24</sup>.

Le meilleur traitement pour lutter contre une envenimation est l'application d'antivenins. Ainsi pour améliorer l'efficacité des traitements, la connaissance de la composition de ces substances toxiques est nécessaire<sup>15</sup>.

### **I.2. Composition**

Les venins sont des mixtures complexes de composés de différentes natures chimiques tous pharmacologiquement actifs<sup>25</sup>. Les toxines, responsables majeures de la toxicité du venin, sont des molécules chimiquement pures ayant une activité plus ou moins spécifique sur les systèmes biologiques<sup>16</sup>. Ce sont généralement des peptides de 3 à 6 kDa, parmi lesquels on distingue par exemple des neurotoxines, des cardiotoxines, des myotoxines, des cytotoxines ainsi que des agents hémolytiques et antiviraux ou antibactériens<sup>13,26</sup>. Outre les toxines, les venins sont composés de protéines multimériques telles que des enzymes, mais également de nucléotides, de lipides, d'amines biogènes ainsi que d'autres éléments<sup>27</sup>. La composition des venins varie, entre autres, en fonction de la classe, du genre et de l'espèce de l'animal venimeux mais également en fonction de l'environnement dans lequel il vit et de sa nutrition<sup>16,28</sup>. De plus, elle évolue au cours du temps. En effet, la composition des venins a subi des améliorations et des ajustements de manière continue pour tuer ou paralyser efficacement les proies, ou pour se défendre contre les agresseurs ou les prédateurs<sup>25,29</sup>. De par leurs virulences, les venins de serpents, scorpions, araignées mais également méduses, anémones et cônes sont parmi les plus étudiés<sup>15</sup>.

Les venins de serpents contiennent à 90-95% des molécules de haut poids moléculaire d'origine protéique<sup>30</sup>. Ils contiennent également des nucléotides et des ions inorganiques<sup>31</sup>. Ce sont des venins contenant 30 à 100 toxines qui ciblent principalement les systèmes neurovasculaire, musculaire et cardiaque<sup>31-33</sup>.

Au contraire, les venins des amphibiens et des invertébrés, majoritairement composés de molécules de faible poids moléculaire, sont bien plus complexes.

Les venins d'amphibiens, caractérisés par leur richesse en alcaloïdes, sont également constitués d'une part importante de protéines, de peptides dont des opioïdes. Ils contiennent aussi de nombreuses autres petites molécules chimiques telles que des stéroïdes, indolalkylamines, catécholamines et amines biogènes. Libérées par les glandes granulaires de la peau de manière continue, mais plus particulièrement suite à un stress ou une blessure, les sécrétions des amphibiens sont utilisées pour les défendre contre les prédateurs ou les micro-organismes. Leurs effets peuvent être faiblement nocifs à extrêmement toxiques. Elles présentent ainsi différentes activités pharmacologiques telles que cardiotoxiques, neurotoxiques, hypo et hypertensives, hémolytiques mais également antibactériennes et antivirales.

Les scorpions utilisent leur venin en faible quantité dans le but de tuer ou immobiliser leurs proies mais également de se défendre contre de possibles compétiteurs ou prédateurs. Avec plusieurs centaines de composants, les venins de scorpions sont très riches en toxines peptidiques de taille comprise entre 1 et 9 kDa dont environ 80% sont inférieures à 5 kDa<sup>34</sup>. Ces peptides majoritairement neurotoxiques interagissent spécifiquement avec différents canaux ioniques des cellules excitables<sup>27,35</sup>.

Les venins de cônes marins et d'araignées sont composés majoritairement de peptides et de molécules de faible poids moléculaire qui ciblent le système nerveux dans le but d'induire une immobilisation rapide de la proie. Les analyses protéomiques et transcriptomiques ont révélé que ces venins peuvent contenir plus de 1000 peptides distincts<sup>36,37</sup>. Avec plus de 46 600 espèces répertoriées à ce jour, les araignées constituent la plus grande proportion d'animaux venimeux<sup>14,38</sup>. D'après Escoubas et al. en 2006, chaque venin d'araignée pourrait contenir au moins 200 peptides uniques<sup>36</sup>. Si on estime à 50 000 le nombre réel d'espèces, les venins d'araignées dans leur ensemble pourraient donc contenir plus de 10 millions de peptides

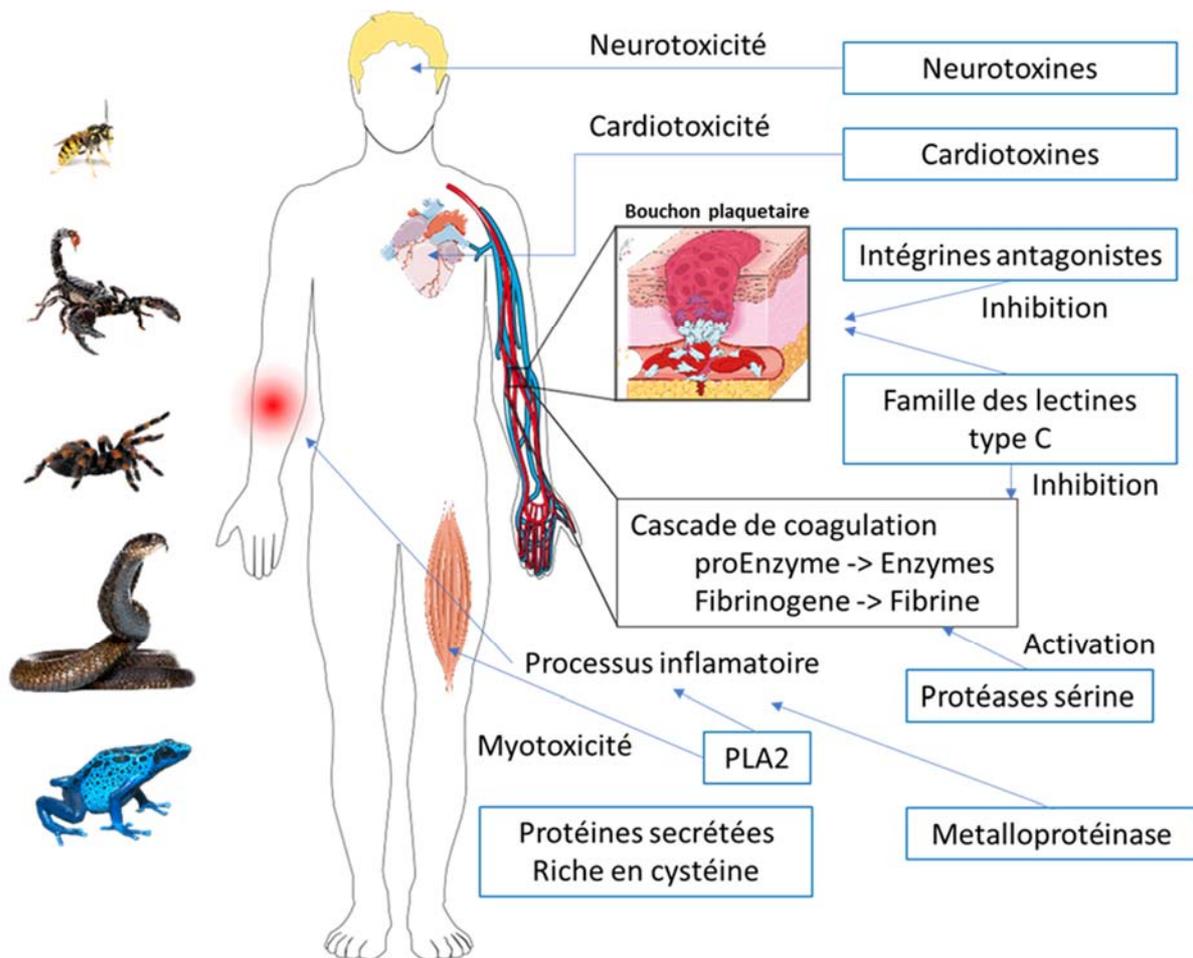
bioactifs constituant ainsi un répertoire pharmacologique bien plus important que les 100 000 peptides différents estimés présents dans les venins de scorpions et de cônes marins<sup>39</sup>.

Enfin, les venins d'insectes sont également des mixtures complexes de composés chimiques de faible poids moléculaire, d'amines, de peptides mais également de protéines de haut poids moléculaire telles que des enzymes et des allergènes. Souvent utilisé pour la capture et la conservation des proies chez les insectes solitaires, il devient également un moyen répulsif ou défensif pour protéger les colonies chez les insectes sociaux<sup>40,41</sup>. Ainsi, l'acide formique, principal composant des venins de fourmis, ou les phénols et quinones des coléoptères sont des substances organiques irritantes utilisées comme répulsif<sup>42</sup>. Le venin participe également à la communication chimique des insectes entre eux puisqu'il contient des phéromones alarmes et sexuels. Parmi les composés de faible poids moléculaire, on distingue également les amines biogènes telles que la sérotonine, l'histamine, la tyramine, la dopamine qui participent à la sensation de douleur<sup>40,41</sup>. Les composés de poids moléculaire modéré (entre 900 Da et 3 kDa) sont principalement des peptides à activités hémolytiques, antibactériennes, neurotoxiques ou kinin-like. Enfin, parmi les protéines on distingue les phospholipases A et B. Les premières sont responsables du caractère allergénique du venin tandis que les secondes contribuent en plus à l'immobilisation des proies et/ou des ennemis. Il y a également des hyaluronidases qui favorisent la pénétration du venin dans les tissus<sup>27,40,41</sup>.

### **I.3. Effets biologiques**

Les venins sont des substances toxiques qui induisent différents effets biologiques pouvant parfois aboutir à la mort.

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la physiopathologie de l'envenimation dont les manifestations cliniques dépendent non seulement de la toxicité intrinsèque du venin mais également de la quantité injectée<sup>31,43</sup>. La plupart des venins étant délivrés de manière parentérale, ils agissent sur les principales voies physiologiques ainsi que les différents types de tissus accessibles par le système sanguin (**Figure 1**)<sup>44</sup>.



**Figure 1 : Les effets biologiques des animaux venimeux au cours du processus d'envenimation, modifié d'après de Lima et al.<sup>30</sup>.**

Comme nous l'avons vu précédemment, la complexité et la variabilité des venins inter et intra-espèces rendent difficile la description précise de l'action des venins. Pourtant, malgré la diversité extraordinaire des venins, plusieurs groupes de protéines leurs sont communs (**Tableau 1**). Les principaux agents toxiques qu'ils contiennent peuvent ainsi être classés selon leurs effets physiologiques. Ce sera donc une description généralisée de l'action des venins qui sera ici énoncée. Ainsi, de manière générale, la nocuité des venins est liée à leur action sur le système nerveux, cardiovasculaire et/ou musculaire, ainsi qu'aux lésions cellulaires et aux troubles de l'hémostase qu'ils induisent<sup>44,45</sup>.

**Tableau 1 : Groupes de protéines présents dans différents venins d'animaux.**

	CAP	Cys	Def	Hya	Kun	Lec	Lip	PS1	PLA <sub>2</sub>
<b>Céphalopodes</b>	X			X				X	X
<b>Cnidaires</b>					X				X
<b>Cônes marins</b>	X				X				
<b>Insectes</b>	X	X		X	X	X	X	X	X
<b>Scorpions</b>	X		X	X	X				X
<b>Araignées</b>	X			X	X				
<b>Reptiles</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X

CAP = CRISP (Cysteine Rich Secretory Proteins), Antigène 5 et Pathogenesis-related (PR-1) protéines ; Cys = cystatine ; Def = défensines ; Hya = hyaluronidase ; Kun = Kunitz ; Lec = Lectine ; Lip = Lipocaline ; PS1 = peptidase S1 et PLA<sub>2</sub> = Phospholipase A<sub>2</sub>, modifié d'après Fry et al., 2009<sup>44</sup>.

### I.3.1. Activité sur le système nerveux

Les neurotoxines sont des peptides qui agissent sur le système nerveux en bloquant ou modifiant l'activité des protéines membranaires présentes au niveau des neurones telles que les canaux ioniques (**Figure 2**). Principaux composants des venins de scorpions, d'araignées et de cônes marins, ils sont présents chez de nombreux animaux (serpents, hyménoptères, poissons).

Les neurotoxines exercent leur effet par action directe sur les canaux ioniques et les récepteurs des membranes cellulaires, modifiant ainsi la transmission synaptique. Au sein des cellules excitables, les signaux électriques ont une influence importante dans le métabolisme et la transduction du signal ainsi que sur l'expression des gènes, la synthèse, le ciblage et la dégradation des protéines. Lors d'une envenimation, la polarisation ou la dépolarisation induite par les polypeptides sur les canaux ioniques et les récepteurs des cellules excitables modifie la transduction du signal. Cela entraîne la libération de neurotransmetteurs qui affectent les fonctions neuromusculaires<sup>43,46</sup>. Un certain nombre de toxines d'animaux marins, d'arthropodes, d'amphibiens et de certains venins de serpents provoquent des symptômes neuromusculaires par des effets sur les canaux ioniques<sup>43</sup>. L'engourdissement, les crampes, l'ataxie ou la paralysie accompagnée de troubles respiratoires et cardiaques en sont des symptômes fréquents<sup>43,47</sup>.

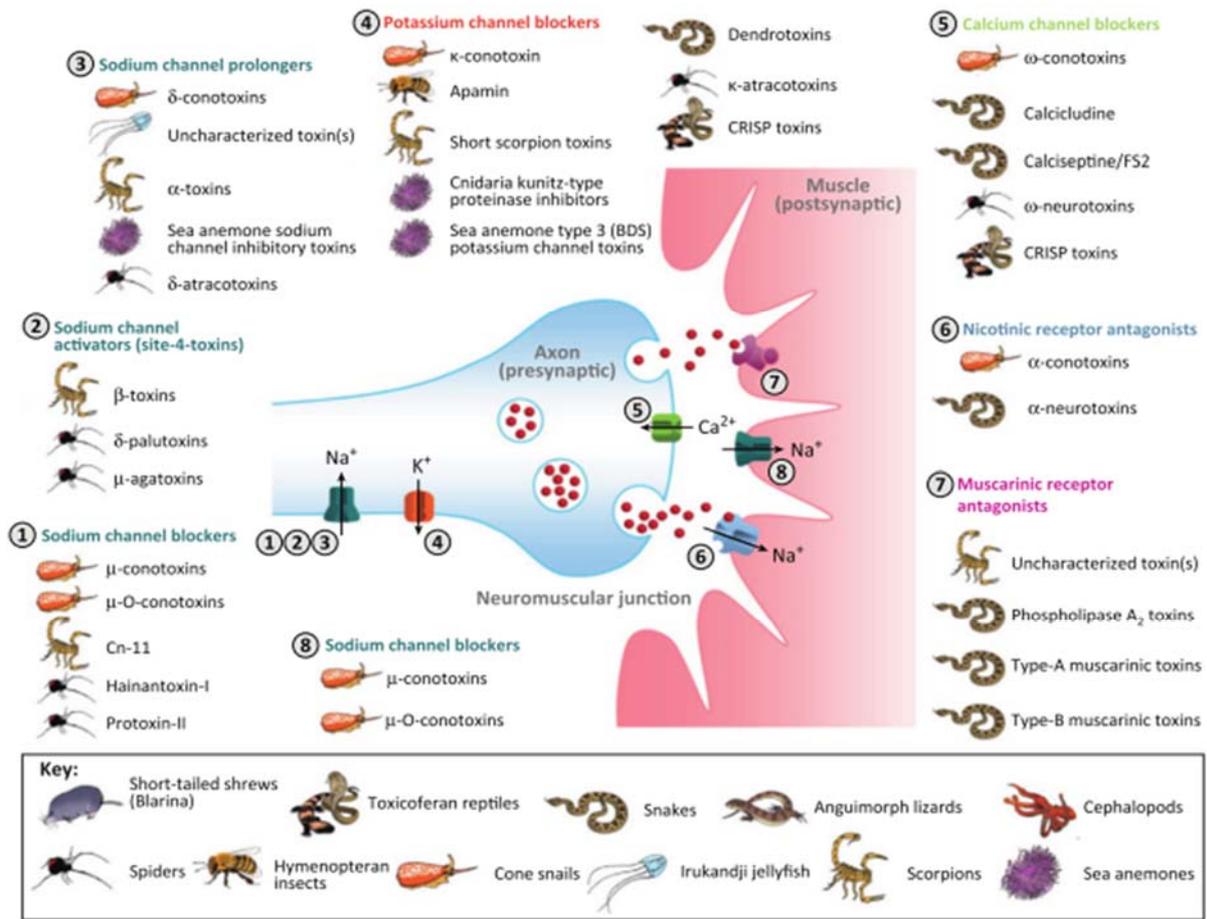


Figure 2 : Exemple de molécules issues de différents venins d'animaux agissant sur le système nerveux <sup>29</sup>.

Les neurotoxines pré-synaptiques qui bloquent les canaux sodiques (en 1) et calciques (en 5) diminuent ou empêchent la libération d'acétylcholine (ACh) produisant ainsi une faiblesse ou une paralysie musculaire. Au contraire, celles qui activent les canaux sodiques (en 2, 3) et potassiques (en 4) favorisent la libération d'ACh au niveau de la fente synaptique. La « surstimulation » des récepteurs post-synaptiques entraîne une forte dépolarisation de la membrane, pouvant conduire à des fibrillations musculaires et la paralysie. Les neurotoxines post-synaptiques agissent au niveau 6, 7, 8 comme des antagonistes aux sites de fixation de l'ACh de manière quasi-irréversible. L'ACh présent dans la fente synaptique ne pouvant se fixer aux récepteurs, la contraction musculaire n'a pas lieu. Cette fixation quasi-irréversible bloque l'influx nerveux et induit une paralysie.

La paralysie conduit généralement au décès par arrêt du système respiratoire, par asphyxie <sup>48</sup>.

### I.3.2. Activité sur l'hémostase

Par ailleurs, de nombreuses toxines, principalement des enzymes, induisent des troubles de l'hémostase<sup>27</sup>. L'**hémostase** englobe les processus physiologiques de coagulation sanguine, d'activation plaquettaire et de réparation vasculaire qui contribuent à la prévention et à l'arrêt des saignements. Le système hémostatique permet donc à un organisme de colmater les vaisseaux sanguins endommagés, de garder le sang à l'état liquide et d'éliminer les caillots sanguins après la restauration de l'intégrité vasculaire. Les principaux contributeurs à l'hémostase sont le système de coagulation et d'activation des plaquettes. Cette dernière contribue à la formation d'un « clou plaquettaire », mais accélère également le système de coagulation permettant la formation et la solidification d'un caillot sanguin. La coagulation et l'activation des plaquettes sont ensuite désactivées par des inhibiteurs sanguins. Finalement, la fibrinolyse permet la reperméabilisation du vaisseau par dissolution du caillot formé quelques jours auparavant<sup>23,49</sup>.

Ces protéines vénomiques affectent le processus de l'hémostase en perturbant l'endothélium, en activant ou en inhibant les facteurs coagulants ou plaquettaires et en agissant au niveau des mécanismes physiologiques de régulation<sup>50</sup>. Les venins de serpents sont les plus riches en protéines hémostatiques, surtout ceux de *Viperidae*, qui interfèrent avec l'ensemble des mécanismes de coagulation. Tandis que d'autres venins ne vont agir que sur une seule étape<sup>23,44</sup>. Ce sont, pour la plupart, des enzymes nécrosantes, procoagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques. Bien que sur l'hémostase, elles aient une action complexe, multifactorielle et variable d'une espèce à l'autre, ces protéines peuvent être classées en 4 groupes suivant leur action<sup>51,52</sup>.

#### I.3.2.1. *Action vasculaire*

Les **hémorragines agissent sur l'endothélium vasculaire**. Ce sont majoritairement des métalloprotéases (MPs), qui détruisent les membranes basales de l'endothélium capillaire, conduisant à une extravasion<sup>a</sup> sanguine à travers les pores formés dans les cellules endothéliales<sup>30,52</sup>. Ces processus sont responsables d'hémorragies aussi bien locales que systémiques qui

---

<sup>a</sup> Passage anormal d'un liquide de son canal adducteur vers les tissus environnants, soit par rupture du canal, soit par diffusion.

peuvent dans les cas les plus bénins se manifester par des œdèmes ou des rougeurs inflammatoires ou dans les cas les plus grave par une nécrose des tissus adjacents <sup>51</sup>.

### *1.3.2.2. Action plaquettaire*

De nombreuses protéines perturbent l'hémostase primaire en **inhibant ou activant l'agrégation plaquettaire** dont la résultante est un risque hémorragique.

L'inhibition de l'agrégation plaquettaire réduit l'activité des plaquettes. Elle est réalisée par des désintégrines qui bloquent les intégrines exprimées par les plaquettes empêchant ainsi la liaison entre le fibrinogène et son récepteur plaquettaire. Les PhosphoLipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ont également une activité antiplaquettaire en altérant le cytosquelette des plaquettes. Cependant, la plupart des PLA<sub>2</sub> présentent au contraire une activité proplaquettaire. Elles hydrolysent des phospholipides membranaires qui libèrent l'acide arachidonique, précurseur de l'activation des plaquettes. De même, de nombreuses sérine-protéases (SPs) stimulent l'agrégation plaquettaire conduisant à une thombopénie<sup>b</sup> <sup>23,30,51,52</sup>.

Ces deux activités peuvent coexister dans un même venin comme c'est le cas chez le serpent *Echis carinatus* où l'échistatine inhibe l'agrégation plaquettaire alors que l'écarine est un agoniste plaquettaire <sup>51</sup>.

### *1.3.2.3. Action sur la coagulation*

Les PLA<sub>2</sub> ont également une **activité anticoagulante**, de même que certaines SPs ou MPs. Elles provoquent des diathèses hémorragiques ou coagulopathie<sup>c</sup> par action à différents niveaux de la cascade de la coagulation sanguine (hémostase secondaire) <sup>25,50,51</sup>.

L'**activité coagulante** est également majoritairement liée à l'action de protéases. Les agents procoagulants possèdent des propriétés analogues à l'un des facteurs de la coagulation dont ils se substituent. Lorsque le processus de coagulation est activé, il persiste jusqu'à consommation totale d'un ou plusieurs facteurs de coagulation conduisant à un syndrome hémorragique, le plus souvent dû à une afibrinogénémie<sup>d</sup>. La majorité des enzymes procoagulantes interagissent

---

<sup>b</sup> Diminution du taux de plaquettes dans le sang.

<sup>c</sup> Pathologie provoquée par un trouble de la coagulation sanguine.

<sup>d</sup> Pathologie caractérisée par un déficit constitutionnel (absence complète) en fibrinogène.

avec la partie terminale de la cascade hémostatique. Elles catalysent la fibrine en fibrinogène ou agissent comme activateur de prothrombine, de facteurs X et/ou V <sup>51,52</sup>. De nombreuses SPs agissent comme procoagulant. Elles diminuent le temps de coagulation sanguine en activant des facteurs de l'hémostasie <sup>25</sup>.

L'ensemble des actions sur la coagulation se traduit souvent par un syndrome hémorragique agressif dont l'évolution peut être fatale <sup>23</sup>.

### 1.3.2.4. Action fibrinolytique

D'autre part, la plupart des protéases de venins, SPs et MPs, agissent également au niveau de la régulation de l'hémostasie (**fibrinolyse**). Ces protéases (MPs et certaines SPs) peuvent être à la fois fibrinogènes (coagulant) et fibrinolytiques (anti-coagulant). Cependant, la plupart des SPs n'ont qu'une activité fibrinolytique. Un venin peut ainsi agir comme coagulant ou anti-coagulant. L'effet final d'un tel venin ou d'une telle protéase sur la circulation sanguine dépendra de la concentration utilisée <sup>25,51,53</sup>. Associées aux hémorragines, les enzymes fibrinolytiques peuvent être à l'origine de graves hémorragies <sup>52</sup>.

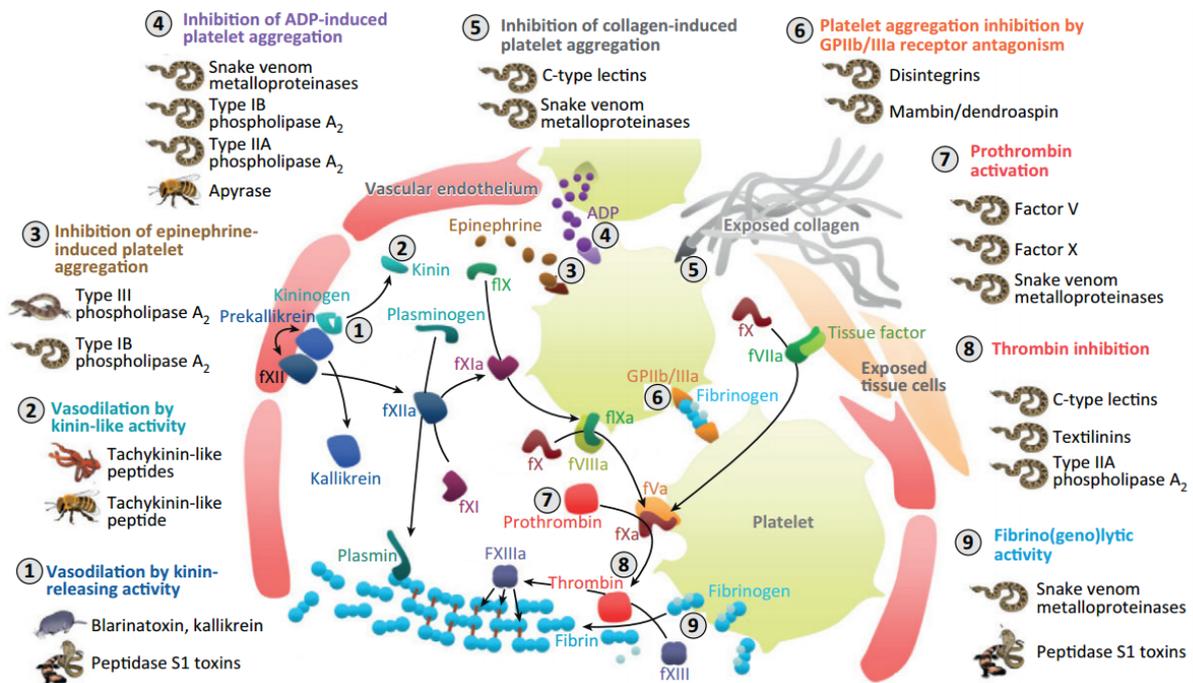


Figure 3 : Exemple de molécules isolées à partir de venins d'animaux agissant à différentes étapes de l'hémostasie <sup>29</sup>.

Ainsi, les enzymes de venin de serpent, par leurs effets sur la cascade de coagulation sanguine, les plaquettes et l'endothélium vasculaire, entraînent une diathèse hémorragique et une coagulation intravasculaire disséminée. Les piqûres d'abeilles et les morsures d'araignées peuvent également provoquer une coagulation intravasculaire disséminée<sup>43,54,55</sup>.

### I.3.3. Activité cytotoxique

Au niveau cellulaire, de nombreuses toxines peptidiques de venins de serpents, scorpions et autres arthropodes ont un effet cytotoxique et hémolytique en formant des pores dans les membranes cellulaires<sup>16,45,56</sup>. Ces venins contiennent également un nombre importants d'enzymes nécrosantes<sup>51</sup>.

Le noyau hydrophobe des cytotoxines représente le principal motif de liaison à la membrane et, lors de la liaison, elles produisent des défauts structurels dans les bicouches lipidiques qui débouchent sur la formation de pores. Les cytotoxines présentent une activité contre différents types cellulaires. Leurs actions contre les érythrocytes induit une hémolyse. Les myotoxines agissent contre les cellules musculaires et peuvent induire des nécroses. De même, au niveau des cellules cutanées. Quant aux cardiotoxines, elles altèrent les cellules cardiaques suite à la dépolarisation des cardiomyocytes<sup>45</sup>.

Les enzymes, notamment les PLA<sub>2</sub> et les protéases telles que les MPs, causent également d'importants dégâts cellulaires. Ceux provoqués par l'action de PLA<sub>2</sub> conduisent à l'hémolyse, la rhabdomyolyse<sup>e</sup>, la nécrose endothéliale, l'acidose tubulaire rénale et des dommages neuronaux<sup>43,45</sup>. Au niveau cellulaire, les MPs causent la destruction du cytosquelette, la perturbation de l'adhésion cellulaire et une nécrose<sup>43</sup>. Elles ont des activités apoptotique et pro-inflammatoire<sup>25</sup>

Par ailleurs, la plupart des venins sont composés de molécules non toxiques qui vont potentialiser les effets du venin, telles que les hyaluronidases<sup>57-59</sup>.

En effet, les hyaluronidases sont des glycosidases, enzymes endogènes non-toxiques présentent dans de nombreux venins qui agissent comme facteurs de diffusion. En dégradant l'acide hyaluronique des Matrices ExtraCellulaires (MECs), elles améliorent la perméabilité des tissus

---

<sup>e</sup> La rhabdomyolyse désigne une destruction du tissu musculaire squelettique (muscles à commande volontaire) qui entraîne la libération de myoglobine, protéine musculaire toxique, dans la circulation générale.

permettant une meilleure propagation des toxines et des facteurs hémostatiques. Impliquées dans la progression du cycle cellulaire, les processus de vieillissement et l'apoptose, localement, elles participent également à la nécrose tissulaire<sup>56,60</sup>. Par ailleurs, au niveau systémique, elles contribuent à l'inflammation. En effet, chez certains venins d'arthropodes elles ont été décrites comme allergènes capables d'induire de graves chocs anaphylactiques<sup>59,61,62</sup>.

#### I.3.4. Activité inflammatoire

Les venins comportent également des substances pro-inflammatoires responsables de réactions locales et systémiques<sup>27</sup>. L'inflammation<sup>f</sup> est liée aux altérations fonctionnelles des micro-vaisseaux, entraînant l'accumulation de fluides et de leucocytes dans les tissus extravasculaires et la douleur locale<sup>63</sup>.

De manière indirecte, les réactions inflammatoires sont principalement liées à l'action des PLA<sub>2</sub> et des MPs mais également des toxines/enzymes qui augmentent la perméabilité vasculaire. L'augmentation de perméabilisation vasculaire entraîne une diminution de la pression sanguine. Des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs vasoactifs sont alors libérés, jouant un rôle dans la pathogenèse d'œdèmes.

Les PLA<sub>2</sub> et MPs peuvent aussi déclencher le processus inflammatoire avec la production de molécules d'adhésion<sup>g</sup>, de molécules du complément<sup>h</sup>, de protéines de phase aigüe<sup>i</sup>, de radicaux libres et une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la viscosité sanguine<sup>43,63</sup>.

Par ailleurs, En plus de la nécrose tissulaire locale et de la diffusion améliorée du venin, les hyaluronidases du venin contribuent également à l'inflammation. En effet, chez certains venins d'arthropodes elles ont été décrites comme allergènes capables d'induire de graves chocs anaphylactiques<sup>61,62</sup>.

---

<sup>f</sup> L'inflammation est la réaction protectrice des tissus aux blessures qui favorise la cicatrisation et la reconstitution de la fonction normale des tissus endommagés. Ce processus implique des altérations fonctionnelles des micro-vaisseaux, entraînant l'accumulation de fluides et de leucocytes dans les tissus extravasculaires et la douleur locale. Une caractéristique majeure de l'inflammation est que la réponse aux blessures est une réaction stéréotypée, c'est-à-dire que tout type de blessure évoque une réaction similaire de l'organisme indépendamment de la cause.

<sup>g</sup> Stimulent la libération d'autres médiateurs de l'inflammation.

<sup>h</sup> Stimulent l'inflammation.

<sup>i</sup> Protéines synthétisées par le foie dont la production est stimulée ou inhibée en réponse à une inflammation.

Les réactions inflammatoires locales incluent la douleur, un œdème et des rougeurs. Des modifications hémodynamiques peuvent survenir si le processus est grave. Les réactions immunologiques se manifestent habituellement sous la forme d'une réponse allergique telles que des éruptions cutanées ou des œdèmes. Dans les cas les plus graves, des anaphylaxies avec des symptômes respiratoires et cardiaques peuvent également survenir <sup>43,63</sup>.

### I.3.5. Activité sur le système cardiovasculaire

La plupart des venins présentent également un effet sur la vasomotricité. Certaines toxines affectent directement ou indirectement, la pression et le débit sanguin. PLA<sub>2</sub>, MPs et d'autres enzymes produisent un effet hypotensif, alors que les neurotoxines induisent un effet hypertensif <sup>64</sup>.

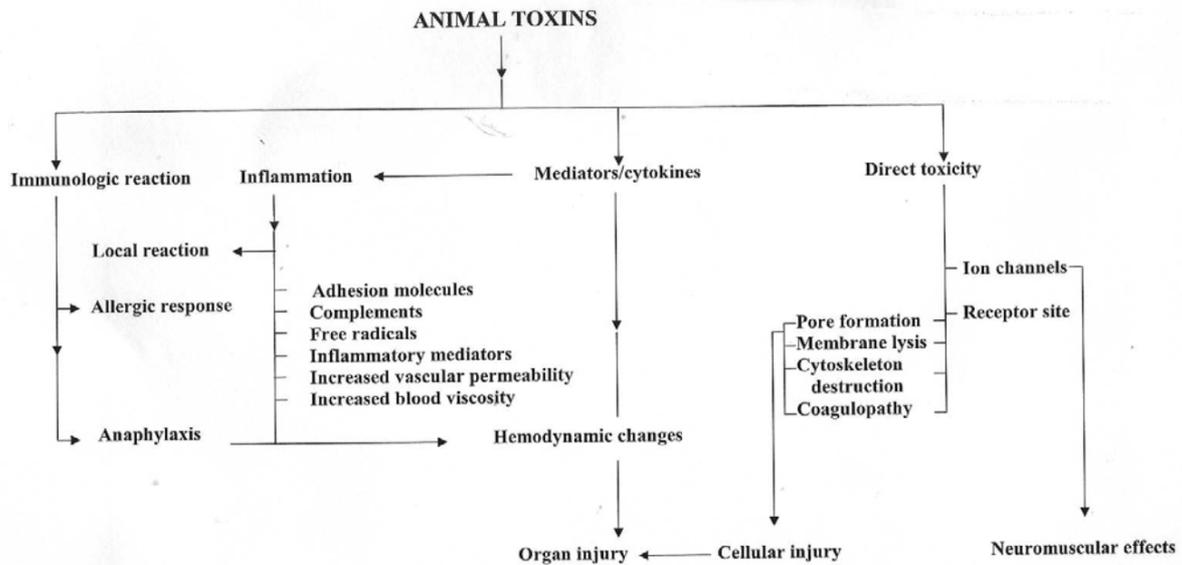
Dans la plupart des cas, les modifications hémodynamiques<sup>j</sup> sont causées par des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs vasoactifs. En effet, de manière indirecte, les enzymes et principalement les PLA<sub>2</sub>s et les MPs, induisent la libération de médiateurs vasoactifs et de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent conduire à des altérations hémodynamiques et causer des lésions aux organes. Les symptômes cardiovasculaires sont ainsi communs <sup>43,56,65,66</sup>.

De l'hypotension peut être observée, ainsi que de l'hypertension transitoire, suite à une piqûre de méduse, d'araignée, de scorpion ou de serpent <sup>27,43</sup>.

Par ailleurs, certains venins contiennent des toxines qui agissent sur le système cardiovasculaire comme de puissants vasodilatateurs ou vasoconstricteurs <sup>23,27</sup>.

---

<sup>j</sup> Les modifications hémodynamiques sont liées entre autres à la viscosité du sang et le diamètre des vaisseaux → influent sur le débit et la pression.



**Figure 4 : Physiopathologie de l’empoisonnement et de l’envenimation aux toxines animales <sup>43</sup>.**

Les venins sont des substances toxiques utilisées par les animaux pour se défendre et/ou se nourrir. Ce sont des substances complexes riches en toxines dont l’activité est le plus souvent dirigée contre plusieurs cibles physiologiques. La richesse et la complexité moléculaire des venins est d’autant plus importante qu’une même molécule peut porter différentes activités.

Ainsi, de par la multiplicité des cibles des constituants d’un même venin, l’antivenin, dont les composants sont dirigés contre l’ensemble des molécules protéiques d’un venin concerné, reste la thérapeutique la plus efficace contre les envenimations <sup>51</sup>.

Compte tenu de la variété d’animaux venimeux et de la richesse de leurs venins, ces derniers sont des outils précieux non seulement pour l’étude et la compréhension des réactions locales et systémiques qui se produisent lors des envenimations, mais, ces composants purifiés pourraient servir de modèles pour le développement de nouveaux médicaments <sup>17</sup>.

## II. Les venins : sources de molécules thérapeutiques

Les venins ont certes des effets néfastes mais ils ont également depuis longtemps été utilisés dans la médecine pour leur pouvoir guérisseur.

### II.1. Utilisation ancestrale

L'utilisation de venins et de toxines comme application médicale est connue des Hommes et des peuples autochtones depuis des siècles. Elle a été mentionnée dans la médecine traditionnelle (Ayurveda) et homéopathique indienne, chinoise et grecque<sup>67,68</sup>. D'ailleurs, depuis 1222, l'emblème de la pharmacie est toujours constitué d'un verre de vin enroulé d'un serpent.

Les venins d'insectes, et autres arthropodes, étaient ainsi employés dans les médecines traditionnelles chinoises et coréennes ainsi que dans les civilisations d'Égypte et de la Grèce anciennes depuis 1000 à 3000 ans avant JC pour contrôler plusieurs maladies dont notamment les troubles neurologiques<sup>69-71</sup>. Ceux de serpents ont été utilisés dans la médecine Ayurvédique<sup>k</sup> depuis le septième siècle avant JC pour prolonger la vie et traiter l'arthrite et les maladies gastro-intestinales<sup>67</sup>. Depuis plus de 2000 ans, le venin de *Buthus martensii Karsch*<sup>l</sup> sert à traiter différentes affections décrites dans la pratique médicale traditionnelle chinoise telles que l'apoplexie, l'épilepsie, les polyarthrites rhumatoïdes et les douleurs chroniques<sup>16,72</sup>. Quant aux sécrétions issues de peau de crapauds et de grenouilles séchées (Chan Su<sup>m</sup>), elles ont été utilisées dans la médecine Chinoise traditionnelle pendant plus de 1000 ans comme agents diurétiques, anesthésiques et anti-cancéreux<sup>73</sup>. De même, les thérapies à base de venin d'abeille ont été employées pour guérir les arthrites rhumatoïdes depuis des siècles<sup>69</sup>. Dans la médecine traditionnelle des populations indigènes de Mexico et d'Amérique du Sud, les tarentules servent à soigner une variété de maladies allant de l'asthme aux cancers<sup>74</sup>. Enfin, le venin de cobra traite depuis les années 1930s divers états infectieux tels que l'asthme, la polio, la sclérose en

---

<sup>k</sup> Médecine issue de la tradition indienne. Elle est considérée comme la plus ancienne médecine holistique du monde.

<sup>l</sup> Ce scorpion présent en Asie est non mortel pour l'Homme. Il utilise son venin pour se défendre et chasser.

<sup>m</sup> Médecine Chinoise traditionnelle préparée à partir des sécrétions auriculaires blanches et des glandes de peau séchées de grenouille.

plaque, les rhumatismes ou les douleurs extrêmes<sup>30</sup>. Quant aux venins d'araignée, d'abeille et de serpent, ils sont habituellement utilisés dans la médecine homéopathique<sup>67,68</sup>.

Ainsi, l'utilisation de venins et de toxines animales dans la médecine populaire ethnique est à la base de la recherche moderne<sup>16</sup>. Cependant, l'ère moderne de découverte de médicaments à partir de venins n'a pas commencé avant les années 1970s avec le développement du blockbuster antihypertensif, le captopril. Ce médicament est formulé à partir d'un inhibiteur d'acétylcholine découvert dans le venin de la vipère brésilienne *Bothrops Jaracaca*<sup>75,76</sup>.

Bien que le captopril a mis en exergue les venins d'animaux comme étant une source prometteuse de nouveaux médicaments, le pipeline des NEMs issues de venins est resté relativement rare (jusqu'à la fin des années 1990). D'une part, les animaux venimeux sont difficiles à acquérir et à maintenir dans les conditions de laboratoire. D'autre part, beaucoup sont petits et produisent de faibles quantités de venin. Par ailleurs, les techniques analytiques disponibles pour la caractérisation des composants du venin dans les années 1980 et 1990 étaient relativement primitives limitant la découverte de médicaments basée sur ces substances. Toutefois, les progrès technologiques récents qui facilitent le criblage à haut débit des venins ainsi que la caractérisation structurelle et fonctionnelle de leurs composants ont fortement contribué à l'identification de nouveaux principes actifs naturels<sup>14</sup>.

## **II.2. Potentiel thérapeutique actuel**

Utilisé autrefois dans leur globalité, les venins sont aujourd'hui étudiés à l'échelle moléculaire afin de comprendre l'action de chacun de leurs composés et d'en extraire les bienfaits thérapeutiques spécifiques recherchés.

En raison de leurs potentialités variées et de leurs actions hautement spécifiques, les constituants des venins sont largement exploités dans la recherche fondamentale en physiologie, biochimie et immunologie. L'étude de ses molécules a contribué à développer notre connaissance en analysant les différentes étapes de processus biochimiques et cellulaires complexes. Les venins de plusieurs espèces animales telles que les serpents, les scorpions, les amphibiens et leurs composants actifs ont ainsi montré des applications biotechnologiques potentielles en tant qu'agents pharmaceutiques, réactifs de diagnostic ou outils de préparation<sup>16,51</sup>. Par exemple, les composés des venins altérant l'hémodynamique et les fonctions cardiovasculaires, ceux de serpents en particuliers, ont contribué au développement d'outils de

diagnostiques largement utilisés en hémostase. Ils servent également de modèles ou d'outils moléculaires dans le développement de médicaments cardiovasculaires<sup>32,51</sup>. En tant qu'agents antithrombotiques ou thrombolytiques, hypotensifs/vasoactifs, antiagrégants plaquettaire ou pour diminuer les concentrations de fibrinogène dans le sang par exemple<sup>51,77</sup>. De même, les toxines ciblant le système neuromusculaire ont un potentiel d'intérêt élevé pour le traitement de maladies neurologiques. Certaines toxines agissant sur les canaux sodium voltage-dépendant présentent des effets antinociceptifs<sup>n</sup>, qui pourraient être intéressants dans le cas de symptômes neurologiques tels que l'hyperalgésie ou l'allodynie. D'autres bloquent les canaux potassiques et amélioreraient les fonctions neurologiques des patients atteints de sclérose en plaque en restaurant la conduction des neurones démyélinisés. Les toxines agissant sur la perméabilité ionique des membranes nerveuses sont ainsi très recherchées<sup>56,78</sup>. Quant aux composés cytotoxiques ou qui interfèrent avec l'adhésion cellulaire, ils induisent la mort des cellules ou répriment leur croissance. Ce sont donc de potentiels agents anticancéreux<sup>16</sup>.

Aujourd'hui, sept médicaments issus de peptides de venins ont été approuvés par la FDA pour traiter des affections allant de la douleur chronique, au diabète en passant par les maladies cardiaques. Une dizaine étaient en essais-clinique en 2011 et encore plus en tests pré-cliniques<sup>79</sup>.

Ainsi, depuis l'Antiquité, de nombreux extraits, de baumes et de décoctions préparés à partir de venins d'animaux sont utilisés dans la médecine traditionnelle à travers le monde. Depuis la fin des années 1990, les avancées technologiques permettent l'étude et la compréhension des réactions locales et systémiques qui se produisent lors des envenimations. Les composants des venins ont également été utilisés comme outils de diagnostics et pour la compréhension de systèmes physiologiques humains. Aujourd'hui, les composants des venins sont isolés dans le but de caractériser leurs propriétés et leur potentiel biochimique<sup>13</sup>. Comme nous l'avons dit précédemment, l'étude des venins est essentielle pour la production de sérum antivenin et de traitements contre l'envenimation, mais en comprenant l'action de chacune des molécules qui compose un venin il est aujourd'hui possible d'en tirer des bénéfices pour l'identification de nouvelles sources thérapeutiques.

---

<sup>n</sup> Qui inhibe la nociception, la sensibilité à la douleur.



---

## - PARTIE A-

# Les venins : de nouvelles sources d'antibiotiques

---

<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>25</b>
<b>I. LES INFECTIONS BACTERIENNES .....</b>	<b>25</b>
<b>II. DE L'AVENEMENT DES ANTIBIOTIQUES A LA RESISTANCE BACTERIENNE .....</b>	<b>28</b>
<b>II.1. L'AVENEMENT DES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2. MODES D' ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>30</b>
<b>II.3. LE DECLIN.....</b>	<b>31</b>
<b>II.4. L'EMERGENCE DES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>33</b>
<b>II.5. MECANISMES D' ACTION DE LA RESISTANCE ANTIBACTERIENNE .....</b>	<b>36</b>
<b>III. DECOUVERTE D' AGENTS ANTIBACTERIENS INNOVANTS : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>45</b>
<b>III.1. LA DECOUVERTE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>46</b>
<b>III.2. ROLE BIOLOGIQUE, STRUCTURE ET DIVERSITE DES PAMs.....</b>	<b>47</b>
<b>III.3. CLASSIFICATION .....</b>	<b>48</b>
<b>III.4. CARACTERISTIQUES QUI AFFECTENT L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....</b>	<b>50</b>
<b>III.5. MODE D' ACTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....</b>	<b>53</b>
<b>III.6. MECANISMES DE RESISTANCE AUX PAMs .....</b>	<b>63</b>
<b>III.7. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES PAMs .....</b>	<b>77</b>
<b>CHAPITRE II : RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>I. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE VENINS D' ANIMAUX.....</b>	<b>85</b>
<b>I.1. CRIBLAGE DES VENINS EN MILIEU LIQUIDE.....</b>	<b>85</b>
<b>I.2. CRIBLAGE EN MILIEU SOLIDE.....</b>	<b>88</b>
<b>I.3. COMPARAISON DES METHODES DE CRIBLAGE .....</b>	<b>90</b>
<b>II. IDENTIFICATION DES MOLECULES ANTIBACTERIENNES DU VENIN DE POLISTES GALLICUS.....</b>	<b>93</b>
<b>II.1. TESTS DES FRACTIONS .....</b>	<b>96</b>
<b>II.2. TESTS DES SOUS- FRACTIONS .....</b>	<b>97</b>
<b>II.3. TESTS DES PRODUITS PURIFIES .....</b>	<b>99</b>
<b>III. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES ANTIBACTERIENNES .....</b>	<b>100</b>

III.1.	SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF.....	100
III.2.	SEQUENÇAGE.....	102
III.3.	ANALYSE EN ACIDES AMINES .....	104
III.4.	ANALYSE MS/MS .....	104
III.5.	COMPARAISON AVEC LA LITTERATURE .....	107
IV.	CARACTERISATIONS PHARMACOLOGIQUES.....	111
IV.1.	ETUDE PRELIMINAIRE DE RELATION STRUCTURE/ACTIVITE A L'AIDE D'ANALOGUES DE SYNTHESE	111
V.	AUTRES FRACTIONS BIOACTIVES ISOLEES A PARTIR DE VENINS EN COURS D'IDENTIFICATION ET CARACTERISATION ...	
	.....	156
V.1.	ETUDE DE V234.....	156
V.2.	ETUDE DE V81.....	160
V.3.	ETUDE DE V53.....	165
V.4.	ETUDE DE V261.....	166
V.5.	ETUDE DE V139.....	167
	<b>CHAPITRE III : CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>169</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>241</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>289</b>

## CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### I. Les infections bactériennes

Les bactéries sont des micro-organismes ubiquitaires qui sont présentes dans tous les biotopes terrestre. Elles vivent en symbiose avec tous les êtres vivants dont elles affectent le développement, le métabolisme, la reproduction et surtout l'immunité. Chez l'Homme les bactéries commensales constituent le microbiote<sup>a</sup> et sont nécessaires et bénéfiques à notre organisme<sup>80-82</sup>.

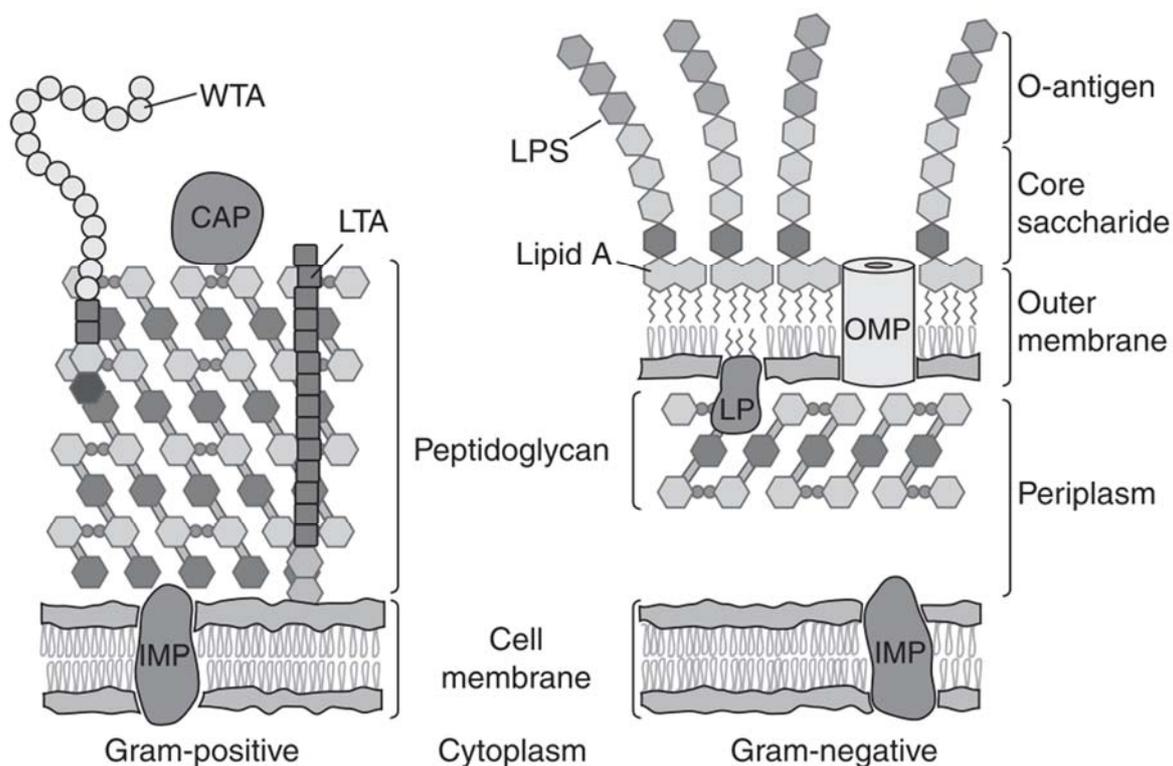
Les bactéries sont classées en deux familles, Gram positif et Gram négatif, caractérisées par des différences fondamentales au niveau de leurs enveloppes<sup>83</sup>.

Les **membranes internes** ou cytoplasmiques des deux groupes de bactéries sont similaires. Cette bicouche lipidique est constituée d'un mélange de phospholipides zwitterioniques tels que la phosphatidyléthanolamine (PE) et anioniques tels que le phosphatidylglycérol (PG), la cardiolipine (CL) et la phosphatidylsérine (PS) conférant une charge globale négative à la bicouche bactérienne<sup>84,85</sup>.

Cependant, les **enveloppes externes** sont significativement différentes, bien qu'elles contiennent des éléments communs tel que le peptidoglycane (PDG)<sup>86</sup>. En effet, les bactéries Gram positives sont monodermes. Elles sont constituées d'une seule membrane entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane. Au contraire, les bactéries Gram négatives sont didermes. Elles sont constituées de deux membranes séparées d'une fine couche de peptidoglycane (**Figure 5**)<sup>87,88</sup>.

---

<sup>a</sup> Ensemble des bactéries qui colonisent la peau et les muqueuses de l'Homme et qui cohabitent avec lui.



**Figure 5 : Schémas descriptifs des parois des bactéries Gram-positive et Gram-négative <sup>83</sup>.**

CAP = Covalently Attached Protein ; IMP = Integral Membrane Protein ; LP = LipoProtéine ; LPS = Lipopolysaccharide ; LTA = Acide Lipoteichoïque ; WTA, wall teichoic acid ; OMP = Outer Membrane Protein.

Le peptidoglycane est un élément essentiel de la paroi bactérienne. Il constitue un exosquelette rigide qui détermine la forme des bactéries et leur assure une protection mécanique contre la pression osmotique. Cet hétéropolymère qui contribue au maintien de l'intégrité bactérienne est composé de chaînes disaccharidiques liées entre elles par des chaînes latérales oligopeptidiques<sup>83</sup>. Ces disaccharides consistent en une alternance de résidus d'acide N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) couplés à travers des liaisons glycosidiques<sup>89</sup>.

Assemblé en plusieurs strates, le PDG est le principal constituant de la paroi des bactéries **Gram positives** (Gram +) qui entoure la membrane cytoplasmique. Il forme une couche épaisse (30 à 100 nm) réticulée par des acides teichoïques<sup>83</sup>. Ce sont des polymères composés de glycérol phosphate ou de ribitol phosphate qui confèrent une charge globale négative à l'enveloppe bactérienne des Gram +. Liés de manière covalente au PDG, ils jouent également un rôle dans la rigidité et la porosité de la paroi. Certains acides teichoïques, les acides lipoteichoïques (LTA), présentent un caractère macroamphiphile et sont capables de s'ancrer dans la membrane cytoplasmique<sup>90</sup>.

En revanche, chez les bactéries **Gram négatives** (Gram -), la couche de peptidoglycane est beaucoup plus mince (quelques nanomètres) et moins réticulée<sup>83</sup>. En outre, leur paroi est constituée d'une membrane externe qui aide à stabiliser la membrane cytoplasmique et joue un rôle majeur dans la protection des organismes Gram négatifs. La membrane externe est une bicouche lipidique dont le feuillet interne se compose de phospholipides de nature comparable à ceux de la membrane cytoplasmique tandis que le feuillet externe est principalement composé de lipopolysaccharide (LPS)<sup>91,92</sup>. Ce composant spécifique des bactéries didermes est un glycolipide anionique constitué de trois éléments. Le lipide A hydrophobe qui confère l'activité endotoxique et permet l'ancrage des LPS à la membrane externe, est un glycophospholipide disaccharide de glucosamine bisphosphorylée contenant six à sept chaînes d'acyle gras par molécule. La partie polysaccharidique est composée du core et de l'antigène O, hydrophyle<sup>83,93</sup>. Par ailleurs, le LPS joue un rôle essentiel dans la fonction de barrière de la membrane externe. Les molécules de LPS forment un ensemble non fluide qui constitue une barrière très efficace contre les molécules hydrophobes<sup>94</sup>. La membrane externe est également constituée de deux types de protéines : les lipoprotéines, liées de manière covalente au peptidoglycane et les porines, protéines transmembranaires, qui permettent la diffusion passive de petites molécules hydrophyles (<700Da)<sup>95</sup>. Ceci, associé aux LPS font de la membrane externe une barrière très efficace, pourtant perméable sélectivement à certaines molécules<sup>94</sup>.

Bien que la plupart des bactéries soient bénignes ou bénéfiques pour l'organisme, il existe de nombreuses espèces pathogènes responsables de maladies infectieuses pouvant être mortelle pour l'hôte. Le pouvoir pathogène, ou virulence, d'une bactérie varie en fonction de la souche. Il dépend entre autres de son pouvoir invasif, de sa capacité à produire des toxines et à se reproduire. C'est un phénotype qui dépend de l'organisation génétique du pathogène, mais également de celle des hôtes, qui dans un temps et un lieu donné, confère un avantage à certains individus qui survivent et se reproduisent<sup>96,97</sup>. Les antibiotiques constituent un moyen de traitement efficace des infections bactériennes.

## II. De l'avènement des antibiotiques à la résistance bactérienne

### II.1. L'avènement des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances actives naturelles ou synthétiques qui détruisent ou inhibent la croissance bactérienne. Leur découverte et leur introduction dans la médecine clinique a été l'un des plus grands triomphes médicale du 20<sup>ème</sup> siècle révolutionnant le traitement des maladies infectieuses qui étaient jusqu'alors un des fléaux les plus couteux en termes de mortalité et morbidité pour l'Homme et ce depuis les temps anciens <sup>98,99</sup>.

Depuis l'antiquité, les moisissures sont utilisées pour traiter les infections. Au 1<sup>er</sup> siècle, Dioscoride<sup>b</sup>, célèbre médecin et botaniste, recommandait les levures pour le traitement de blessures purulentes, ainsi que l'utilisation thérapeutique des substances animales et minérales<sup>100,101</sup>. De même Pline l'Ancien, encyclopédiste romain mentionne dans sa *Naturalis historia*, les vertus curatives de la toile d'araignée contre l'infection des blessures <sup>100</sup>.

Plus tard, la fin du 19<sup>ème</sup> siècle est marquée par un fort intérêt pour les moisissures à bases de pénicilline observées pour posséder des propriétés antibiotiques. A la même période, la découverte des micro-organismes comme responsables des maladies infectieuses a stimulé la recherche de régimes préventifs et thérapeutiques appropriés.

Toutefois, un traitement efficace arriva seulement un demi-siècle plus tard avec la synthèse du premier antibiotique par le biochimiste allemand Gerhard Domagk en 1935. Breveté sous le nom de Prontosil<sup>®</sup>, cet antibiotique de la famille des sulfonamides fut commercialisé en 1937. Par ailleurs, bien que la pénicilline fût découverte en 1928 par Alexander Fleming son application clinique ne débute qu'en 1940 <sup>102</sup>.

Au cours des 30 années qui ont suivi l'introduction des sulfonamides et de la pénicilline, de nouvelles classes d'agents antimicrobiens ont été développées les unes après les autres, conduisant à un âge d'or d'antibiothérapie (**Tableau 2**). Les scientifiques ont découvert et développé une large gamme d'antimicrobiens pour traiter les maladies bactériennes, en

---

<sup>b</sup> Auteur de l'œuvre « Le traité de matière médicale » (*De Materia Medica*) référence jusqu'au XVII<sup>ème</sup> siècle qui décrit 600 plantes et leurs utilisations.

présentant aux cliniciens un certain nombre d'options de traitement pour la plupart des maladies infectieuses <sup>103</sup>.

Ainsi, plus de 20 différentes classes d'antibiotiques ont été découvertes entre 1930 et 1962. Cependant, depuis, seulement trois nouvelles classes ont atteint le marché du médicament. La dernière nouvelle classe d'antibactérien avant l'an 2000 a été décrite en 1968 (**Tableau 2**). Au cours de ces dernières années, la majorité des antimicrobiens introduits sont des analogues d'agents déjà existants développés par modification chimique <sup>103,104</sup>. Malgré le manque de nouvelles classes d'antibiotiques, certains de ces agents ont une efficacité améliorée par rapport aux générations précédentes de la même classe. Par exemple, les céphalosporines de troisième génération sont efficaces dans les maladies causées par des organismes Gram négatifs et dans des maladies telles que la méningite bactérienne aiguë, où les céphalosporines de première génération sont moins efficaces. D'autres agents présentent une activité similaire mais manifestent un profil de sécurité différent (toxicité, effets secondaires) ou une posologie plus pratique. Enfin, parmi les analogues introduits au cours de cette période, certains ont représenté des avancées mineures par rapport aux agents précédents dans la classe, mais ont fourni aux cliniciens une gamme élargie d'options de traitement <sup>103</sup>.

**Tableau 2: Historique de l'introduction et de l'approbation des différentes classes d'antibiotiques**  
<sup>103</sup>.

Année d'introduction	Classe de médicament
1935	Sulfonamides
<b>Food Drug and Cosmetics Act 1938</b>	
1941	B-lactams (Penicillin)
1944	Aminoglycosides
1949	Chloramphenicol
1950	Tetracyclines
1952	Macrolides/Lincosamides/Streptogramins
1956	Glycopeptides
1957	Rifamycins
1959	Nitromidiazoles
1962	Quinolones
<b>Amendements de 1962 Kefauver-Harris</b>	
1968	Trimethoprim
2000	Oxazolidinones
2003	Lipopeptides

## II.2. Modes d'actions des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés selon le spectre bactérien qu'ils traitent, leurs types d'activités et leur voie d'administration. Une famille d'antibiotiques correspond à une classe de composés de structure chimique apparentés dont l'action peut être bactéricide ou bactériostatique. Elle diffère selon la molécule, la bactérie elle-même, son état physiologique et son environnement. A l'intérieur d'une famille, les antibiotiques ont des modes d'action similaires. Les différentes familles d'antibiotiques peuvent être regroupées selon cinq mécanismes d'action principaux <sup>105-107</sup> :

- 1- Inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes
- 2- Inhibiteurs de la synthèse des protéines
- 3- Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (ARN/ADN)
- 4- Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique<sup>c</sup>
- 5- Mécanismes complexes ou méconnus

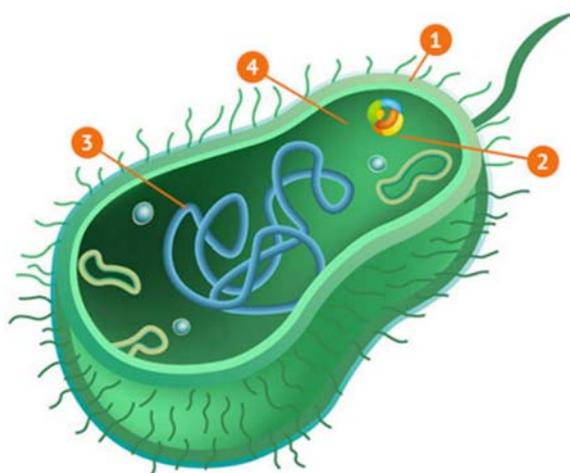


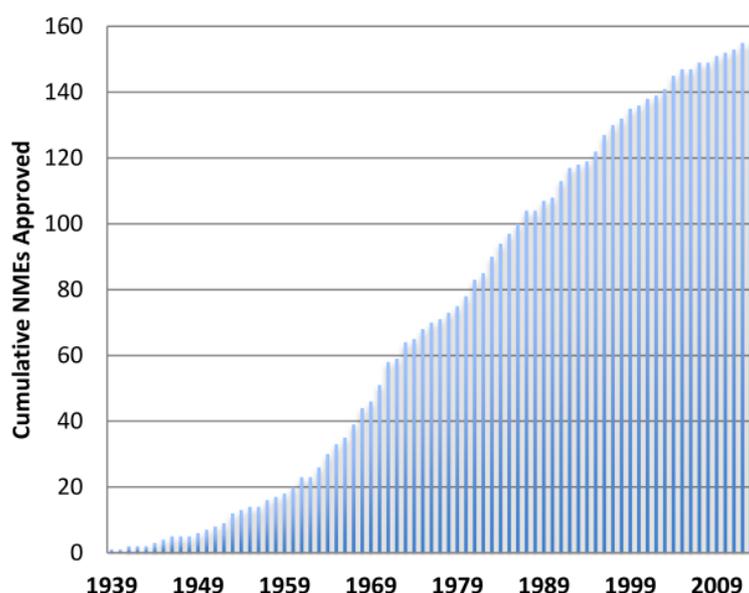
Figure 6 : Modes d'action des différentes familles d'antibiotiques <sup>107</sup>.

<sup>c</sup> = Vitamine B9 - Intervient dans le transfert des groupes monocarbonés nécessaires, notamment, à la synthèse des bases puriques et d'une base pyrimidique, la thymidine.

### II.3. Le déclin...

L'absence d'une variété de nouvelles classes de médicaments depuis les années 1960 est évidente lorsque l'on examine l'histoire de l'approbation par la FDA d'agents antibactériens (**Tableau 2**)<sup>103</sup>.

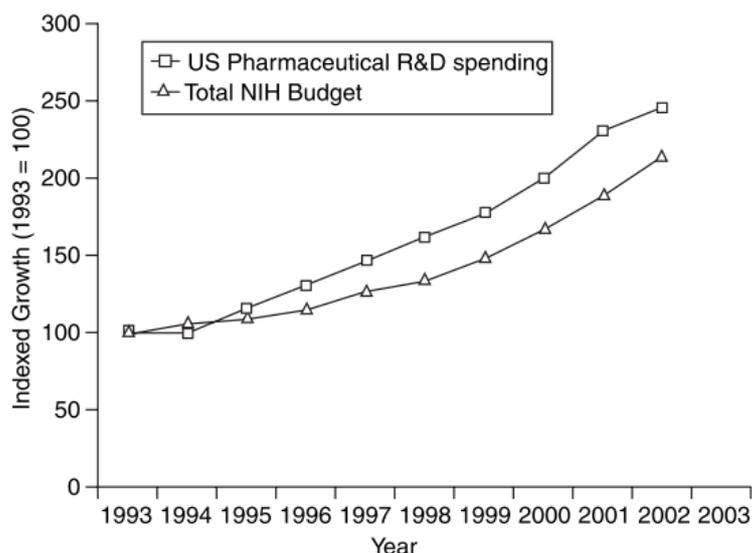
Fin 2013, 155 NEMs antibactériens avaient été approuvées par la FDA (**Figure 7**). Depuis les premières approbations à la fin des années 1930s, le nombre de NEM antibactériens s'est accéléré rapidement, atteignant un taux moyen annuel de 3,1 dans les années 1960. Ce taux est resté à des niveaux élevés et réguliers jusqu'aux années 1990 avec un pic d'approbation en 1971 témoignant de sept nouveaux médicaments<sup>108</sup>. Avec l'acceptation d'un nombre croissant d'analogues et le manque de nouvelles classes de médicaments, associé à une réglementation de plus en plus stricte, il n'est pas surprenant que le développement d'agents antibactériens atteigne un point de saturation voir de déclin. Dans les années 1990, le taux est de 2,2 médicaments par an et diminue à 1,6 jusqu'à l'an 2000<sup>103</sup>.



**Figure 7 : Nombre de NEMs antibactériennes acceptées entre 1938 et 2013**<sup>108</sup>

Entre 2010 et 2015, quatre NEMs ont été approuvées, un niveau non observé depuis le début des années 1940<sup>108,109</sup>. Néanmoins, comme nous l'avons vu en préambule, cette baisse n'est pas restreinte aux médicaments antibactériens et reflète une diminution globale du nombre d'entités thérapeutiques soumis à la FDA au cours de cette période et ce, en dépit d'une

augmentation dans les dépenses de recherche biomédicale (**Figure 8**)<sup>103,110</sup>. Cela reflète les défis inhérents à la découverte et au développement de nouveaux médicaments dans n'importe quelle classe thérapeutique. Il est également important de noter que la majorité des antibiotiques ont été introduits avant l'exigence d'efficacité de 1962 de la Food, Drug and Cosmetics Act (FD&C Act) qui demandait pour la première fois aux fabricants de prouver l'innocuité et l'efficacité de leurs produits<sup>103</sup>.

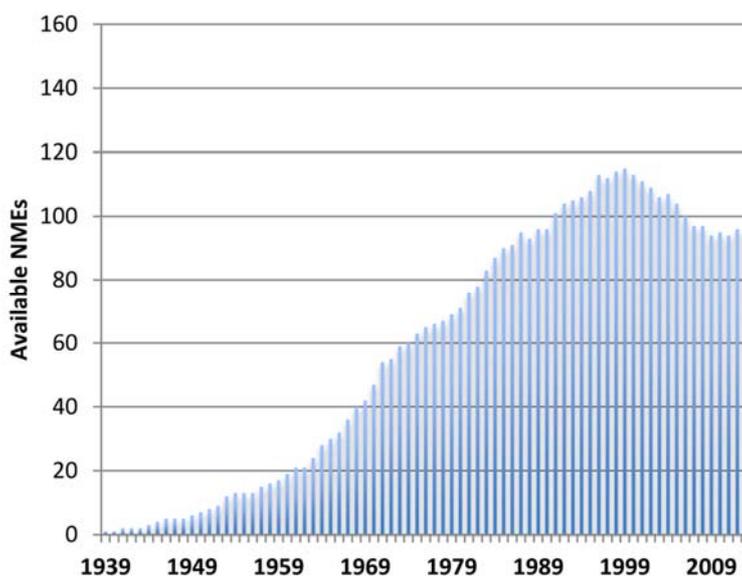


**Figure 8 : Dépenses entre 1993 et 2003 dans la recherche biomédicale**<sup>103</sup>.

De nos jours, les défis inhérents à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques expliquent la rareté de nouveaux antibiotiques. Parmi ceux-ci on compte, l'augmentation du temps entre la découverte et la mise sur le marché de nouveaux médicaments, les échecs en cours de projet et l'ensemble des investissements financiers nécessaires au développement. De plus, contrairement aux médicaments pour le traitement de maladies chroniques, les antibiotiques présentent une faible rentabilité et viabilité commerciale. De manière générale, ils sont utilisés pour des traitements à court terme qui aboutissent à la guérison. Par ailleurs, les nouveaux antibiotiques commercialisés auront probablement un emploi limité aux seuls cas où les autres traitements auraient déjà échoué auparavant<sup>111</sup>.

En outre, certains médicaments antibactériens ont été redirigés vers des applications telles que des compléments alimentaires pour animaux. Parmi les 155 agents antibactériens approuvés depuis 1938, moins des deux tiers (62%) restent disponibles pour une utilisation clinique

aujourd'hui (**Figure 9**). Enfin, de nombreuses NEMs ont été rendues obsolètes ou commercialement peu attrayantes en raison de leur toxicité, de dérivés nouvelle génération et de la résistance aux médicaments <sup>103</sup>. Ainsi, en plus d'un manque de nouveaux antibiotiques en développement, une résistance accrue aux agents existants a émergé <sup>112</sup>.



**Figure 9 : Nombre d'antibiotiques disponibles pour l'utilisation clinique entre 1938 et 2013 <sup>108</sup>.**

#### II.4. L'émergence des résistances aux antibiotiques

Au 20<sup>ème</sup> siècle, la découverte et l'introduction des antibiotiques a constitué un progrès majeur dans la médecine et le traitement des maladies bactériennes <sup>98</sup>. Bien que les infections bactériennes représentaient auparavant la principale cause de décès, leur découverte a permis de soigner de nombreuses maladies mortelles. Leur utilisation a ainsi réduit la mortalité infantile et augmenté l'espérance de vie. Ils sont également cruciaux pour le succès de la chirurgie invasive et des traitements comme la chimiothérapie <sup>112</sup>.

Bien que l'attention ait été centrée sur la résistance aux antibiotiques chez les patients hospitalisés et sur les bactéries qui sont directement responsables des effets néfastes sur la santé humaine, le développement de la résistance aux antibiotiques est un phénomène écologique naturel et le produit de milliards d'années d'évolution. Les études ont montré que la résistance survient même en absence d'activité humaine <sup>113-116</sup>. La plupart des antibiotiques utilisés dans la médecine humaine proviennent de micro-organismes producteurs d'antibiotiques qui exposent ces molécules antimicrobiennes aux autres espèces présentes dans leur milieu local.

Cela favorise la sélection de la résistance dans les espèces environnementales ainsi que la génération de gènes de résistance ou d'immunité dans les organismes producteurs. Cette résistance acquise dans les milieux naturels peut être mobilisée et transférée dans des pathogènes humains <sup>116-118</sup>. En outre, les micro-organismes environnementaux portent des gènes qui codent la résistance à de nouveaux antibiotiques, tel que la daptomycine, même avant leur première utilisation clinique <sup>116,119,120</sup>.

Malgré l'avertissement d'Alexander Fleming dans sa conférence d'acceptation du prix Nobel citant les dangers d'une utilisation excessive conduisant à la résistance, peu de temps après, les antibiotiques ont été utilisés comme remède pour la majorité des maladies sans distinction <sup>121,122</sup>.

L'utilisation des antibiotiques se situe dans deux domaines majeurs : chez les humains et les animaux. Chez les **humains**, ils sont bien évidemment utilisés pour traiter les maladies infectieuses, mais également dans la médecine où ils sont essentiels à la réussite des procédures chirurgicales avancées, telles que les greffes d'organes et de prothèses en prévention et limitation des infections <sup>99</sup>. Par ailleurs, ils sont utilisés pour le traitement des **animaux domestiques**. Cependant, dans l'agriculture, les antibiotiques sont également employés pour accélérer la croissance et la prophylaxie, ainsi que pour un traitement plus large et moins ciblé dans l'horticulture et l'aquaculture <sup>123,124</sup>. Ainsi, dans certaines parties du monde les arbres fruitiers sont pulvérisés avec des antibiotiques et 50 à 60 kg d'antimicrobiens peuvent être ajoutés à chaque hectare de ferme de saumon <sup>125</sup>. Ainsi, 75% de l'utilisation d'antibiotiques aurait une valeur thérapeutique douteuse qui pourrait être évitée <sup>124,126</sup>.

L'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques dans la médecine humaine et l'industrie animale a modifié l'écologie bactérienne. Elle a contribué à la génération de bactéries résistantes aux antibiotiques <sup>98</sup>. Pourtant ce phénomène n'est pas récent.

En effet, depuis l'introduction en 1937 des sulfonamides, le développement de mécanismes spécifiques de résistance a eu une incidence sur leur utilisation thérapeutique <sup>99</sup>. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), la bactérie résistante la plus familière dans le milieu clinique, a ainsi acquis rapidement une résistance contre les sulfonamides et ce, peu de temps après leur introduction sur le marché. Par ailleurs, dès les années 1950, *S. aureus* initialement sensible à la pénicilline, développe des souches qui produisent de la pénicillinase. Pour lutter contre ce mécanisme de

résistance, la méthicilline, qui est une pénicilline résistante à la pénicillinase, a été développée en 1960. Cependant, dès l'année suivante, *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a été isolé au Royaume-Uni <sup>127,128</sup>. De même, bien que la pénicilline était effective contre *Streptococcus pneumoniae* des souches à sensibilité diminuée à la pénicilline<sup>d</sup> furent identifiées dans la deuxième moitié des années 1960 et celles résistantes<sup>e</sup> à la fin des années 1970 <sup>129</sup>. Au contraire, certaines bactéries mutent plus lentement. Ainsi, certaines souches de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) montrent encore une susceptibilité réduite à la pénicilline <sup>104,130</sup>.

Dans les années 1970, outre l'absence de découverte de nouvelles classes d'antibiotiques, le problème de résistance augmente. Les antibiotiques déjà existants sont modifiés et optimisés en synthétisant des analogues plus efficaces, moins toxiques avec un spectre d'activité plus large et une sensibilité plus faible aux mécanismes de résistance <sup>131</sup>. Compte tenu de l'usage intensif des antibiotiques associé à l'utilisation d'agents à spectre de plus en plus large, les bactéries multi-résistantes ont continué à émerger à travers le monde <sup>132</sup>. Depuis 1990, l'infection nosocomiale par le SARM est devenue un problème sociale <sup>129</sup>.

Le nombre d'infections causées par les bactéries résistantes aux médicaments multiples augmente globalement et le spectre des infections non traitées devient une réalité <sup>112,133,134</sup>. Au 21<sup>ème</sup> siècle, les infections graves causées par des micro-organismes résistants aux antibiotiques couramment utilisés sont devenues un problème de santé majeur au niveau mondial. D'après l'OMS, la résistance antibiotique est aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant non seulement sur la santé mondiale mais également sur la sécurité alimentaire et le développement. Ceci est responsable de l'augmentation significative de la morbidité et de la mortalité, d'hospitalisations plus longues et de l'augmentation des coûts des soins de santé <sup>135</sup>. On estime qu'en Europe, 25 000 personnes meurent chaque année à la suite d'infections bactériennes multirésistantes et que cela coûte 1,5 milliard d'euros par année à l'économie de l'Union Européenne <sup>112,133</sup>. Aux Etats-Unis, plus de 2 millions de personnes sont infectées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques, 23 000 décès étant un résultat direct <sup>112,136,137</sup>. La

---

<sup>d</sup> Pneumocoque à Sensibilité Diminuée à la Pénicilline = PSDP.

<sup>e</sup> Pneumocoque Résistant à la Pénicilline = PRP

majorité des infections hospitalières aux États-Unis sont causées par les agents pathogènes dits ESKAPE<sup>f</sup>, pour lesquels de nouveaux antibiotiques sont nécessaires<sup>104,138</sup>.

Aujourd'hui, trop peu d'analogues ont été mis sur le marché pour enrayer la résistance aux antibiotiques et aucun ne présente de nouveaux mécanismes d'action, en particulier contre les bactéries Gram négative. Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est d'autant plus préoccupant qu'il concerne aujourd'hui l'ensemble des bactéries pathogènes<sup>104</sup>.

## II.5. Mécanismes d'action de la résistance antibactérienne

La résistance bactérienne est la capacité des bactéries à empêcher un antibiotique d'agir contre elles. En conséquence, les traitements standards deviennent inefficaces, les infections persistent et peuvent se propager<sup>139</sup>.

L'utilisation d'antimicrobiens pour le traitement d'une infection réelle ou redoutée force les bactéries à s'adapter ou à mourir, on parle de pression sélective. Les micro-organismes survivants portent des gènes de résistances aux médicaments qui peuvent être transférés à d'autres souches de leur genre et de leur espèce, voir même à d'autres espèces non apparentées<sup>132</sup>.

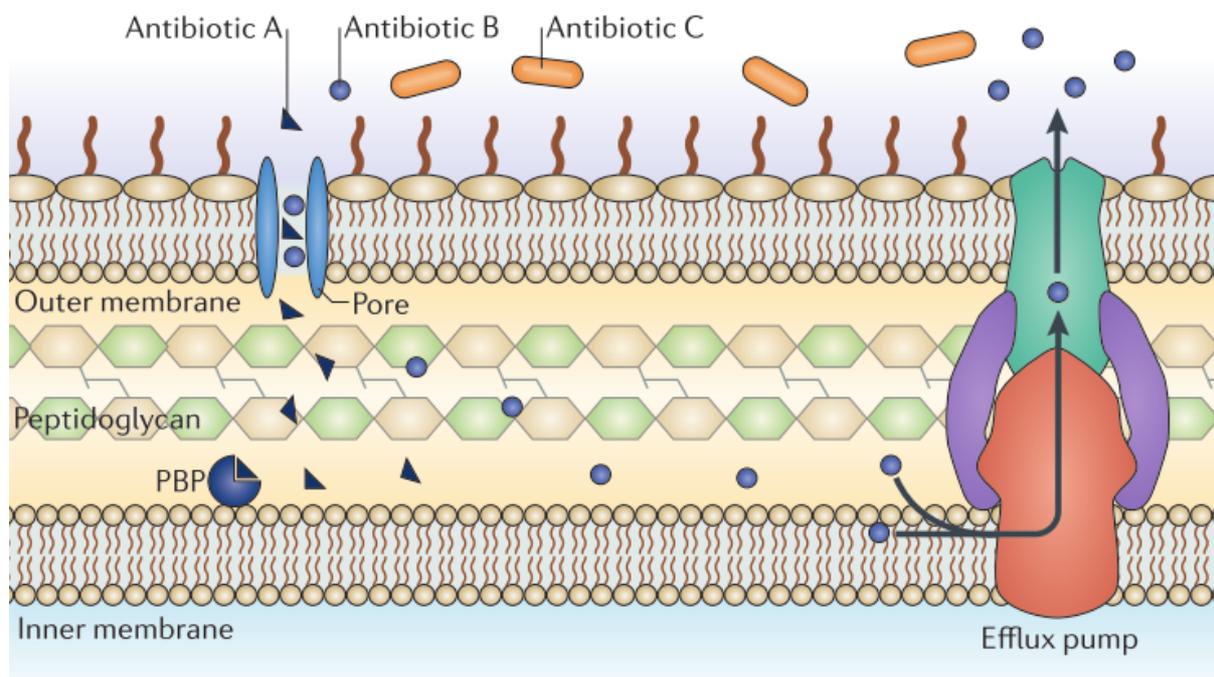
La résistance clinique *in vivo* est un phénomène complexe. Celle-ci dépend de l'état immunitaire du patient et implique une interaction entre les bactéries, leur distribution dans le corps, la distribution de l'antibiotique et sa concentration sur le site d'infection<sup>98,140</sup>.

La résistance aux bactéries peut être intrinsèque ou acquise. Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes à certains antibiotiques<sup>98,140</sup>. C'est un trait naturel résultant de l'organisme. Néanmoins, elles peuvent également acquérir une résistance aux antibiotiques via des mutations dans des gènes chromosomiques et par un transfert de gène horizontal. La résistance intrinsèque d'une espèce bactérienne à un antibiotique particulier est la capacité de résister à l'action de cet antibiotique en raison de caractéristiques structurelles ou fonctionnelles inhérentes<sup>112</sup>. Des études récentes ont conduit à l'identification de nombreux gènes responsables de la résistance intrinsèque aux antibiotiques de différentes classes<sup>112,141,142</sup>. Des travaux ont permis d'identifier de possibles combinaisons de médicaments novateurs dans

---

<sup>f</sup> *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*.

lesquels un agent peut inhiber un mécanisme de résistance intrinsèque et ainsi augmenter le spectre d'activité des antibiotiques au-delà des espèces cibles normales <sup>112,141</sup>. Comprendre la base génétique de la résistance bactérienne intrinsèque et, par conséquent, le spectre d'activité d'un antibiotique, peut donc guider le développement de nouvelles combinaisons d'agents avec une activité améliorée ou élargie contre des espèces cibles <sup>112</sup>.



**Figure 10 : Mécanismes intrinsèques de résistance bactérienne aux antibiotiques.**

La figure montre un aperçu des mécanismes de résistance intrinsèques qui existent. L'exemple illustré est celui des antibiotiques  $\beta$ -lactame ciblant une Protéine Liante la Pénicilline (=PBD ; Penicillin-Binding Protein). L'antibiotique A peut entrer dans la cellule via des protéines transmembranaires de type porine et atteindre sa cible afin d'inhiber la synthèse du peptidoglycane. L'antibiotique B peut aussi entrer dans la cellule via des porines, mais contrairement à l'antibiotique A, il sera efficacement éliminé grâce à des pompes à efflux. L'antibiotique C ne peut pas franchir la membrane et ne peut donc pas atteindre la cible PDB <sup>112</sup>.

En plus de la résistance intrinsèque, les bactéries peuvent acquérir ou développer une résistance aux antibiotiques. Cela peut être médié par plusieurs mécanismes, qui se divisent en trois groupes principaux <sup>112</sup>:

- ceux qui minimisent les concentrations intracellulaires de l'antibiotique due à une mauvaise pénétration dans la bactérie ou par exportation via des pompes à efflux ;
- ceux qui modifient la cible de l'antibiotique par mutation génétique ou modification post-traductionnelle de la cible ;
- ceux qui inactivent l'antibiotique par hydrolyse ou modification.

### II.5.1. Prévention d'accès à la cible

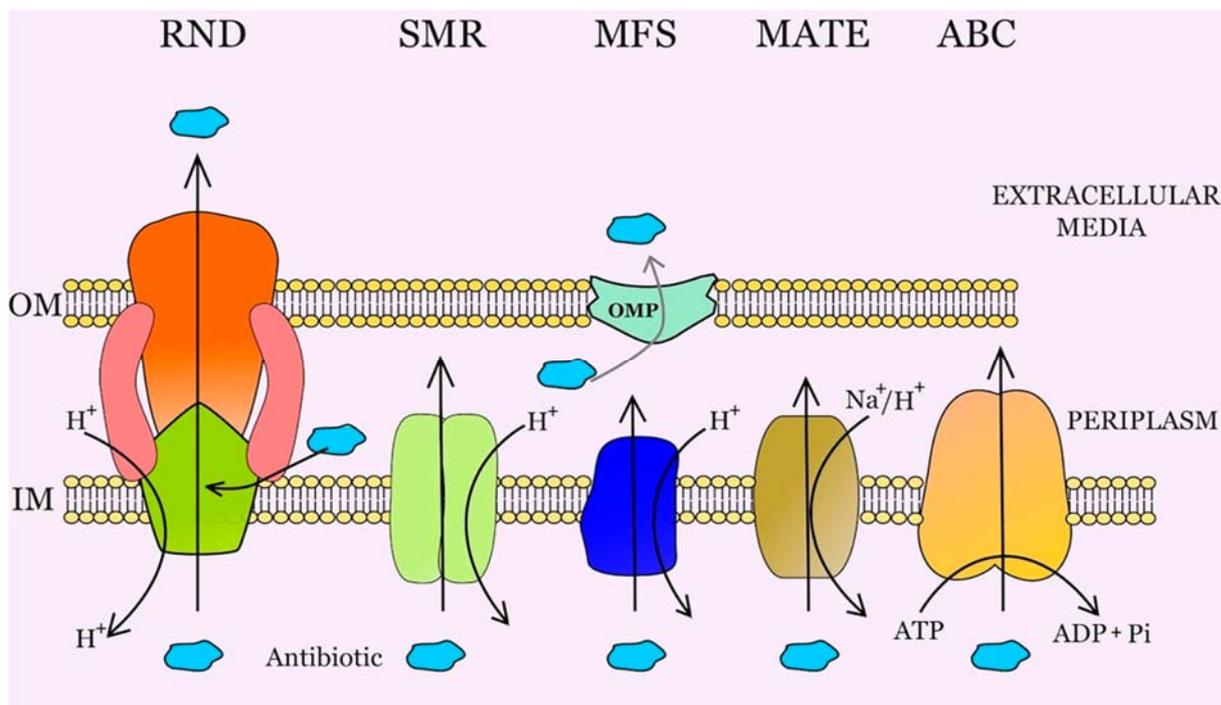
La prévention d'accès de l'antibiotique à sa cible peut être modulée soit en réduisant la perméabilité de l'enveloppe bactérienne, soit en augmentant les flux d'exportation.

#### II.5.1.1. *Perméabilité réduite*

Par rapport aux espèces Gram positives, les bactéries Gram négatives sont intrinsèquement moins perméables à de nombreux antibiotiques car leur membrane externe forme une barrière de perméabilité supplémentaire<sup>18,19</sup>. Les antibiotiques hydrophiles traversent la membrane externe en diffusant à travers des protéines membranaires. Par conséquent, la réduction de la perméabilité de la membrane externe et la limitation de l'entrée d'antibiotiques dans les bactéries sont obtenues par la régulation négative des porines ou grâce à leur remplacement par des canaux plus sélectifs<sup>112</sup>.

#### II.5.1.2. *Augmentation de l'efflux*

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Les transporteurs bactériens appartiennent à cinq superfamilles classées en deux types différents en fonction de leurs mécanismes d'action (**Figure 11**). Le type 1 comprend les transporteurs primaires qui couplent l'expulsion de médicaments à partir de la cellule avec une hydrolyse ATP : ce sont les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Le type 2 comprend des transporteurs secondaires alimentés par des gradients électrochimiques transmembranaires soit de protons, soit d'ions sodium<sup>143,144</sup>.



**Figure 11 : Représentation schématique des principaux types de système à efflux bactérien.**

Illustration des cinq familles majeures de transporteurs à efflux: Resistance-Nodulation Division (RND), Small Multidrug Resistance (SMR), Major Facilitator Superfamily (MFS), Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) et ATP-binding cassette (ABC). Pour fonctionner, les pompes à efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient proton (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC). IM: Inner membrane. OM: Outer membrane. OMP: Outer membrane protein <sup>143,144</sup>.

Les pompes à efflux bactériennes transportent activement de nombreux antibiotiques hors de la cellule et contribuent de manière importante à la résistance intrinsèque des bactéries. Lorsqu'elles sont surexprimées, les pompes d'efflux peuvent également contribuer à la résistance à des antibiotiques normalement actifs. Certaines pompes à efflux sont spécifiques à un substrat, mais la plupart transportent une large gamme de molécules structurellement différentes et sont connues sous le nom de pompes d'efflux MultiDRogues (MDR) <sup>112</sup>.

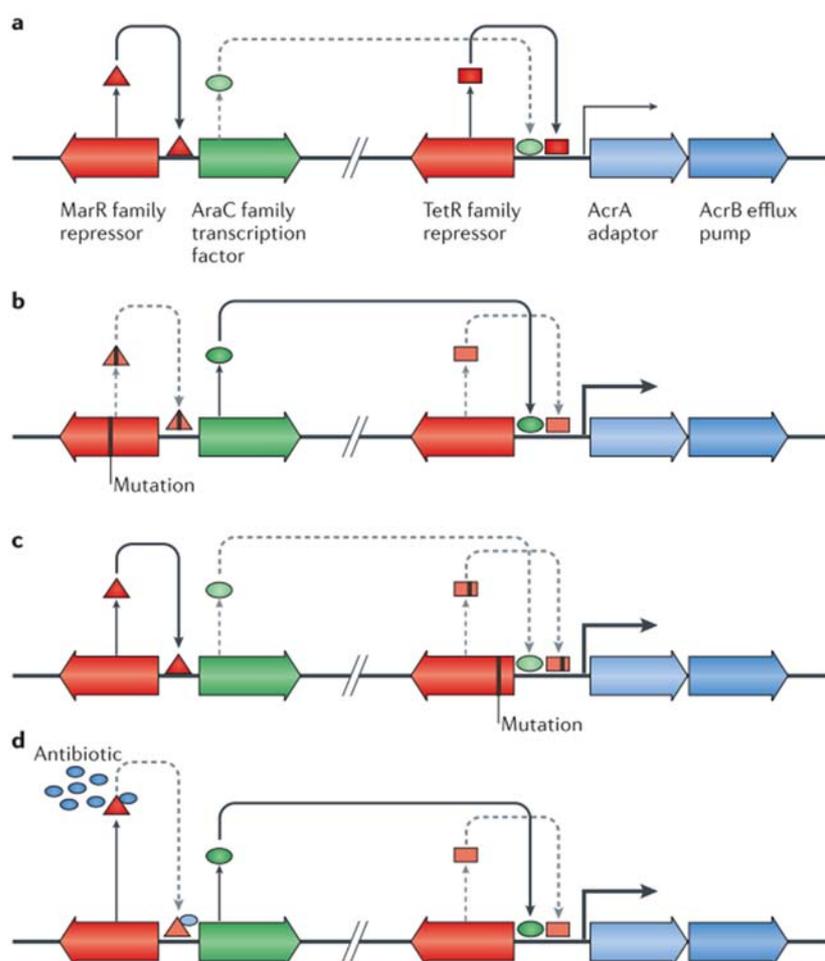
Bien que toutes les bactéries portent des gènes codant pour des pompes à efflux MDR sur leurs chromosomes, certains ont été mobilisés sur des plasmides qui peuvent se transmettre entre les bactéries. Ce mécanisme de résistance est transmissible et peut être rapidement diffusé à d'autres agents pathogènes cliniquement pertinents <sup>112</sup>.

La famille Résistance-Nodulation Division (RND) des pompes d'efflux MDR est spécifique des bactéries Gram négatives. Leur surexpression engendre des niveaux de résistance encore plus important par exportation d'une gamme extrêmement large de substrats <sup>112,145</sup>.

Les bactéries qui surexpriment les pompes à efflux ont été isolées des patients depuis les années 1990<sup>146-148</sup>. La compréhension du mécanisme de la surexpression est importante car il s'agit d'un mécanisme commun de résistance dans les isolats cliniques. Une connaissance approfondie du mécanisme pourrait permettre la conception de nouveaux produits thérapeutiques pour prévenir la production de pompe à efflux. La transcription des gènes qui codent les pompes à efflux est contrôlée par des régulateurs locaux. Les gènes codant pour ces régulateurs sont localisés aux côtés des gènes efflux-pompe et des régulateurs globaux, qui ont des fonctions biologiques plus larges (**Figure 12a**)<sup>112</sup>. L'expression accrue de ces facteurs de transcription, y compris MarA, SoxS, RamA ou Rob dans *Enterobacteriaceae*, confère une résistance multidrogues en raison de l'augmentation de l'expression des pompes à efflux et de la répression des protéines porines<sup>112</sup>.

Le haut niveau d'expression des gènes d'efflux observés dans les bactéries résistantes à plusieurs médicaments est souvent dû à une mutation dans le réseau de régulation contrôlant l'expression de ces gènes (**Figure 12b, c**). Ces mutations peuvent se situer dans un répresseur local, un facteur de transcription global ou des sites intergéniques qui modifient l'expression des gènes de la pompe ou de leurs régulateurs<sup>112,149-151</sup>. Les mutations peuvent altérer l'activité du promoteur provoquant une surexpression constitutive de la pompe à efflux et une résistance à plusieurs médicaments<sup>112,152</sup>.

L'augmentation de l'expression des pompes d'efflux peut également se produire en raison de l'induction en réponse aux signaux environnementaux et dans les conditions dans lesquelles leur fonction est requise. Le mécanisme le plus commun d'induction de l'expression du gène de la pompe d'efflux est la liaison directe d'une molécule à une protéine répressive transcriptionnelle, ce qui diminue la liaison du répresseur à son ADN cible (**Figure 12d**)<sup>112</sup>.



**Figure 12 : Voies de régulation des pompes multidrogues.**

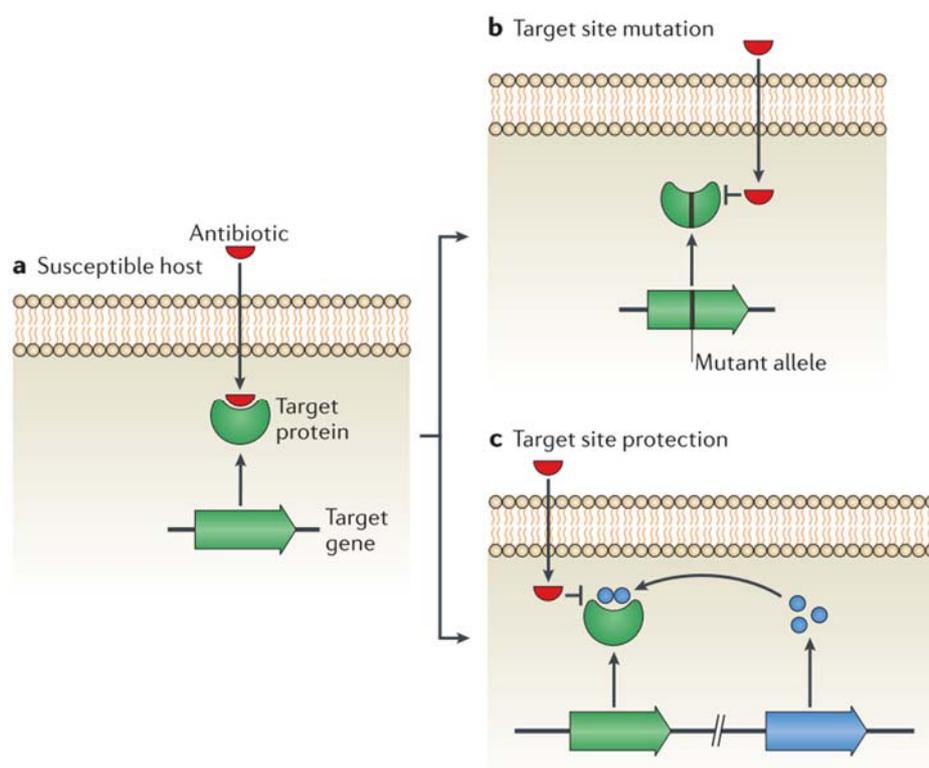
**a** | L'expression basale des pompes d'efflux RND est contrôlée par un répresseur de la famille TetR codé localement, et les niveaux du facteur de transcription de la famille AraC, qui peuvent soulager la répression médiée par TetR, sont maintenus bas en réprimant le répresseur de la famille MarR (Multiple antibiotic resistance protein). **b** | Des mutations au niveau du gène répresseur de la famille *marR* induisent une perte de capacité du répresseur à inhiber les activateurs de la famille AraC. L'expression accrue de l'activateur AraC confère une augmentation de l'expression des pompes d'efflux RND AcrB et de l'adaptateur périplasmique AcrA. **c** | Une mutation au niveau du gène répresseur de la famille TetR réduit la liaison du répresseur en amont de *acrA* et *acrB*, ce qui entraîne une augmentation de la transcription d'*acrAB*. **d** | Les antibiotiques se lient à MarR et induisent des changements conformationnels qui empêchent la répression de l'activateur AraC. Une augmentation de l'expression de l'activateur AraC conduit à une transcription accrue d'*acrA* et *acrB*. Les voies activées sont indiquées par des flèches pleines tandis que les voies inhibées sont indiquées par des flèches en pointillées <sup>112</sup>.

### II.5.1.3. Modification de la cible de l'antibiotique (par mutation ou modification post-traductionnelle)

La plupart des antibiotiques se lient spécifiquement à leurs cibles avec une affinité élevée, empêchant ainsi leur activité normale. Les modifications apportées à la cible, qui empêchent une liaison efficace aux antibiotiques mais permettent toujours à la cible d'exercer sa fonction normale, peuvent conférer une résistance (**Figure 13b**). Au cours de l'infection, une mutation

ponctuelle dans le gène codant pour une cible antibiotique peut conférer une résistance à l'antibiotique, les souches possédant cette mutation peuvent alors proliférer. Les gènes qui codent les cibles de certains antibiotiques existent en plusieurs copies <sup>112</sup>.

La protection par modification de la cible peut également constituer un moyen efficace de résistance aux antibiotiques qui ne requiert pas de changement mutationnel dans les gènes codant pour les molécules cibles (**Figure 13c**). Au cours des dernières années, la protection des cibles a été considérée comme un mécanisme de résistance très largement observé pour plusieurs antibiotiques. Les gènes responsables de ces altérations sont souvent portés sur des plasmides permettant leur large diffusion <sup>112,153,154</sup>. Par exemple, les aminoglycosides sont des inhibiteurs de la synthèse protéique qui fonctionnent en se liant au ribosome. L'un des mécanismes de résistance à ces antibiotiques est la modification du ribosome cible par méthylation.



**Figure 13 : Modification de la cible bactérienne.**

a | Un hôte sensible dans lequel un antibiotique est capable de se lier étroitement à sa cible spécifique et d'exercer un effet inhibiteur. b | Une mutation au niveau de la cible (telles que les mutations au niveau des gènes de la topoisomérase chez de nombreuses espèces qui leur confère une résistance à la fluoroquinolone) ou une recombinaison pour fournir un allèle mosaïque (telle que la mosaïque PBP chez les pneumocoques et les gonocoques qui leur confère une résistance au  $\beta$ -lactame) résulte en une cible fonctionnelle ayant une affinité réduite pour l'antibiotique qui ne se lie pas efficacement. Il a ainsi un effet réduit ou négligeable. c | La modification de la cible par addition d'un groupement chimique peut aussi empêcher la liaison de l'antibiotique sans altérer la séquence primaire de la protéine cible, qui conserve son activité <sup>112</sup>.

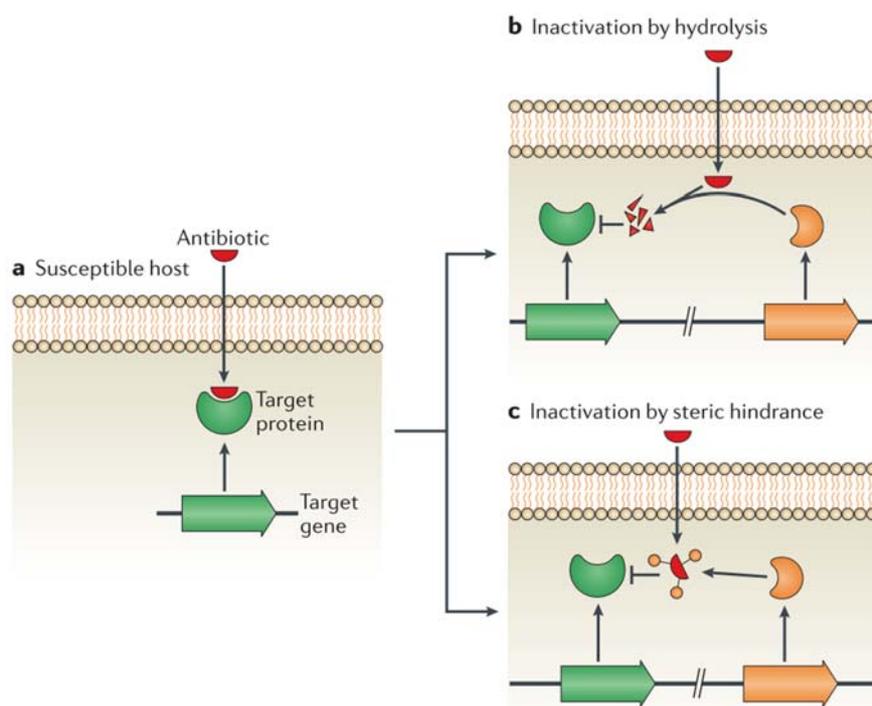
Les bactéries peuvent également se protéger de l'action antibiotique par la production d'une cible alternative, généralement une enzyme, capable de résister à l'inhibition de l'antibiotique alors que l'organisme continue de produire la cible sensible originale. Cela permet aux bactéries de survivre face à la sélection car l'enzyme alternative contourne l'effet de l'antibiotique. Il n'est cependant pas rare de trouver une bactérie présentant plus d'un de ces mécanismes.

#### *II.5.1.4. Inactivation de l'antibiotique (par hydrolyse ou modification)*

En plus d'empêcher les antibiotiques d'entrer dans la cellule ou de modifier leurs cibles, les bactéries peuvent dégrader ou modifier les antibiotiques, résistant ainsi à leur action.

Les antibiotiques peuvent être inactivés par hydrolyse. La modification enzymatique des antibiotiques est un mécanisme majeur de résistance qui a été observé dès 1940 avec la découverte de la pénicillinase, une  $\beta$ -lactamase, qui clive la pénicilline et la rend inactive (**Figure 14b**)<sup>112,155</sup>. Des milliers d'enzymes capables de dégrader et modifier des antibiotiques de différentes classes ont depuis été identifiées. Il existe également des sous-classes d'enzymes qui peuvent dégrader différents antibiotiques de la même famille<sup>112,156,157</sup>. La production d'analogues dans les différentes familles d'antibiotiques est, entre autres, liée à l'émergence d'enzymes hydrolytiques. Ainsi par exemple, les premières  $\beta$ -lactamases, qui étaient actives contre les  $\beta$ -lactames de première génération, étaient suivies de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu qui ont une activité contre les oxymino-céphalosporines<sup>112,158</sup>. Dans certains cas, l'expansion des clones bactériens résistants a été responsable d'une augmentation des taux de résistance. Dans d'autres cas, ceci a été causé par la propagation de plasmides qui portent des gènes de résistance. Indépendamment du mécanisme, la caractéristique commune a été la propagation rapide et l'expansion de la résistance dans une période de temps relativement court.

Un antibiotique peut également être inactivé suite à un transfert d'un groupement chimique. L'ajout de groupes chimiques sur des sites vulnérables de l'antibiotique par des enzymes bactériennes provoque une résistance aux antibiotiques en empêchant celui-ci de se lier à sa protéine cible suite à un encombrement stérique (**Figure 14c**). Différents groupes chimiques peuvent être transférés, tels que les acyles, les phosphates, les nucléotides et les ribitols<sup>112,159</sup>



**Figure 14 : Modification de l'antibiotique.**

a | Un hôte sensible avec une cible qui est efficacement inhibée par un antibiotique. b | L'acquisition et la production d'une enzyme qui dégrade l'antibiotique (par exemple, la  $\beta$ -lactamase) empêche la liaison de l'antibiotique à la cible et confère de la résistance à l'hôte. c | L'acquisition et la production d'une enzyme capable de modifier la structure de l'antibiotique (par exemple, les enzymes modifiant les aminoglycosides) peuvent également empêcher la liaison de l'antibiotique à sa cible et conférer une résistance <sup>112</sup>.

Au 20<sup>ème</sup> siècle, la découverte et l'introduction des antibiotiques ont significativement augmenté l'espérance de vie des populations. Bien que la mise sur le marché de ces molécules a été exponentielle depuis les années 1940, aucune nouvelle structure cliniquement utile n'a été découverte après 1961. De plus, presque tous les antimicrobiens qui ont été développés depuis correspondent à des modifications des antibiotiques existants auxquels les bactéries ont, au fil des années, "appris" à résister. Celles qui avaient acquis une résistance à une classe d'antibiotiques pouvaient, avec peu de mutations, lutter contre leurs analogues <sup>112</sup>. La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel et les bactéries ont évolué pour résister à l'action des produits antibactériens naturels pendant des milliards d'années. En outre, l'utilisation généralisée des antibiotiques dans le domaine de la santé et de l'industrie a augmenté la pression évolutive pour l'émergence de résistances.

Notre connaissance de la diversité des mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne, doit être utile à la découverte et au développement de nouveaux agents qui peuvent contourner ou neutraliser les mécanismes de résistance existant et agir sur de nouvelles cibles. L'utilisation

synergique potentielle de différents agents, pourrait également aider à minimiser l'apparition de résistance aux antibiotiques actuels et nouveaux, et ainsi permettre une meilleure utilisation de ces médicaments. Par ailleurs, les études sur les mécanismes de résistance doivent être une exigence obligatoire à un stade précoce du développement de médicaments <sup>112</sup>.

Il existe un besoin urgent de nouveaux agents antibactériens pour lutter contre l'émergence des pathogènes multi-résistants impliqués dans les maladies graves et mortelles. Les enjeux aujourd'hui sont donc d'identifier de nouvelles classes d'antibiotiques avec des modes d'action différents qui limiteraient la résistance antimicrobienne.

### **III. Découverte d'agents antibactériens innovants : les peptides antimicrobiens**

L'émergence continue de pathogènes résistants, en particulier parmi les bactéries Gram négatives, est devenue un défi majeur de santé publique <sup>160</sup>. Elle limite les options thérapeutiques en augmentant la morbidité et la mortalité dans les hôpitaux. De plus, le nombre limité d'antibiotiques aujourd'hui disponibles présentent des similitudes au niveau de leur spectre d'activité et de leur mode d'action. La découverte de nouveaux agents antimicrobiens ayant des mécanismes d'action innovants susceptibles de retarder le développement de la résistance est donc nécessaire <sup>161,162</sup>.

Au cours des dernières années, les produits naturels ont suscité un regain d'intérêt en tant que source ou modèle de conception de médicaments potentiels parmi lesquels les venins d'animaux constituent un réel intérêt thérapeutique <sup>4</sup>. Dans notre sujet de recherche, c'est le potentiel antibactérien des venins qui nous intéresse. En effet, bien que cela ne soit pas leur fonction principale, de nombreuses études ont révélé la présence de molécules à activité antibactérienne dans les venins. Chez les serpents par exemple, bien que leur cavité buccale soit colonisée par de nombreuses bactéries pathogènes, les envenimations sont rarement associées à des infections bactériennes suggérant la présence de molécules antimicrobiennes dans leurs venins qui les protégeraient lors de l'ingestion de leur proie <sup>30,163</sup>. Les sécrétions des amphibiens sont riches en antibactériens pour se protéger contre les bactéries pathogènes dans leur environnement, de même pour les insectes sociaux dont le venin à effet antibactérien protège la colonie. Ces agents

antimicrobiens d'origine naturelle pourraient constituer une alternative aux traitements existants qui présentent des failles face au développement accru de micro-organismes pathogènes devenus multirésistants aux antibiotiques. Parmi les agents antibactériens présents dans les venins, les Peptides AntiMicrobiens (PAMs) présentent un intérêt particulier en raison de leur efficacité considérable, de leur large spectre d'activité et de leur mécanisme d'action distinct<sup>164</sup>. Ces peptides, aussi appelés peptides de défense de l'hôte, sont connus pour être des composants importants du système immunitaire inné et contribuent à la résistance naturelle aux infections microbiennes<sup>162,165,166</sup>.

Bien que, les programmes de découverte d'antibiotiques aient été traditionnellement axés sur les thérapies à petites molécules, les PAMs apparaissent comme une source de nouvelle classe de molécules au potentiel anti-infectieux<sup>165</sup>. Aujourd'hui, la résistance aux médicaments multiples et la formation de biofilm sont la principale cause d'une infection chronique. Les PAMs ont été décrits pour tuer les bactéries à résistance multiple et éliminer la formation de biofilms<sup>167</sup>.

### III.1. La découverte des peptides antimicrobiens

La découverte des PAMs remonte à 1939, lorsque Dubos extrait un agent antimicrobien d'une souche de *Bacillus* du sol protégeant des souris contre une infection à pneumocoque<sup>168,169</sup>. L'année suivante, Hotchkiss et Dubos fractionnèrent cet extrait et identifièrent un PAM nommé gramicidine<sup>170</sup>. Malgré une toxicité rapportée suite à une application intrapéritonéale, la gramicidine a été jugée efficace pour le traitement topique des plaies et des ulcères<sup>171</sup>. En 1941, un autre PAM, la tyrocidine, a été découverte et trouvée efficace contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives<sup>172</sup>. Toutefois, elle était hémotoxique<sup>173</sup>. Dans la même année, un autre PAM a été isolé d'une plante *Triticum aestivum*<sup>a</sup>, qui a ensuite été nommé purothionine et a été jugé efficace contre les champignons et certaines bactéries pathogènes<sup>174-176</sup>.

C'est en 1967 qu'est découvert le premier PAM issu de venins d'animaux. La mélittine (**Figure 15**) est le principal composant actif du venin d'abeille *Apis mellifera* qui présente une activité anti-Gram + et Gram -, mais également anti-fongique, anti-parasitaire, anti-VIH et anti-cancéreuse mais est hautement toxique pour les cellules mammifères<sup>177</sup>.

---

<sup>a</sup> Blé tendre

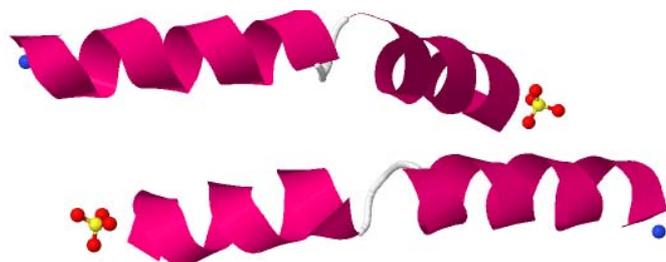


Figure 15 : Structure 2D de la mélittine du venin d'abeille, *Apis mellifera* <sup>178</sup>.

Près de 2900 PAMs sont répertoriés à ce jour parmi lesquels plus de 2400 (83%) ont une activité antibactérienne et plus de 1300 sont issus de venins d'animaux (**Figure 16**) <sup>179-181</sup>.

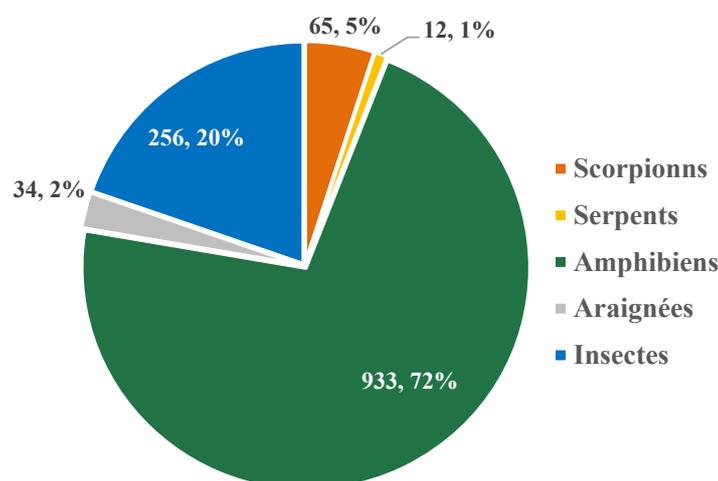


Figure 16 : PAMs isolés à partir de venins de scorpionns, serpents, amphibiens, araignées et insectes.

### III.2. Rôle biologique, Structure et diversité des PAMs

Les peptides antimicrobiens sont des peptides courts endogènes produits par toutes les formes de vie <sup>182</sup>. Chez les organismes supérieurs, ils constituent des composants importants de l'immunité innée, protégeant l'hôte contre les infections. En revanche, les bactéries produisent des PAMs afin de tuer d'autres bactéries en compétition pour la même niche écologique <sup>183</sup>. Beaucoup de PAMs présentent une large gamme d'activité anti-infectieuse contre les bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que les champignons, les virus et les protozoaires unicellulaires <sup>184</sup>. En plus d'avoir une activité antimicrobienne directe, plusieurs PAMs affichent

une capacité à moduler les réponses immunitaires innées de l'hôte et, par conséquent, favorisent indirectement la clairance des agents pathogènes<sup>185,186</sup>. Les PAMs dans la nature sont produits soit par la traduction ribosomale de l'ARNm soit par la synthèse des peptides non-ribosomale<sup>187</sup>. Bien que les peptides non-ribosomiques soient principalement produits par des bactéries et des fungi, les PAMs synthétisés par voie ribosomique sont génétiquement codés et produits par tous les êtres vivants, y compris les bactéries<sup>187</sup>. Ces derniers présentent un fort potentiel thérapeutique et diffèrent des peptides d'origine non-ribosomique connus depuis plusieurs décennies et dont beaucoup sont utilisés comme antibiotiques tels que la pénicilline, les polymyxines et la gramicidine S<sup>182,184,187</sup>.

Ces dernières années, plusieurs PAMs issus de venins d'animaux ont été identifiés. Il existe des exemples prometteurs de PAMs déjà introduits sur le marché et de nombreux PAMs sont actuellement testés dans des essais cliniques, d'où l'intérêt accru de développer de nouveaux médicaments à base de PAMs dans plusieurs domaines<sup>184</sup>.

### III.3. Classification

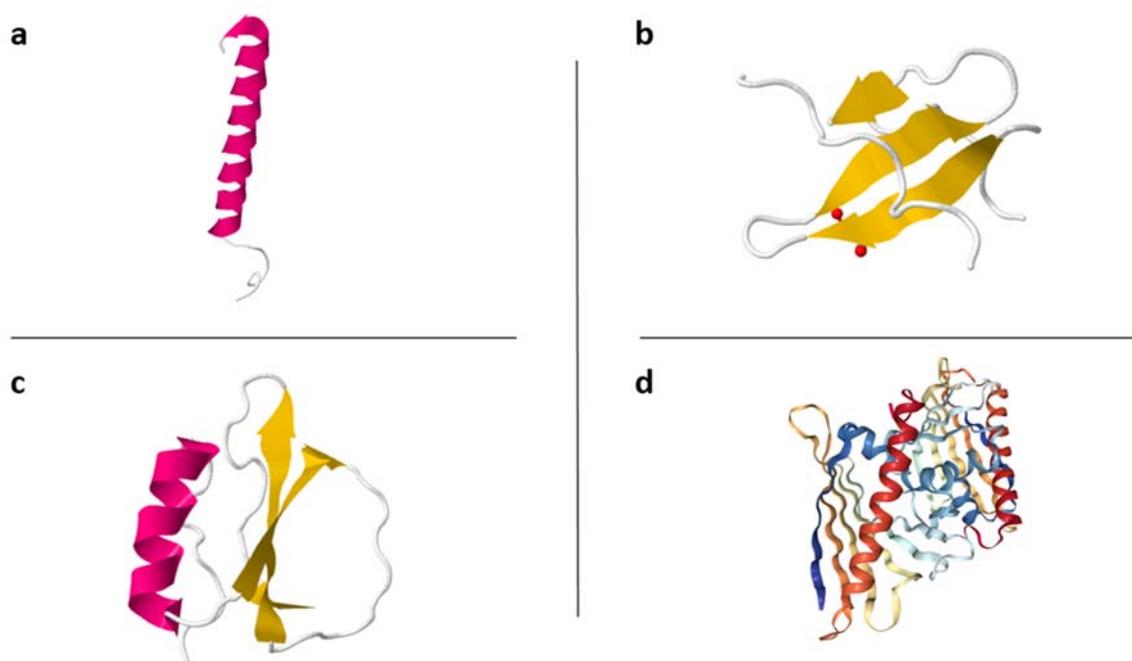
Par convention, les peptides sont des protéines de petites tailles qui sont composés de moins de 100 acides aminés. Les PAMs sont des polypeptides endogènes, généralement constitués de 10 à 50 acides aminés qui sont répartis en différents groupes selon leur composition en acides aminés, leur taille et leur conformation<sup>188-190</sup>.

La plupart des PAMs affichent une charge positive globale allant de +2 à +11 et contiennent une proportion importante, généralement 50%, de résidus hydrophobes<sup>84,184,185</sup>. Ces peptides cationiques sont généralement classés d'après leur structure secondaire en trois catégories<sup>184</sup>:

- (i) les peptides linéaires formant des hélices  $\alpha$ ,
- (ii) les peptides riches en cystéines et formant des feuillettes  $\beta$ ,
- (iii) les peptides à structure en  $\alpha\beta$  ou à structure étendue.

La plupart des PAMs appartiennent aux deux premières catégories (**Figure 17**)<sup>185</sup>.

On distingue également des peptides anioniques. Bien qu'ils ne présentent qu'une faible activité antibactérienne, ils pourraient être utilisés en compléments des peptides cationiques et améliorer leur activité<sup>192</sup>.



**Figure 17 : Structure secondaire et conformation des PAMs en 3D**<sup>178</sup>

a | Structure en hélice  $\alpha$ . b | Structure en feuillets  $\beta$ . c | Structure  $\alpha\beta$ . d | Structure étendue.

### III.3.1. Les peptides linéaires en hélice alpha

Les peptides  **$\alpha$ -hélicoïdaux** se caractérisent par leur petite taille inférieure à 40 acides aminés, l'absence de cystéines et par la présence parfois d'un coude au milieu<sup>116,191,192</sup>. En solution aqueuse, ils sont souvent linéaires. C'est au contact d'une membrane biologique qu'ils adoptent une structure hélicoïdale amphipathique (**Figure 17a**)<sup>84,184,193</sup>. L'activité des peptides cationiques en hélice  $\alpha$  repose sur leur charge nette positive qui favorise leur affinité pour des membranes phospholipidiques chargées négativement et un caractère amphiphile qui leur permet leur insertion<sup>84</sup>.

Les venins sont riches en PAMs structurés en hélice- $\alpha$ . On retrouve par exemple la mélittine dans le venin d'abeille, les magainines sur la peau de *Xenopus laevis* ou les meucines chez les scorpions<sup>86,194-196</sup>.

### III.3.2. Les peptides formant des feuillets bêta

Les peptides en **feuillets  $\beta$** , caractérisés par la présence de résidus de cystéines, sont stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfures et sont organisés pour créer une molécule amphipathique. En raison de leur structure rigide, les peptides en feuillets  $\beta$  sont plus organisés en solution

aqueuse et ne subissent pas de changement conformationnel drastique comme les peptides hélicoïdaux lors de l'interaction membranaire <sup>84,184</sup>.

### III.3.3. Les peptides à structure étendue

Les PAMs à **structure étendue** ou **aléatoire** représentent une petite partie des PAMs naturels. Ce sont des peptides enrichis en acides aminés spécifiques tels que l'arginine, la proline, le tryptophane et/ou l'histidine <sup>184,197,198</sup>. Ces peptides linéaires n'ont pas de conformation secondaire. Cependant, de la même manière que d'autres PAMs, ils peuvent se replier dans des structures amphipathiques après contact avec une membrane <sup>184,198</sup>.

La plupart des PAMs à structure étendue n'agissent pas contre les membranes bactériennes, mais ils peuvent exercer leur activité antimicrobienne en pénétrant à travers les membranes et en interagissant avec les protéines intracellulaires <sup>198</sup>.

Différentes études ont révélé que, outre la charge des peptides, d'autres caractéristiques pourraient être essentielles pour l'activité antimicrobienne et le mécanisme d'action <sup>184,192</sup>.

## III.4. **Caractéristiques qui affectent l'activité antimicrobienne**

### III.4.1. Caractéristiques peptidiques

Il existe différentes composantes structurelles interdépendantes qui déterminent l'activité antimicrobienne et la spécificité des PAMs <sup>84</sup>:

- **La taille** : La longueur d'un PAM est importante pour son activité. Il faut au moins 7-8 acides aminés pour former des structures amphipathiques avec des faces hydrophobes et hydrophiles sur les côtés opposés de la molécule peptidique. Pour traverser la bicouche lipidique des bactéries dans le modèle de « barrel-stave » (**voir section 3.5**), les PAMs  $\alpha$ -hélicoïdaux devraient être d'au moins 22 acides aminés, tandis que huit sont nécessaires pour les PAMs en feuillets- $\beta$  <sup>176,199</sup>. Outre les effets sur sa structure tridimensionnelle et son mode d'action, la longueur d'un PAM peut également affecter sa cytotoxicité.
- **La séquence** : Les peptides contiennent souvent des résidus d'acides aminés basiques lysine (K) ou arginine (R), des résidus hydrophobes alanine (A), leucine (L), phénylalanine (F) ou tryptophane (W) et d'autres résidus tels que l'isoleucine (I), la tyrosine (T) et la valine (V). Certains peptides contiennent des répétitions d'acides

aminés. Les rapports des résidus hydrophobes aux résidus chargés peuvent varier de 1:1 à 2:1.

- **La charge nette** : La charge nette des PAMs correspond à la somme de toutes les charges des groupes ionisables du peptide. Les peptides anioniques sont riches en acides aspartiques (D) et glutamiques (E). Les peptides cationiques sont riches en arginine (R) et en lysine (K). Les peptides anioniques qui sont complexés avec du zinc ou des peptides hautement cationiques sont souvent plus actifs que les peptides neutres ou ceux avec une charge plus faible. La charge positive des PAMs cationiques joue un rôle important dans l'attachement électrostatique aux composants anioniques des membranes bactériennes<sup>185</sup>. Il existe une relation directe entre les peptides, la charge positive nette et leur activité dans une gamme limitée qui diffère selon les peptides. Une diminution ou une augmentation au-delà de la limite entraîne une perte d'activité optimale<sup>200,201</sup>. En modifiant la charge nette d'un PAM, ses activités antimicrobiennes et hémolytiques peuvent être modifiées pour éliminer sélectivement les bactéries et minimiser les effets néfastes sur les cellules hôtes.
- **Conformation et structure** : La structure tridimensionnelle est l'un des facteurs qui détermine l'activité et la toxicité des PAMs en jouant un rôle dans la formation des pores après la fixation initiale des peptides aux membranes des micro-organismes<sup>201-203</sup>. Les PAMs peuvent prendre diverses structures secondaires. Les peptides  $\alpha$ -hélicoïdaux amphipathiques sont souvent plus actifs que les peptides avec des structures secondaires moins définies.
- **L'hélicité** : Elle représente la capacité d'un PAM à former une structure en hélice. Ce paramètre influe moins sur l'activité d'un PAM que d'autres facteurs présentés ci-dessus. Cependant, il peut influencer sur la toxicité à l'encontre des cellules eucaryotes<sup>204</sup>. La réduction de l'hélicité en incorporant des acides  $\alpha$ -aminés dans la séquence primaire a permis de diminuer l'effet hémolytique du peptide en maintenant l'effet antimicrobien<sup>205,206</sup>. Par ailleurs, l'hélicité est liée à la propension de chaque acide aminé dans la séquence primaire à former une hélice. Ainsi, la proline (P) et la glycine (G) ont des propensions de formation d'hélice inférieures par rapport à d'autres acides aminés<sup>207</sup>. Ces résidus ne sont donc pas préférés lors de la conception de PAMs  $\alpha$ -hélicoïdaux. En outre, les peptides doivent être suffisamment souples pour modifier leur conformation lors du processus d'insertion de la membrane<sup>176,208</sup>.

- **L'hydrophobicité** : Cette caractéristique permet à des PAMs hydrosolubles de se séparer dans la bicouche lipidique membranaire. Elle est définie comme le pourcentage de résidus d'acides aminés hydrophobes par rapport aux résidus d'acides aminés totaux. Environ 50% d'hydrophobicité est nécessaire pour une activité de PAM optimale vis-à-vis des membranes des micro-organismes et toute augmentation par rapport à ce pourcentage entraîne une perte de spécificité antimicrobienne des PAMs <sup>84</sup>.
- **L'amphiphilie** : Un PAM possède une nature amphiphile si l'ensemble de ses acides aminés hydrophiles sont alignés sur un côté et ses résidus d'acides aminés hydrophobes sont alignés le long du côté opposé. Le modèle d'étude le plus répandu sont les peptides  $\alpha$ -hélicoïdaux dont l'amphipathie est quantifiée sous forme de moment hydrophobe. D'autres peptides montrent souvent une séparation spatiale des résidus polaires et hydrophobes moins facile à quantifier. Des études ont montré que l'augmentation du moment hydrophobe augmentait non seulement l'activité des PAMs vis-à-vis des membranes chargées négativement des agents pathogènes, mais également l'activité hémolytique <sup>201,209</sup>.
- **L'angle polaire** : L'angle polaire correspond à la distribution relative des faces polaires par rapport à celles apolaires d'un peptide amphiphile  $\alpha$ -hélicoïdal. Lorsque les côtés polaires diminuent, la proportion de surfaces hydrophobes augmente entraînant une augmentation de l'activité contre les membranes des micro-organismes <sup>201,210</sup>.
- **La solubilité** : Pour que les PAMs puissent agir avec les membranes lipidiques ou y pénétrer ils doivent être solubles dans des environnements aqueux. S'ils s'agrègent, ils perdront leur capacité à interagir avec la membrane bactérienne <sup>116</sup>.

Les différences de susceptibilité d'un seul micro-organisme à un panel de peptides antimicrobiens indiquent que la taille, la séquence, la structure, la charge, l'hydrophobicité globale, l'amphipathie et les largeurs respectives des faces hydrophobes et hydrophiles de l'hélice sont tous importants <sup>113,116,192</sup>. La modification de l'un des paramètres ci-dessus, y compris le moment hydrophobe et l'angle polaire, peut modifier l'activité antimicrobienne et hémolytique des peptides <sup>116,211</sup>. Ces paramètres étant étroitement liés, la modification de l'un d'entre eux peut entraîner des changements importants dans les autres <sup>116,191</sup>. Le nombre de modifications pouvant être effectuées pour développer le PAM idéal est donc limité.

### III.4.2. Caractéristiques bactériennes

La composition de la surface microbienne et de la membrane cytoplasmique est également importante<sup>194,212</sup>. Une partie de la résistance antimicrobienne innée est liée à la structure et à la composition des LPS présents au niveau de la membrane externe des bactéries Gram négatives, des acides teichoïques du PDG des bactéries Gram positives et à celles des phospholipides de la membrane cytoplasmique<sup>114</sup>. Ainsi, les bactéries avec des membranes cytoplasmiques enrichies en phospholipides acides sont plus sensibles aux peptides antimicrobiens<sup>116,213</sup>.

Enfin, l'activité et de la spécificité des peptides antimicrobiens dépend des conditions physiologiques *in vivo* (pH, température, fluidité membranaire)<sup>116</sup>.

### III.5. **Mode d'action des peptides antimicrobiens**

De nombreux PAMs ont une activité antimicrobienne directe et rapide en perturbant l'intégrité de la membrane bactérienne et/ou en diffusant à travers cette dernière jusqu'au cytoplasme pour agir sur des cibles intracellulaire<sup>184,185</sup>. L'interaction des PAMs avec les membranes bactériennes constitue donc un facteur clé pour l'activité antimicrobienne directe des PAMs.

#### III.5.1. Spécificité du mode d'action des PAMs avec la membrane bactérienne

Une des raisons pour lesquelles la membrane bactérienne constitue une cible majeure des PAMs est le fait qu'elle soit arrangée différemment des membranes de mammifères<sup>214-216</sup>. En effet, les différences fondamentales entre les membranes microbiennes et celles des cellules eucaryotes protègent ces dernières contre les PAMs et permet une action sélective de ces peptides<sup>84</sup>.

La membrane cytoplasmique procaryote est riche en phospholipides anioniques : PG, CL et PS qui sont très attractifs pour les PAMs cationiques, en particulier. Les composants anioniques de l'enveloppe bactérienne, LPS et LTA, fournissent en outre une charge électro-négative à la surface bactérienne<sup>184</sup>.

Contrairement aux bactéries, la membrane cytoplasmique des cellules de mammifères est riche en phospholipides zwitterioniques tels que la PE, la PC et la SM induisant une charge nette neutre<sup>84</sup>. Il existe également une répartition asymétrique des phospholipides dans les membranes de mammifères, les phospholipides zwitterioniques étant présents dans la couche

externe, tandis que les phospholipides anioniques, le cas échéant, sont localisés dans le feuillet interne tournée vers le cytoplasme<sup>84,165,188</sup>. Par conséquent, les interactions entre les PAMs et la membrane cellulaire mammifère se produisent principalement par des interactions hydrophobes, qui sont relativement faibles par rapport aux interactions électrostatiques qui existent entre les PAMs et les membranes bactériennes. En outre, les cellules eucaryotes, contrairement à celles des procaryotes, ont une teneur élevée en cholestérol<sup>84,188</sup>. Ce dernier réduirait l'activité des PAMs via la stabilisation de la bicouche des phospholipides<sup>165</sup>. Un potentiel de membrane négatif plus fort dans les bactéries peut également contribuer à la sélectivité des PAMs entre les cellules bactériennes par rapport aux mammifères<sup>84,184</sup>.

### III.5.2. Mode d'actions des PAMs cationiques

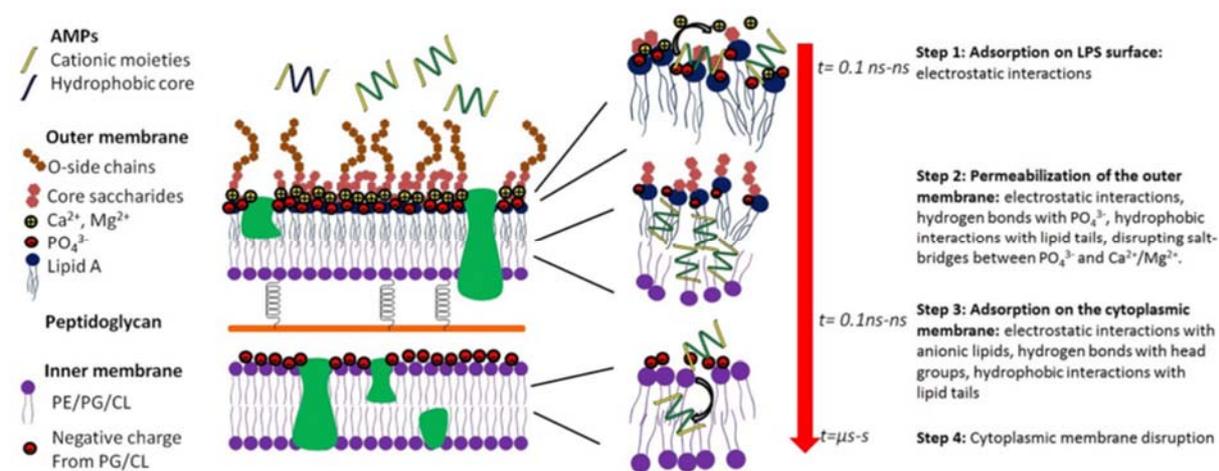
Comme nous l'avons vu, bien que les PAMs diffèrent en séquence et en structure, la majorité partagent des caractéristiques communes, qui sont leur charge cationique globale, une fraction significative de résidus hydrophobes et le caractère amphipathique qui en résulte. Ce sont les propriétés cationiques qui favorisent la liaison préférentielle des PAMs à la membrane cytoplasmique bactérienne chargée négativement au lieu de la membrane zwitterionique des cellules de mammifères<sup>198</sup>. Lorsque le PAM atteint l'interface de la membrane lipidique du micro-organisme cible, il prend une conformation amphipathique due aux résidus hydrophobes, permettant ainsi son intégration dans la membrane ou la traversée de celle-ci<sup>217-219</sup>. Bien que la plupart des PAMs perturbent l'intégrité de la membrane cytoplasmique, certains diffusent simplement à travers la membrane pour cibler des processus intracellulaires tels que l'ADN, l'ARN et la synthèse des protéines<sup>220-222</sup>.

#### *III.5.2.1. Diffusion des PAMs jusqu'à la membrane cytoplasmique*

Pour que les PAMs perturbent la membrane cytoplasmique, ils doivent d'abord s'accumuler à la surface de celle-ci jusqu'à atteindre une concentration critique<sup>86,89</sup>. Cependant, la paroi des bactéries constitue une barrière de protection. Les bactéries didermes paraissent donc plus enclins à résister à l'action des agents antimicrobiens que les Gram positives. Pour ces dernières, les PAMs doivent seulement diffuser à travers les pores de taille nanométrique au sein des couches de peptidoglycane<sup>83,223</sup>. Les interactions favorables entre les acides teichoïques anioniques et les PAMs cationiques peuvent faciliter leur accumulation à la surface de la membrane cytoplasmique<sup>86,224</sup>. De surcroît, l'enveloppe des bactéries Gram positives est

enrichie de protéines de surface qui jouent un rôle d'adhésion et de reconnaissance de composés présents dans la matrice extracellulaire <sup>83</sup>.

En revanche, pour agir sur la membrane interne des bactéries Gram négatives, les PAMs doivent dans un premier temps perméabiliser ou perturber la membrane externe avant de diffuser à travers le PDG et de s'accumuler dans l'espace périplasmique. Chez les bactéries Gram négatives, l'oligosaccharide principal et le groupe phosphate des LPS présentent une charge négative, impliquant une forte affinité des LPS pour les cations <sup>93</sup>. Les molécules de LPS forment également un ensemble non fluide qui constitue une barrière très efficace contre les molécules hydrophobes. Par ailleurs, les porines présentent au niveau de la membrane externe permettent la diffusion passive de petites molécules hydrophyles (< 700 Da). Ceci, associé aux LPS font de la membrane externe une barrière très efficace, pourtant perméable sélectivement à certaines molécules <sup>83,94</sup>.



**Figure 18 : Evènements moléculaire clés des PAMs conduisant à la mort des bactéries Gram négatives.**

**Etape 1 :** Adsorption des PAMs à la surface de la membrane. Cette étape est très rapide (de l'ordre de la nanoseconde) et conduite par des interactions électrostatiques. **Etape 2 :** Perméabilisation de la membrane externe. Elle est médiée par des interactions complexes telles qu'électrostatiques, hydrophobes et des liaisons hydrogènes. **Etape 3 :** Les PAMs diffusent à travers l'espace périplasmique et s'adsorbent au niveau de la membrane cytoplasmique – Interactions électrostatiques avec les phospholipides anioniques, liaison hydrogène avec la tête polaire et interactions hydrophobes avec la queue lipidique. **Etape 4 :** Perturbation de la membrane cytoplasmique qui conduit à une perte du potentiel transmembranaire, un influx d'eau et à la mort de la bactérie <sup>86</sup>.

Le mode détaillé des interactions entre les PAMs et la membrane externe des bactéries Gram négatives est mal compris en raison de la structure complexe des molécules LPS (**Figure 18**) <sup>86</sup>. Cette membrane externe constitue une barrière de perméabilité pour de nombreuses macromolécules, en partie en raison des cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  qui se lient aux groupes

phosphate du noyau interne de LPS et fournissent ainsi une stabilisation du feuillet externe<sup>225</sup>. L'événement initial est l'adsorption à la surface de la membrane externe, qui peut se produire en quelques dizaines de nanosecondes et est largement médiée par des interactions électrostatiques entre les PAMs cationiques et les molécules de LPS anioniques<sup>226</sup>. En raison d'une plus grande affinité pour le LPS, les PAMs déplacent les cations divalents et se lient au LPS. Les PAMs, plus volumineux, provoquent alors des fissures transitoires et perméabilisent la membrane externe, permettant ainsi le passage du peptide lui-même à travers la membrane. En plus des forces électrostatiques, les fragments hydrophobes d'un PAM peuvent également interagir avec les queues lipidiques de la molécule LPS, déstabilisant davantage l'étanchéité à la membrane externe<sup>86,184</sup>.

#### *III.5.2.2. Adsorption des PAMs à la membrane cytoplasmique*

Lorsque les peptides ont atteint la membrane cytoplasmique, ils peuvent interagir avec la bicouche lipidique.

En contact avec la membrane cytoplasmique, les PAMs adoptent une structure secondaire amphipathique essentielle à l'interaction avec la membrane cellulaire. Les résidus chargés du peptide s'adsorbent et s'insèrent au niveau des têtes phospholipidiques dans un état inactif. Cet état de surface S, étire la membrane, tandis que les domaines hydrophobes du peptide interagissent avec le noyau hydrophobe de la bicouche lipidique, ce qui entraîne le PAM plus profondément dans la membrane<sup>116,184,227,228</sup>.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire les événements se produisant au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne, conduisant finalement à la mort cellulaire.

#### *III.5.2.3. Mécanismes de mort bactérienne*

Lorsqu'ils sont présents à la surface de la membrane cytoplasmique, plusieurs mécanismes de mort bactérienne peuvent intervenir. La plupart des PAMs, de natures cationiques principalement, interagissent avec la membrane impactant son intégrité. D'autres PAMs, peuvent induire la mort bactérienne en inhibant des fonctions intrabactériennes essentielles. Ceci peut se réaliser par interaction avec des récepteurs présents à la surface de la membrane cytoplasmique ou en diffusant à travers la membrane en modifiant plus ou moins son intégrité<sup>86,116</sup>.

**III.5.2.3.a. Déstabilisation de la membrane cytoplasmique : Modèles moléculaire de formation de pores**

Un certain nombre de PAMs induisent la mort bactérienne par perméabilisation de leur membrane cytoplasmique (**Tableau 3**). La durée de la formation des pores varie de microsecondes à secondes. Les pores membranaires entraînent la perte de potentiel membranaire et la libération rapide des composants intracellulaires pouvant conduire à la mort

**Tableau 3 : Exemple de PAMs issus de venins d'animaux induisant une perméabilisation membranaire <sup>86</sup>.**

PAMs	Origine	Séquence	Mécanisme
<b>Maculatine 1.1</b> 229,230	<i>Litoria genimaculata</i> , Amphibien	GLFVGVLAKVAAHVVPVIAAEHF	Pores
<b>Caerine 1.1</b> <sup>229</sup>	<i>Litoria splendida</i> , amphibien	GLLSVLGSVAKHVLPVVPVIAEHL	Pores
<b>Magainine H2</b> 231,232	Analogue magainin, <i>Xenopus laevis</i>	IHKKFLHSIWKFGKAFVGEIMNI	Pores
<b>Melittine</b> <sup>233-236</sup>	<i>Apis</i> spp, insecte	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	Pores toroïdaux
<b>Pardaxine 1</b> 237,238	<i>Pardachirus marmoratus</i> , poisson	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGEQE	Pores « barrel-stave »
<b>Citropine 1.1</b> 229	<i>Litoria citropa</i> , Amphibien, Australie	GLFDVIKKVASVIGGL	Carpet
<b>Aureine 1.2</b> 229,239	<i>Litoria raniformis</i> , Amphibien, Australie	GLFDIIKKIAESF	Carpet

A faible rapport peptide/lipide, les peptides sont liés parallèlement à la bicouche lipidique et sont dans un état S inactif qui induit la détente et l'amincissement de la membrane <sup>116,233</sup>. Le volume total de la membrane étant sensiblement constant, l'amincissement de la membrane entraîne une expansion latérale de celle-ci, affectant ces propriétés mécaniques. La tension superficielle augmente et le module de courbature diminue<sup>b</sup> : la membrane se déforme <sup>86,240,241</sup>. L'expansion de la membrane entraîne également une réduction de l'empaquetage des molécules lipidiques conduisant à la formation d'un grand nombre de cavités, ce qui réduit considérablement l'énergie libre de translocation des molécules d'eau dans la région de la queue

<sup>b</sup> La compression du feuillet interne et l'expansion du feuillet externe diminuent.

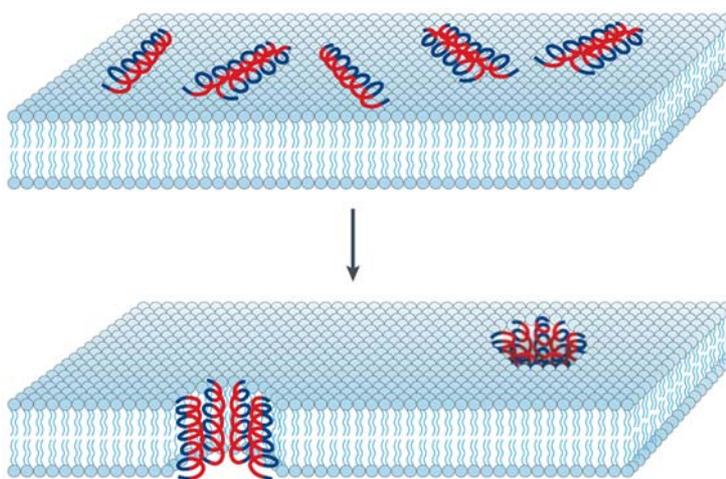
lipidique. En conséquence, un grand nombre de translocations d'eau se produisent et la membrane fuit. Le potentiel transmembranaire diminue et des dysfonctionnements supplémentaires de la membrane se produisent, tels que l'inhibition de la production d'ATP et la perte de force proton-motrice entraînant la mort rapide de la bactérie<sup>86,242</sup>. L'ampleur de l'amincissement de la membrane est spécifique du peptide et directement proportionnelle à sa concentration<sup>116</sup>.

Au fur et à mesure de l'accumulation du peptide ce ratio augmente et les peptides commencent à s'orienter verticalement à la membrane. A des rapports élevés les peptides orientées perpendiculairement peuvent s'insérer dans la bicouche et former des pores transmembranaires, appelé état I ou entraîner une déstabilisation de la membrane. Le rapport peptide/lipide à l'état I varie avec la composition lipidique cible et peptidique<sup>116,243</sup>.

Trois mécanismes sont actuellement proposés pour décrire les processus de déstabilisation membranaire, par formation de pores ou désintégration.

*i. Modèle « barrel stave » : modèle du tonneau*

Le modèle « barrel-stave » ou du tonneau se traduit par la formation de pores transmembranaires hydrophiles (**Figure 19**). Les peptides en hélice  $\alpha$  attachés à la membrane s'accumulent et s'insèrent perpendiculairement dans la bicouche lipidique. Le recrutement de peptides supplémentaires entraîne, par la suite, la formation d'un pore transmembranaire en « forme de tonneau » constitué de peptides hélicoïdaux<sup>86,244,245</sup>. Les régions hydrophobes des PAMs cationiques s'alignent avec le cœur lipidique de la bicouche tandis que les régions hydrophiles sont orientées à la lumière du pore<sup>246,247</sup>. Dans ce modèle, la membrane électronique ne présente pas de



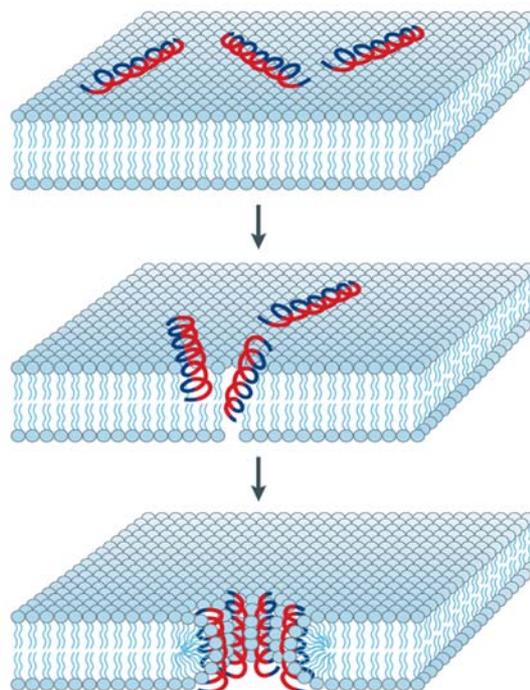
**Figure 19 : Mort bactérienne induite par déstabilisation de la membrane cytoplasmique selon le modèle "barrel-stave".**

Dans ce modèle, les peptides attachés s'accumulent et s'insèrent dans membrane cytoplasmique de sorte que les régions peptidiques hydrophobes (en bleu) s'alignent avec le cœur lipidique de la bicouche et les régions peptidiques hydrophiles (en rouge) forment la région intérieure du pore<sup>116</sup>.

courbure significative et l'hydratation de la membrane reste inchangée<sup>86,234</sup>. Par ailleurs, les interactions électrostatiques et hydrophobes sont nécessaires. La structure en hélice- $\alpha$  amphiphile permet aux PAMs d'interagir avec les têtes polaires et les queues aliphatiques<sup>86,244,245</sup>

## ii. Modèle des pores toroïdaux

Dans le modèle toroïdal, les molécules peptidiques maintiennent une orientation principalement parallèle à la membrane<sup>232,247</sup>. Les résidus polaires des peptides s'associent aux têtes polaires des lipides<sup>116,248</sup>. Contrairement au modèle « barrel-stave », les peptides restent associés aux têtes lipidiques même lors de leur insertion perpendiculaire dans la membrane<sup>116,233</sup>. Ainsi, au fur et à mesure que les PAMs s'insèrent dans la membrane, les têtes polaires des lipides sont entraînées au niveau du cœur lipidique de la bicouche, entraînant un repliement de la monocouche lipidique sur elle-même jusqu'à la formation de pore (à la forme toroïdale) tandis que les queues lipidiques sont éloignées de la surface du pore. Ce mécanisme induit un désordre lipidique important et un changement de courbure de la membrane<sup>226,234</sup>. Un noyau d'eau est formé au centre du pore entouré des têtes phospholipidiques qui forment la paroi du pore (**Figure 20**)<sup>247,249,250</sup>.



**Figure 20: Mort bactérienne induite par déstabilisation de la membrane cytoplasmique selon le modèle "des pores toroïdaux".**

Dans ce modèle, les peptides attachés s'agrègent et induisent un repliement de la monocouche lipidique à doublement à la fois par les peptides insérés et les têtes polaires des lipides. Les régions hydrophiles du peptide sont colorées en rouge et les régions hydrophobes du peptide sont colorées en bleu<sup>116</sup>.

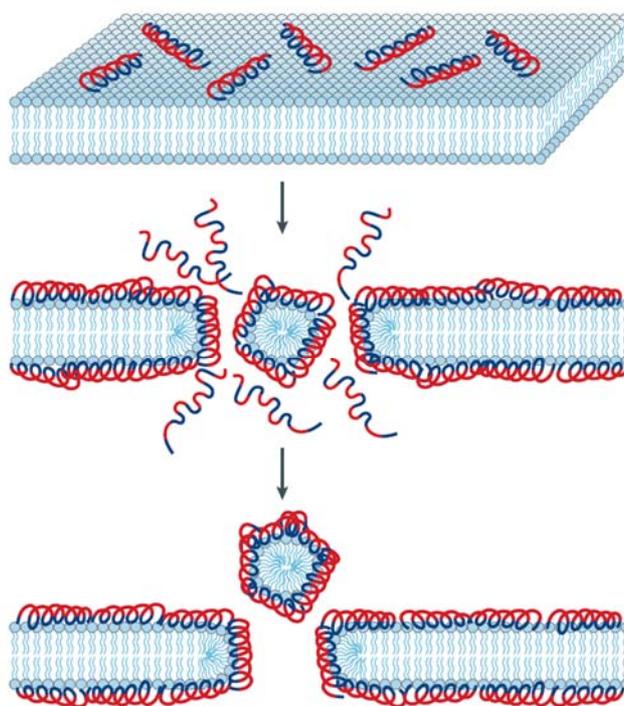
Dans ce mécanisme ce sont les interactions électrostatiques qui sont privilégiées puisque la surface des pores toroïdaux est couverte par les groupes de tête phosphate et les molécules antimicrobiennes ont un contact moins hydrophobe avec les queues lipidiques<sup>86,244,245</sup>.

Beaucoup de PAMs en feuillets- $\beta$  exercent leurs activités antimicrobiennes en formant des pores toroïdaux. Ils sont perpendiculairement insérés ou inclinés dans la bicouche lipidique et

les régions hydrophiles des peptides sont associées aux groupes de tête polaire des membranes  
198.

### iii. Modèle « carpet-like » : modèle du tapis

Tous les PAMs, n'affectent pas l'intégrité de la membrane en formant des pores<sup>86</sup>. Dans le modèle du tapis ou « carpet model », les peptides sont électrostatiquement attirés par les têtes anioniques des phospholipides. Ils s'adsorbent en recouvrant la surface membranaire tel un tapis<sup>116,251,252</sup>. Lorsque la quantité de PAMs sur la surface membranaire atteint une concentration seuil, la bicouche se désintègre sous forme de micelles, conduisant à la lyse cellulaire (**Figure 21**)<sup>184,190</sup>. Dans ce modèle, le feuillet externe est couvert par une forte concentration superficielle de molécules antimicrobiennes, alors que le feuillet interne est exempt de liaison avec les PAMs. Le grand déséquilibre de la charge et de la tension superficielle à travers la membrane entraîne finalement une rupture de la bicouche phospholipidique et une fuite du contenu cytoplasmique, des ions et des biomolécules. En revanche, dans les mécanismes de formation de pores, seules les molécules intracellulaires plus petites que les pores peuvent sortir<sup>86</sup>.

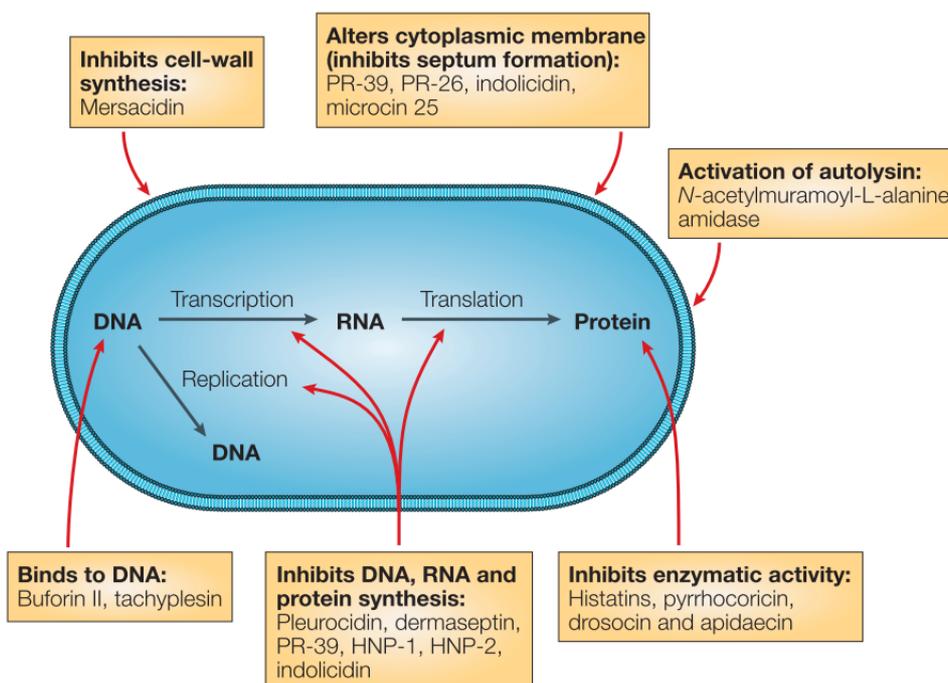


**Figure 21 : Mort bactérienne induite par déstabilisation de la membrane cytoplasmique selon le modèle "carpet" ou du tapis.**

Dans ce modèle, les peptides perturbent la membrane en s'orientant parallèlement à la surface de la bicouche lipidique en formant un tapis. Les régions hydrophiles du peptide sont représentées en rouge, les régions hydrophobes sont représentées en bleu<sup>116</sup>.

III.5.2.3.b. *Inhibition des fonctions intracellulaires*

Bien que beaucoup de PAMs agissent en compromettant l'intégrité structurelle et/ou fonctionnelle des membranes bactériennes, certains peuvent avoir des modes d'action supplémentaires ou alternatifs. En effet, des études ont montré que certains PAMs pouvaient tuer leurs cellules cibles sans causer la perméabilisation de leur membrane. Cette observation suggère l'existence d'autres mécanismes d'action. Certains PAMs sont ainsi capables d'interagir avec la membrane cytoplasmique et d'altérer des fonctions intrabactériennes essentielles<sup>176,253,254</sup>. D'autres, ont développé des mécanismes pour se transloquer jusqu'au cytoplasme sans altérer la membrane. Une fois dans le cytoplasme, ces peptides peuvent altérer la formation de la membrane interne, inhiber la synthèse de la paroi, d'acides nucléiques, de protéines et/ou inhiber l'activité enzymatique (**Figure 22**)<sup>190</sup>.



**Figure 22 : Modes d'actions intra-bactérien des PAMs<sup>116</sup>.**

Dans cette figure, *E. coli* est présentée comme micro-organisme cible.

i. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi est une structure essentielle à la bactérie. Elle lui confère sa forme, la protège de la lyse lors de fortes pressions osmotiques et des « agressions » extérieures. Elle permet également l'ancrage des composants membranaires et des protéines extracellulaires et peut ainsi conférer

à la bactérie ses propriétés antigéniques et/ou sa pathogénicité. L'altération directe ou indirecte d'une ou plusieurs de ces fonctions par les peptides antimicrobiens compromet fortement la viabilité de la bactérie. Bien que différentes, le PDG est un élément commun à toutes les bactéries. Composant principal de la paroi des organismes Gram-positifs disposé en plusieurs couches, il est également présent en couche mince dans les organismes Gram-négatifs. Par ailleurs, le peptidoglycane étant un élément absent des cellules eucaryotes, les composés qui inhibent sa synthèse sont des cibles intéressantes pour la thérapeutique. Ainsi, le lipide II<sup>a</sup>, qui est un précurseur important de la synthèse du peptidoglycane, s'est révélé être une cible attrayante des composés antibactériens (*e.g.* plusieurs lantibiotiques, les nisines et la plectasine)<sup>115,190</sup>. De même, certains PAMs peuvent se lier aux lipides III et IV et ainsi interférer avec la biosynthèse des acides teichoïques et lipoteichoïques. D'autres peuvent stimuler l'activité des autolysines<sup>b</sup>, induisant des dommages au niveau de la paroi pouvant conduire à une lyse et une mort cellulaire subséquente<sup>190</sup>.

En raison du rôle principal de la paroi dans l'intégrité bactérienne, et de son absence dans les cellules de mammifères, cette structure devient une excellente cible dans la recherche de nouveaux médicaments antimicrobiens. En outre, un PAM peut avoir plusieurs mécanismes d'action conduisant à la mort des micro-organismes. Ainsi, les mécanismes combinatoires de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire et de la rupture de la membrane cellulaire observés pour certains PAM pourraient réduire l'émergence de micro-organismes résistants<sup>190</sup>.

#### ii. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines

Certains PAMs peuvent être transloqués dans le cytoplasme, soit par perméabilisation de la membrane, soit spontanément, soit au moyen de transporteurs membranaires. Accumulés dans le cytoplasme, ils peuvent se lier aux molécules polyanioniques intracellulaires abondantes, telles que les acides nucléiques et les protéines.

---

<sup>a</sup> Le lipide II, synthétisé dans le cytoplasme, est ensuite transloqué vers l'extérieur de la membrane plasmique avant l'incorporation de son unité disaccharide-peptide dans le peptidoglycane. C'est une cible relativement accessible pour les antibiotiques. Ces antibiotiques combattent les bactéries en inhibant directement la synthèse du peptidoglycane ou en se liant au lipide II pour former des pores destructeurs dans la membrane cytoplasmique.

<sup>b</sup> Les autolysines sont des enzymes bactériennes endogènes qui dégradent localement le PDG pour permettre la croissance et la division cellulaire. Chez les bactéries Gram +, elles sont régulées avec les acides teichoïques.

La majorité des PAMs dirigés contre des processus intracellulaires bactériens ciblent les acides nucléiques. Les PAMs chargés positivement interagissent avec les groupes phosphates des acides nucléiques chargés négativement <sup>255</sup>. Lorsqu'ils sont liés à l'ADN, ils inhibent sa réplication et/ou le processus de transcription en ARN et donc de traduction en protéines. Il en est de même pour les PAMs interagissant avec les ARNs.

Par ailleurs, les PAMs peuvent agir directement sur les protéines en particulier celles associées à plusieurs processus métaboliques <sup>255</sup>. Ils peuvent notamment inhiber leur activité en intervenant lors du processus de repliement <sup>184</sup>.

Enfin, les enzymes peuvent également être inactivées ou modifiées par leur action. Par exemple, certains PAMs ciblent l'ADN gyrase<sup>c</sup> induisant ainsi l'inhibition de la réplication de l'ADN <sup>190,256</sup>.

A ce jour, la majorité des PAMs cationiques, induisent la mort bactérienne par perméabilisation de la membrane. D'autres, exercent leur activité antibactérienne en inhibant des processus essentiels à la bactérie. Parmi ceux capables de diffuser jusqu'au cytoplasme sans perméabiliser la membrane, la majorité ne ciblent que les acides nucléique (ADN ou ARN). Cependant, les PAMs ont généralement de multiples cibles plutôt qu'une cible unique. Il est ainsi suggéré que la mort bactérienne causée par les PAMs pourrait résulter d'actions multiples et complémentaires, appelées mécanismes multi-hit. Cette stratégie contribue à accroître l'efficacité des PAMs et à échapper au développement de la résistance <sup>84,184,198,257</sup>.

### **III.6. Mécanismes de résistance aux PAMs**

Bien que les PAMs présentent différents mécanismes, leur action est majoritairement dirigée contre la membrane bactérienne, un élément conservé au cours de l'évolution des bactéries <sup>84,86</sup>. Elle définit leur phénotype. Des mutations membranaires sont donc coûteuses pour les bactéries. Ainsi, contrairement aux antibiotiques à petites molécules les PAMs sont moins susceptibles d'induire une résistance antibactérienne <sup>86,165</sup>. De plus, la plupart des PAMs sont

---

<sup>c</sup> Enzyme de la famille des ADN topoïsomérase de classe II, capable d'introduire un surenroulement négatif dans l'ADN. Protéine spécifique des bactéries, essentielle à la réplication de leur ADN.



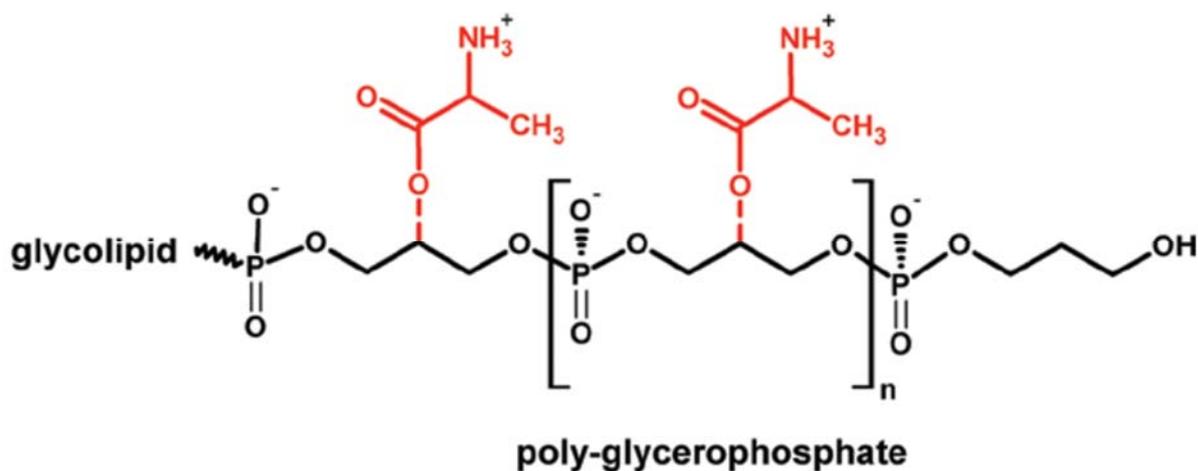
III.6.1. Modification de l'enveloppe bactérienneIII.6.1.1. *Modification des charges nettes de surface*

Un mécanisme commun de résistance aux PAMs chez les bactéries est l'incorporation de molécules chargées positivement au niveau de leur paroi afin de réduire l'interaction et la liaison des PAMs cationiques<sup>258</sup>. Chez les bactéries Gram négatives, l'une des stratégies conduisant à la résistance bactérienne consiste à masquer la charge négative du lipide A du LPS en ajoutant des composés contenant des amines tels que le phosphoéthanolamine (pEtN) et le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N). De même, la principale stratégie utilisée par les bactéries Gram-positives consiste à réduire les charges négatives présentes à leur surface<sup>190,260</sup>. Le système capteur/régulateur GraRS détecte les PAMs présents dans l'environnement et induit une résistance en activant la D-alanylation des acides teichoïques, l'incorporation de lysylphosphatidylglycérol (Lys-PG) dans la membrane bactérienne et l'activation du transporteur PAM vraFG<sup>258,261</sup>. La D-alanylation des acides teichoïques et l'incorporation de L-lysine au niveau des PGs du feuillet externe de la membrane cytoplasmique sont respectivement médiées par l'opéron *dlt* et par le produit du gène *mprF*<sup>190,258</sup>.

III.6.1.1.a. Modification des acides teichoïques par D-alanylation

Chez les bactéries Gram-positives, les premiers sites de contact sont les acides teichoïques (ATs) de la paroi cellulaire. Les changements dans leur structure représentent la première ligne de défense pour neutraliser l'activité des PAMs<sup>262</sup>. L'une des stratégies de résistance est l'incorporation de molécules chargées positivement au niveau des ATs<sup>263</sup>. Bien que critiques pour la fonction cellulaire, les propriétés anioniques des ATs en font une cible pour les PAMs cationiques. La résistance aux PAMs est ainsi souvent conférée de manière transitoire par D-alanylation des ATs qui réduisent la charge négative globale de la paroi (**Figures 23 et 24**). Ce processus est réalisé par 4 protéines codées par l'opéron *dlt* en réponse à des concentrations faibles en cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) et à la présence de PAMs cationiques<sup>258,262,264</sup>. Les produits de l'opéron *dlt*, qui englobe les gènes *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD*, transportent la D-alanine du cytoplasme vers la surface des acides teichoïques<sup>265</sup>. Le squelette des ATs et des LTAs est fortement chargé par des groupes phosphate déprotonés et l'estérfication avec une D-alanine provoque une réduction de la charge négative nette en ajoutant des groupes amino basiques ( $-NH^{3+}$ )<sup>116</sup>. L'inactivation de l'opéron *dlt* entraîne une susceptibilité accrue aux PAMs chez *S. aureus*, *Bacillus subtilis* et d'autres bactéries Gram positives<sup>258,265,266</sup>.

D'autres études suggèrent que la D-alanylation induirait une augmentation de la densité de la paroi cellulaire altérant la pénétration des PAMs<sup>190,267</sup>.

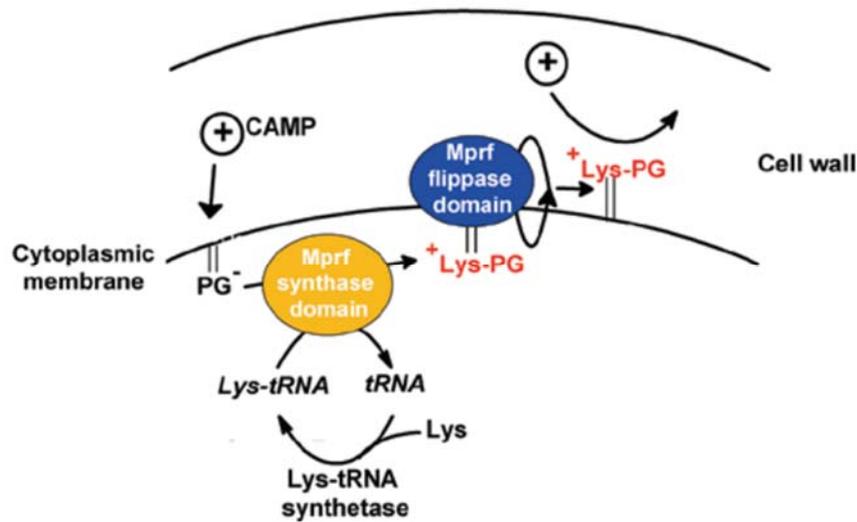


**Figure 24 : Addition de D-alanine à l'acide lipoteichoïque.**

Le LTA est intégré par un poly-glycocérophosphate (Gro-P) ancré au glycolipide. Dans cette représentation, la structure du glycolipide a été omise. L'ajout de D-alanine (rouge) à la partie Gro-P du LTA (noir) augmente sa charge positive et contribue à une réduction de la charge nette négative<sup>262</sup>.

### III.6.1.1.b. Modification des phospholipides de la membrane cytoplasmique

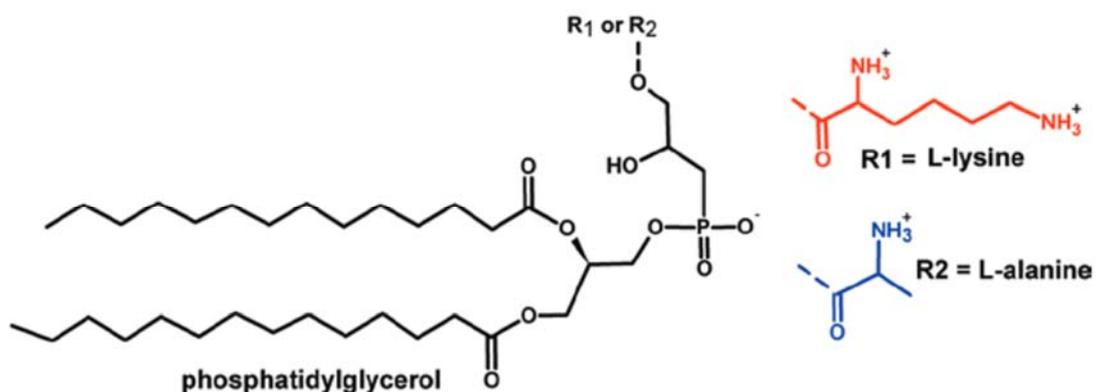
Une autre stratégie utilisée par les bactéries consiste à réduire la charge nette de leur membrane cytoplasmique en modifiant sa composition riche en phospholipides anioniques (**Figure 23**)<sup>222</sup>. L'ajout de molécules de L-lysine et/ou de L-alanine chargées positivement sur les PGs aboutit à la formation de Lys-PG chargé +1 et Ala-PG zwitterionique. Cette addition est médiée par le facteur MprF (Multiple peptide resistance Factor) codé par le gène *mprF*<sup>190,267-269</sup>. MprF est présent dans divers génomes bactériens. Cette protéine transmembranaire est constituée de deux domaines fonctionnels séparables mais nécessaires au phénotype de résistance. Le domaine cytoplasmique hydrophile C-terminal ou Mprf synthétase, transfère la L-lysine ou L-alanine à partir du lysyl- ou alanyl-ARNt sur les PGs pour former le lys-phosphatidylglycérole (Lys-PG) ou ala-phosphatidylglycérole (Ala-PG). Le domaine N-terminal hydrophobe permet de transloquer le Lys-ou Ala-PG vers le feuillet externe de la membrane cytoplasmique (**Figures 25 et 26**)<sup>262,270</sup>.



**Figure 25 : Mode d'action de MprF chez *S. aureus*.**

Le domaine MprF synthase (orange) synthétise du Lys-PG à partir de LYS-ARNt et PG, et le domaine MprF flippase (bleu) traduit le Lys-PG sur la couche externe de la membrane cytoplasmique. La résistance aux PAMs n'est obtenue par répulsion de charge seulement lorsque les deux domaines sont actifs <sup>262,270</sup>.

La majorité des bactéries Gram + produisent des Lys-PGs alors que les Gram - préfèrent l'ajout de L-alanine. Certaines bactéries produisent uniquement Lys-PG (*e.g. Staphylococci*) ou Ala-PG (*e.g. P. aeruginosa*) alors que d'autres produisent les deux, Lys-PG et Ala-PG (*e.g. Clostridium perfringens*) <sup>271-273</sup>. *E. faecium* produit même en plus de l'arginyl-PG en réponse à la daptomycine <sup>274</sup>. En plus de réduire la charge nette négative de la membrane, les phosphatidylglycérols aminoacylés (par exemple lys-PG) stabilisent la membrane cellulaire <sup>222,275</sup>.



**Figure 26 : Modification de la charge nette de la membrane cytoplasmique bactérienne par addition de L-lysine ou de L-alanine sur du phosphatidylglycérol.**

Les modifications du phosphatidylglycérol (noir) sont effectuées par R1 (L-lysine -en rouge) ou R2 (L-alanyl, -en bleu). La lysyl-phosphatidylglycérol synthase (Lys-PGS) et l'alanyl phosphatidylglycérol synthase (Ala-PGS), respectivement, régulent l'addition de L-lysine et L-alanyl sur du phosphatidylglycérol <sup>262</sup>.

*III.6.1.1.c. Modification du LPS*

Pour réduire leur susceptibilité aux PAMs, les bactéries Gram - peuvent également empêcher leur fixation à la membrane externe en réduisant les charges nettes de surface.

La modification des groupes phosphate du lipide A avec des substituants aminés, tels que le phosphoéthanolamine (pEtN) ou le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N), réduit la charge négative nette globale du LPS, diminuant ainsi son affinité pour les PAMs cationiques <sup>262</sup>.

L'addition de pEtN au lipide A est régulée par l'opéron *pmrAB* via les gènes *pmrC* et *CptA*. Leurs produits, des phosphoéthanolamine transférases, contrôlent l'addition du pEtN sur le lipide A. *PmrC* médie l'addition de pEtN au squelette dissaccharidique du lipide A aux positions C1 et C4' des groupes phosphate (**Figure 27**) et *CptA* sur le phosphate de l'heptose 1 du core lipopolysaccharidique <sup>259,262</sup>.

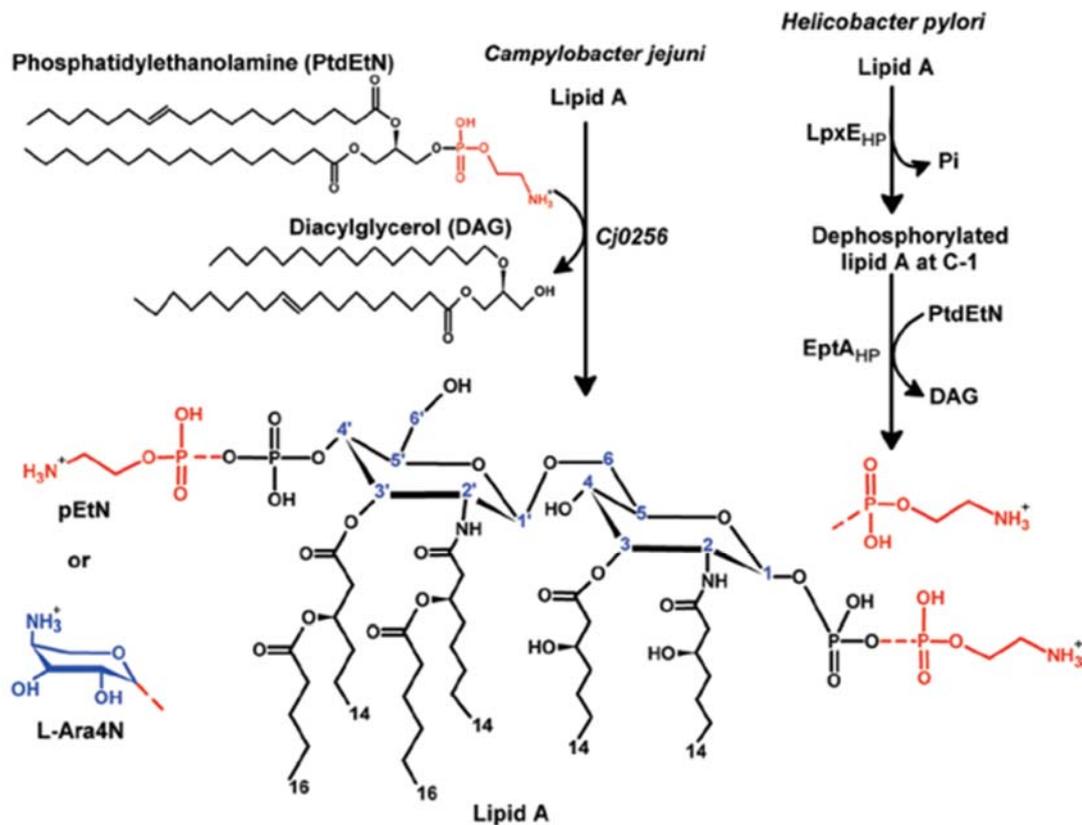
Quant à l'addition de L-Ara4N au lipide A, elle est régulée par les gènes *pmrHFIJKLM* et *pmrE*. Ces gènes sont régulés par les systèmes PhoP-PhoQ (ou PhoPQ), PmrA-PmrB (ou PmrAB) et le système RcsBCD <sup>262,276</sup>.

Ce régulon (PhoPQ) comprend un capteur-kinase (transmembranaire), PhoQ et un activateur transcriptionnel (cytoplasmique), PhoP <sup>116,277</sup>. Ce dernier est exprimé en réponse à des signaux environnementaux, y compris des changements dans les concentrations extracellulaires de magnésium ou de calcium, de pH ou d'autres signaux suite à une infection <sup>116,278</sup>.

Par ailleurs, PhoP-PhoQ contrôle également le système de régulation à deux composants PmrA-PmrB en favorisant l'expression de la protéine PmrD (**Figure 23**). Cette dernière se lie à l'activateur transcriptionnel PmrA phosphorylé et empêche sa déphosphorylation, entraînant une activation continue des gènes *pmrE* (*ugd*) et *pmrHFIJKLM* <sup>259,279</sup>. *pmrE* (*ugd*) code pour UGP-Glc-6DHase qui participe à la biosynthèse d'acide colanique, précurseur de L-Ara4N <sup>280,281</sup>. Ces gènes régulent ainsi la synthèse et le transfert de L-Ara4N en position 4' du phosphate du lipide A <sup>259,282</sup>. PmrAB régule également indépendamment du système PhoPQ la résistance aux PAMs cationiques. Le capteur kinase PmrB détecte les faibles concentrations de magnésium au niveau de l'espace périplasmique et induit des modifications putatives du LPS, tels que l'addition de L-Ara4N mais également de EptN (**Figure 23 et 27**) <sup>116,283</sup>.

D'autres gènes régulés par PhoPQ induisent une résistance aux PAMs tels que le gène *ugtL*, codant pour une protéine de la membrane interne qui forme du lipide A monophosphorylé et le gène *slyA*, qui code pour une protéine régulatrice de l'expression de UgtL (**Figure 23**)<sup>278,284,285</sup>.

En outre, la modification du LPS est également médiée par une autre cascade de régulation. Récemment, divers PAMs ont montré qu'ils activent le système de phosphorylation RcsBCD à travers la lipoprotéine RcsF de la membrane externe. La diminution de l'intégrité de la membrane externe suite à la fixation de PAMs est détectée par la lipoprotéine RcsF située au niveau du feuillet externe conduisant à l'activation de RcsBCD selon un mécanisme qui reste peu clair. Le système Rcs contribue à la résistance aux PAMs en favorisant la production d'acide colanique, un précurseur du L-Ara4N (**Figure 23**)<sup>259</sup>.



**Figure 27 : Modification du lipide A avec du phosphoéthanolamine ou du 4-amino-4-désoxy-L-arabinose.**

La charge nette négative du lipide A (noir) peut être neutralisée par addition du groupe pEtN (rouge) au phosphate aux positions C1 et C4 'du disaccharide de glucosamine dans *Campylobacter jejuni* (nombres bleus), cette modification est catalysée par la protéine phosphoéthanolamine transferase Cj0256. L'ajout de pEtN dans *H. pylori* est un processus enzymatique en deux étapes qui implique l'élimination du groupe phosphate en position C1 par la lipase A 1-phosphatase, LpxE<sub>HP</sub>, suivie de l'ajout d'une unité pEtN directement au squelette des disaccharides de glucosamine par la phosphoéthanolamine transferase, EptA<sub>HP</sub>. L'addition de 4-amino-4-désoxy-l-arabinose (L-Ara4N; bleu) au groupe phosphate en C4'est régulée par l'opéron *pmr*<sup>262</sup>.

Les substituants et les cascades de régulation peuvent varier en fonction de l'espèce bactérienne. Certaines bactéries Gram négatives peuvent ainsi résister à l'action des PAMs en modifiant le lipide A du LPS avec des résidus de glycine ou de diglycine<sup>190,260</sup>. Une autre stratégie consiste en la déphosphorylation de la fraction lipidique de LPS suivie de l'addition d'un groupe pEtN<sup>190,286</sup>.

Cependant, la réduction de la charge négative nette de la membrane présente ses limites. Des bactéries ayant une susceptibilité réduite aux peptides peuvent encore être tuées en augmentant la concentration des PAMs<sup>222</sup>.

### *III.6.1.2. Changement structural de surface*

#### *III.6.1.2.a. Épaississement de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram positives*

En réponse aux PAMs, certaines bactéries Gram positives (*e.g. S. aureus*) épaississent leur paroi cellulaire<sup>222</sup>. La paroi épaissie agit comme une barrière mécanique et un piège par affinité contre les PAMs. D'une part, l'épaississement de la paroi, limite la diffusion des PAMs, diminuant ainsi le nombre de molécules antibactériennes capables d'atteindre la membrane cytoplasmique. D'autre part, la proportion de mucopeptides non-amidés est augmenté dans le PDG. En plus de provoquer la sous-réticulation du peptidoglycane, le mucopeptide non-amidé présente une plus grande affinité de liaison aux PAMs que celle de son homologue amidé<sup>222,287</sup>. Ce processus, coûteux énergétiquement, est souvent temporaire et mis en place lors de la présence de PAMs dans l'environnement<sup>222</sup>.

#### *III.6.1.2.b. Altération de la fluidité membranaire*

Les caractéristiques de fluidité membranaire sont essentielles à l'interaction des peptides antimicrobiens cationiques<sup>288</sup>. L'altération de ses caractéristiques peut favoriser ou limiter leur action. En réponse aux PAMs, les bactéries mettent en place des mécanismes pour réduire la fluidité de leurs membranes et augmenter leur rigidité, limitant ainsi l'action des PAMs.

##### *i. Acylation du lipide A de la membrane externe des bactéries Gram négatives*

Les bactéries Gram négatives peuvent amoindrir leur susceptibilité aux peptides antimicrobiens en réduisant la fluidité de la membrane externe.

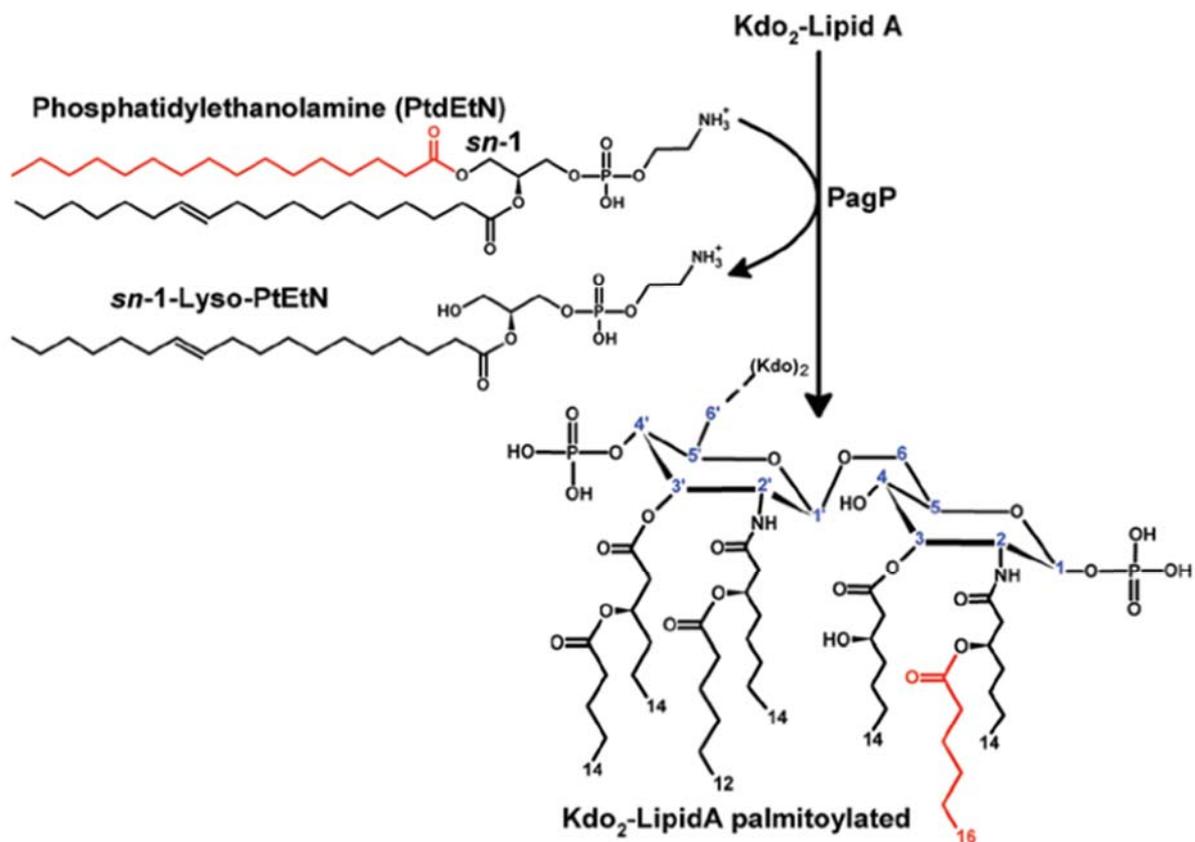
Elle peut être réduite en augmentant l'hydrophobicité des LPS. L'ajout de chaînes lipidiques hydrophobes aux phosphates du lipide A, au squelette de glucosamine ou aux chaînes d'acyle existantes, permettent d'accroître la saturation du LPS. Tandis que les interactions hydrophobes sont augmentées, la perméabilité globale est diminuée empêchant ainsi les PAMs de s'insérer dans la membrane externe<sup>289,290</sup>.

Du 2-hydroxymyristate et du palmitate peuvent être ajoutés au lipide A (**Figure 28**). Ces additions augmentent les interactions hydrophobes entre le nombre accru des queues acyle du lipide A retardant ou supprimant l'insertion des peptides et la formation de pores. L'acylation du lipide A est contrôlé par le système de régulation à deux composants PhoP-PhoQ. Lorsque les concentrations en calcium et magnésium présents à la surface de la membrane externe diminuent, PhoPQ active la transcription et la synthèse de PagP. PagP est une phospholipase/palmitoyltransférase de la membrane externe qui élimine le palmitate Sn-1 (C16:0) du PG et le transfère au lipide A<sup>291</sup>. La PE, la PS et l'acide phosphatidique sont également des donneurs d'acyle efficaces.

L'activité PagP est modulée par l'activation de PhoPQ mais également suite à la l'insertion des PAMs dans la membrane externe, indiquant que cette enzyme peut fonctionner dans le cadre d'une réponse aigüe de réparation de la membrane<sup>291</sup>.

Par ailleurs, Dalebroux et al. ont démontré qu'outre la régulation de la structure des lipides A, PagP activé par PhoPQ peut également réguler l'hydrophobicité de la membrane externe en augmentant les taux de cardiolipines et d'acyl-PG palmitoylés. Du palmitate est ajouté aux PGs présents dans le feuillet externe via PagP selon le même processus que pour le lipide A décrit précédemment. Les acyl-PGs palmitoylés formés sont moins polaires et plus hydrophobes que de nombreux autres phospholipides de la membrane externe diminuant ainsi la perméabilité aux PAMs<sup>290,291</sup>.

Par conséquent, PhoPQ régule de manière coordonnée la palmitoylation des PGs de la membrane externe ainsi que l'acylation des lipide A, suggérant que les acyl-PGs coopèrent avec le lipide A pour former une barrière externe critique pour la résistance aux PAMs<sup>291</sup>.



**Figure 28 : Acylation du lipide A médiée par PagP.**

Chez *S. typhimurium*, PagP transfère une chaîne palmitate (rouge) de la position sn-1 d'un phosphatidylethanolamine (PtdEtN = PE) au groupe hydroxyle libre de la chaîne R-3-hydroxymyristate N-liée sur l'unité proximale de glucosamine du lipide A <sup>262</sup>.

## ii. Chez les bactéries Gram positives

Les bactéries Gram positives peuvent également modifier leur fluidité membranaire en réponse aux PAMs <sup>274,292</sup>. Divers mécanismes d'action existent pour diminuer la fluidité de leur membrane cytoplasmique et en augmenter la rigidité, en fonction des espèces bactériennes. Certaines (e.g. *S.aureus*) diminuent leur teneur en caroténoïde<sup>a</sup>. En effet, les caroténoïdes polaires régulent les propriétés membranaires des procaryotes d'une manière similaire à celle observée pour le cholestérol chez les eucaryotes et sont connus pour moduler les propriétés de fluidité des membranes lipidiques. Les caroténoïdes liés à la membrane cytoplasmique stabilisent les feuillettes intra- et extracellulaires de la bicouche lipidique et augmentent la rigidité de la membrane cytoplasmique <sup>288</sup>. D'autres (e.g. *Enterococcus faecium*) augmentent la teneur

<sup>a</sup> La très forte hydrophobicité de ces molécules conditionne leur répartition dans l'environnement cellulaire : les caroténoïdes sont associés aux bicouches lipidiques membranaires.

en acides gras insaturés des phospholipides membranaires augmentant ainsi la stabilité et l'imperméabilité de la membrane <sup>274</sup>.

### III.6.1.3. Capsule

Des structures extérieures à la paroi bactériennes telles que les capsules polysaccharidiques les exopolysaccharides ou les fibrilles curli, jouent un rôle dans la résistance aux PAMs. Elles agissent comme un leurre en repoussant ou en s'associant aux PAMs, réduisant ainsi la quantité de PAMs atteignant la membrane bactérienne <sup>259,293,294</sup>.

Les bactéries peuvent se protéger en produisant des matrices extracellulaires élaborées. Elles sont composées de polymères structurellement diversifiés qui sont produits enzymatiquement par certaines espèces bactériennes. Les matrices liées de manière covalente à la paroi bactérienne sont connues sous le nom de capsules polysaccharidique ou CPS, tandis que les polymères lâchement attachés sont appelés exopolysaccharides ou EPS<sup>295</sup>.

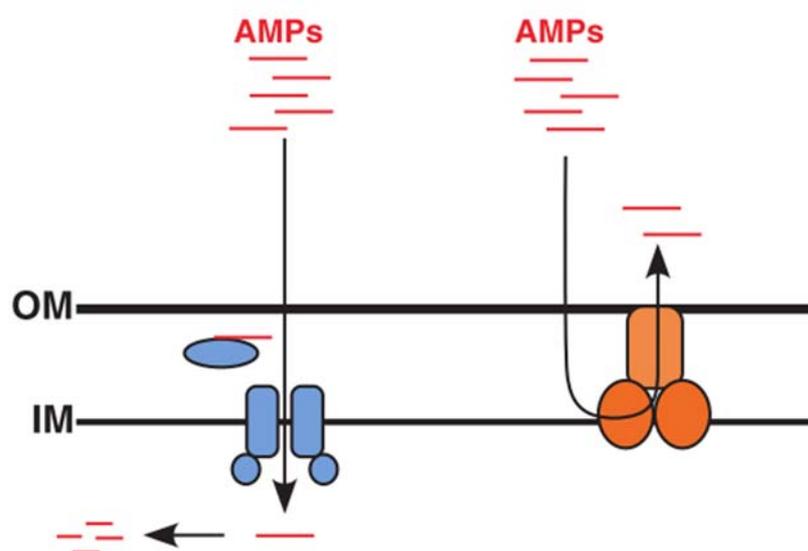
La CPS ou capsule est la couche la plus externe des bactéries. Souvent de nature polysaccharidique, elle peut les protéger mécaniquement en empêchant ou limitant l'interaction des PAMs avec leurs cibles. La quantité de CPS et la régulation positive de la transcription de *cps* sont augmentées lorsqu'elles sont en présence de PAMs <sup>262,296</sup>. Le mécanisme de résistance implique une séquestration électrostatique et mécanique (indépendante des charges) des PAMs ainsi qu'une répulsion électrostatique <sup>262,297</sup>. Certaines bactéries produisent des CPS anioniques (e.g. *P. aeruginosa*) qui leur confère une résistance en liant des PAMs cationiques et en repoussant les PAMs anioniques et inversement si la capsule est chargée positivement <sup>258,298</sup>.

Certaines bactéries se protègent de l'action des PAMs en produisant une matrice EPS. Les exopolysaccharides bactériens sont le constituant majeur de la matrice de biofilm extracellulaire <sup>299</sup>. Ces exopolymères, le plus souvent anioniques, favorisent la formation de complexes interactifs avec les PAMs cationiques <sup>259,300</sup>. La séquestration des PAMs par les EPS abaisse la concentration de PAMs sur son site cible <sup>259,301</sup>.

Les polysaccharides semblent ne pas être les seules structures de surface bactériennes capables de piéger les PAMs. Des études ont montré que les pilis, présents à la surface de certaines bactéries, augmentent la résistance aux PAMs en se liant avec <sup>259,302</sup>.

III.6.2. Pompes à efflux et à influx

La résistance aux antimicrobiens est également associée à la capacité des bactéries à transporter activement des peptides antimicrobiens à travers la membrane, au moyen de protéines importatrices (pompes à influx) ou exportatrices (pompes à efflux)<sup>303</sup>. Ces pompes protègent la membrane cytoplasmique en relocalisant les PAMs vers un autre compartiment, où ils seront éventuellement dégradés (**Figure 29**).



**Figure 29 : Représentation schématique de l'influx ou de l'efflux des PAMs à l'intérieur ou à l'extérieur d'une bactérie Gram négative.**

OM = membrane externe, IM = membrane interne, AMPs = PAMs<sup>259</sup>.

III.6.2.1. *Pompes à influx*

Les transporteurs à influx ABC dépendent généralement d'une protéine de liaison périplasmique. Ils ont pour fonction d'importer les PAMs présents dans le périplasma ou à l'interface périplasma-interne/membrane vers le cytosol, où ils pourront être dégradés (enzymatiquement) et recyclés comme nutriments (**Figure 29**)<sup>259</sup>.

L'implication des transporteurs ABC dans la résistance aux PAMs a été montrée lors d'une étude menée par Parra-Lopez et al., à partir de souches dans lesquelles les gènes transporteurs ont été supprimés ou inactivés. Les souches mutantes étaient plus susceptibles aux PAMs que les souches de type sauvage. L'opéron *sapABCDF* codant pour l'importateur ABC Sap (Sensitivity to antimicrobial peptide) a ainsi été identifié. Cette étude a également montré que

la protéine périplasmique SapA, associée au transporteur, est nécessaire pour la résistance aux PAMs, suggérant que les PAMs se lient directement à SapA pour être transportés par le système Sap dans le cytoplasme<sup>259,304</sup>. Par ailleurs, Shelton et al. ont montré que les PAMs importés dans le cytoplasme par Sap subissaient une dégradation subséquente<sup>259,305</sup>.

Cependant, le système Sap ne semble pas conférer de résistance aux PAMs à toutes les espèces bactériennes exprimant les gènes *sap* et la spécificité du transporteur dépend de la capacité de SapA à lier les PAMs. Les gènes Sap et des homologues, qui codent pour des importateurs de type ABC ont été identifiés chez un grand nombre de bactéries Gram négatives<sup>259</sup>.

### III.6.2.2. Pompe à efflux

Les pompes à efflux permettent au contraire d'exporter les PAMs ayant atteint le cytoplasme (compartiment intracellulaire) hors de la bactérie (vers l'environnement extracellulaire). La plupart des PAMs sont résistants aux pompes à efflux MDR. Seuls certains exportateurs MDR peuvent expulser plusieurs types de PAMs<sup>262,306</sup>.

Parmi les transporteurs à efflux, ceux de type RND sont spécifiques des bactéries Gram négatives. Ils captent les PAMs du périplasma ou de l'interface périplasma/membrane interne et les transportent activement dans le milieu extracellulaire. Certaines pompes RND captent les PAMs directement au niveau du cytoplasme<sup>259,307</sup>. Chez *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, par exemple, le transport actif de PAMs à partir du cytoplasme et de l'espace périplasmique par la pompe à efflux RND leur confère une résistance à ces antibactériens<sup>262,307,308</sup>.

Chez les bactéries Gram positives, il existe également des pompes capables d'expulser les PAMs. Chez *S. aureus*, le gène *vraFG* chromosomique code pour une pompe à efflux de type ABC, également régulée par le système bi-composant GraRS<sup>258,261</sup>. En outre, le gène *qacA* plasmidique code pour une pompe à efflux dépendant de la force du proton<sup>258,309</sup>.

## III.6.3. Inactivation/dégradation protéolytique ou piégeage des PAMs

### III.6.3.1. Dégradation protéolytique

Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens décrits ci-dessus ne représentent pas toutes les résistances observées chez les bactéries. En effet, certaines bactéries pathogènes

produisent des enzymes protéolytiques capables de reconnaître et dégrader les PAMs avant d'atteindre la membrane, abolissant ainsi leur activité antibactérienne. Les peptides linéaires sont la cible principale de ces enzymes, leurs sites protéolytiques étant plus exposés au clivage<sup>190</sup>. Certaines protéases bactériennes peuvent cependant dégrader des PAMs plus complexes, contenant un ou plusieurs ponts disulfures telles que les défensines<sup>290</sup>. Les bactéries peuvent produire plusieurs protéases dégradant les PAMs qui leurs seront plus ou moins spécifiques. La plupart ont une large spécificité du substrat<sup>295</sup>. Par exemple, la digestion par ZapA, une métalloprotéase produite par *Proteus mirabilis*, n'est pas spécifique aux PAMs. Elle dégrade également d'autres molécules, comme les composants de la matrice cellulaire (actine, collagène, fibronectine, laminine), les anticorps (IgA et IgG) et certaines protéines du complément<sup>190,310</sup>.

La plupart de ces peptidases sont sécrétées dans l'environnement extracellulaire environnant de la bactérie<sup>262,295</sup>. L'élastase de *P. aeruginosa* et l'auréolysine de *S. aureus*, clivent rapidement certains PAMs tels que LL-37, entraînant leur dégradation complète et la perte de leurs fonctions.<sup>116,190,262</sup>.

Les protéases peuvent également être associées à l'enveloppe bactérienne, ancrées dans la paroi ou dans la membrane externe telle que la protéine OmpT d'*E. coli* présente sur sa membrane externe<sup>262,311</sup>.

### III.6.3.2. Piégeage protéique

Face à une forte concentration de PAMs, certaines souches pathogènes produisent des molécules extracellulaires qui se lient et piègent les PAMs bloquant leur accès à la membrane et empêchant ainsi leur action antimicrobienne. Cette forme de résistance peut être réalisée directement par les actions d'une protéine bactérienne présente à sa surface (*e.g* la protéine M1 de *Streptococcus pyogenes*) ou sécrétée (*e.g* la staphylokinase de *S. aureus*)<sup>262</sup>. Des protéines chargées négativement peuvent par exemple être libérées afin d'attirer les PAMs cationiques. Les mécanismes de séquestration de PAMs médiés par des protéines varient selon les espèces et les souches<sup>262,290</sup>.

Les bactéries peuvent également sécréter des vésicules membranaires externes (VME). Ces vésicules sont formées à partir de la membrane cellulaire bactérienne qui bourgeonne de la surface. La sécrétion de VME est une partie normale de la croissance des cellules bactériennes et peut être utilisée pour une variété de processus tels que la délivrance de toxines ou la

séquestration de PAMs. Chez *E. coli*, le stress membranaire tel que l'accumulation de protéines au niveau de la membrane externe, induit une augmentation de la formation de VME. Les cibles de la plupart des PAMs cationiques étant les membranes bactériennes, ils peuvent être liés et séquestrés dans ces vésicules, les détournant des membranes des bactéries vivantes<sup>290,312,313</sup>.

Les pili peuvent également constituer un piège pour les PAMs<sup>190,314</sup>.

### III.7. Avantages et inconvénients des PAMs

Les PAMs présentent de nombreux critères d'intérêts en tant que nouveaux antibiotiques.

Tout d'abord, la plupart des PAMs ont un large spectre d'activité, y compris contre des bactéries multirésistantes<sup>315</sup>. Ceci est un avantage dans certains domaines thérapeutiques telles que les infections compliquées<sup>b</sup> de la peau et des tissus mous pour lesquelles une incidence croissante des infections polymicrobiennes impliquant des organismes Gram positifs et Gram négatifs a été rapportée au cours de la dernière décennie<sup>184,316</sup>.

Alors que les antibiotiques ciblent des activités cellulaires spécifiques telles que la synthèse d'ADN, de protéines ou de paroi cellulaire, la plupart des PAMs ciblent les phospholipides anioniques de la membrane cytoplasmique bactérienne. La possibilité d'émergence de résistance est ainsi plus faible. De plus, ils ont souvent une activité bactéricide rapide. Certains PAMs peuvent tuer en quelques secondes après le contact initial avec la membrane cellulaire<sup>166,176,317-319</sup>. Par ailleurs, le taux élevé en cholestérol et la faible charge anionique limite l'action des PAMs contre les cellules eucaryotes<sup>176,184</sup>.

Les PAMs sont également connus pour améliorer les activités des antibiotiques par des effets synergiques. Par exemple, la combinaison de la pénicilline avec la pédiocine et de l'ampicilline avec la nisine Z inhibe la croissance de *Pseudomonas fluorescens* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) 13 et 155 fois plus faibles respectivement que lors de l'utilisation des antibiotiques seuls<sup>176,320</sup>.

En général, les thérapies peptidiques présentent des avantages du point de vue de la sécurité par rapport aux médicaments à petites molécules. En effet, leurs produits de dégradation sont des acides aminés naturels et, en raison de leur demi-vie courte, peu de peptides s'accumulent dans

---

<sup>b</sup> Infections compliquées de la peau et des tissus mous font partie des infections nosocomiales les plus fréquentes.

les tissus. *In fine*, cela réduit le risque d'effets secondaires indésirables ainsi que le risque de complications causées par les métabolites <sup>184,321</sup>. Les peptides thérapeutiques, même synthétiques, sont généralement moins immunogènes que les protéines recombinantes et les anticorps <sup>184,322</sup>. Par ailleurs, l'administration locale, qui est la voie d'administration commune pour les PAMs, réduit encore le risque de problèmes de toxicologie systémique <sup>184</sup>.

Enfin, les PAMs étant une séquence d'acides aminés, il est relativement facile de modifier leur structure et de les produire pour effectuer des tests de caractérisations pharmacologiques, de relation structure-activité et de les immobiliser sur des surfaces <sup>176,323</sup>. Il est possible de produire des peptides totalement synthétiques par synthèse chimique ou en utilisant des systèmes d'expression recombinants. Ces sources artificielles de PAMs sont utiles pour la modification des PAMs existants et pour la conception de nouveaux PAMs synthétiques <sup>176</sup>. De telles modifications ont le potentiel de modifier les cibles des PAMs, d'améliorer leur efficacité, leur toxicité ainsi que leur stabilité contre les protéases <sup>86,176,206</sup>.

Il existe de nombreux PAMs actuellement en cours de développement clinique pour le traitement contre divers agents pathogènes bactériens. Alors que la plupart des PAMs sont développés pour une application locale, quelques-uns sont cependant destinés à une administration systémique <sup>184</sup>.

Toutefois, bien qu'ils ont des avantages considérables pour les applications thérapeutiques, les PAMs présentent également des limites pour le développement de médicaments.

Depuis l'isolement des magainines à partir de la peau de grenouille en 1987, de nombreuses tentatives ont été réalisées afin de développer des antibiotiques à partir de PAMs naturels. Cependant, malgré les efforts accomplis depuis plus de deux décennies, aucun PAM n'a été approuvé actuellement par la FDA<sup>315</sup>. Bien que le développement de PAMs ait été un domaine de recherche actif au cours des 30 dernières années, ce n'est que récemment qu'il y a eu des perspectives positives de réussite commerciale <sup>86</sup>. Malgré le nombre important de PAMs allant jusqu'au développement clinique, il existe un écart considérable entre le nombre potentiel de PAMs revendiqués comme candidats médicaments puissants dans les brevets ou les articles scientifiques et les résultats réels des essais cliniques <sup>184,324</sup>. Outre l'activité des PAMs, des problèmes tels que la toxicité, la liaison au sérum, la stabilité et le coût du produit sont également des considérations importantes. Des solutions pour surmonter ces limitations ont été

proposées et constituent actuellement de nombreux travaux de recherche et d'optimisation de nouveaux PAMs <sup>86</sup>. Certains des défis techniques, réglementaires et commerciaux visant à amener les médicaments à base de PAMs jusqu'au développement clinique sont présentés ci-après.

Tout d'abord, les PAMs naturels sont labiles<sup>c</sup>. Ils sont sensibles à leur environnement. La présence de protéases, les variations de pH, de température ou de la concentration ionique peuvent influencer sur leur activité <sup>315,325,326</sup>. La faible stabilité métabolique des PAMs, qui est un risque inhérent aux peptides thérapeutiques en général, est un facteur clé limitant leur application clinique. Les médicaments peptidiques sont généralement caractérisés par une faible biodisponibilité orale due à une dégradation enzymatique pré-systémique et à une faible pénétration dans la muqueuse intestinale, ce qui rend leur administration orale habituellement impossible. En outre, l'administration systémique de peptides (*e.g.* par injection intraveineuse) est limitée par une demi-vie courte due à leur dégradation rapide par les enzymes protéolytiques dans le plasma sanguin et à leur élimination rapide de la circulation par le foie (clairance hépatique) et les reins (clairance rénale) <sup>184,321</sup>. Cette limitation ne constitue cependant pas un problème sérieux pour les applications topiques <sup>86</sup>. Par conséquent, l'application locale des PAMs est la voie d'administration la plus courante, y compris dans les crèmes et les émoullents dermiques, par administration sur une plaie ou le site de la chirurgie, ou en spray nasal pour le traitement des muqueuses. Cependant, même lors d'une application locale/topique, les peptides sont susceptibles d'être dégradés par des enzymes protéolytiques tissulaires <sup>184</sup>.

Afin d'améliorer la stabilité protéolytique des PAMs, la cyclisation, l'incorporation d'acides  $\alpha$ -aminés (D.A.A.) et/ou d'analogues d'acides aminés non naturels ainsi que les peptidomimétiques<sup>d</sup> avec différentes structures de squelette sont largement utilisés <sup>184,215</sup>. Par exemple, l'arginine peut être remplacée par le DArg ou l'homoarginine, tandis que la lysine peut être remplacée par la DLys ou l'ornithine. Cependant, l'effet de la mutation L-à-D sur l'activité antimicrobienne doit être réévaluée, bien que dans la plupart des cas cette mutation ne modifie pas significativement l'activité antimicrobienne <sup>86,327-329</sup>. En outre, le blocage des extrémités N- ou C-terminales des

---

<sup>c</sup> Se dit de ce qui est fragile, peu stable.

<sup>d</sup> Composé conçu pour imiter un peptide biologiquement actif, mais présentant des différences structurales qui lui donnent plus d'avantages pour sa fonction de médicament.

PAMs par des modifications telles que la N-acétylation, le N-pyroglutamate ou la C-amidation est fréquemment utilisé pour augmenter leur résistance aux peptidases <sup>184,330,331</sup>.

Ensuite, la conception et l'optimisation des PAMs thérapeutiques pour le traitement des infections commencent habituellement par un criblage *in vitro* des PAMs connus pour leurs propriétés antibactériennes en utilisant une concentration minimale inhibitrice standard (CMI) ou des analyses de concentration minimale bactéricide (CMB) <sup>184,215</sup>. Cependant, l'activité antimicrobienne des PAMs est très sensible aux conditions environnementales, ce qui entraîne des divergences entre l'efficacité *in vitro* et *in vivo* rendant la prédiction précise de leurs propriétés anti-infectieuses en situation clinique très difficile. Ainsi, certains PAMs présentent l'effet antimicrobien *in vivo* souhaité, alors qu'ils présentaient une inefficacité ou une efficacité amoindrie dans les analyses CMI/CMB en présence de concentrations de sels physiologiques et/ou de sérum <sup>184,332-334</sup>. La susceptibilité bactérienne aux PAMs serait donc significativement plus élevée dans l'environnement ionique des mammifères, que lors des tests CMI/CMB. Par exemple, lorsqu'elles sont cultivées en présence de carbonate, une molécule omniprésente dans de nombreux micro-environnements du corps, les bactéries Gram positives et Gram négatives présentent une sensibilité considérablement accrue aux PAMs <sup>184,333</sup>. Par ailleurs, d'après Hancock et Sahl, l'activité antibactérienne *in vivo* de certains PAMs serait principalement due à leurs effets immunomodulateurs plutôt qu'à leur effet antibactérien direct <sup>184,185</sup>. *A contrario*, des PAMs présentant des valeurs de CMI/CMB satisfaisantes *in vitro* peuvent manquer d'activité *in vivo* en raison de leur dégradation protéolytique rapide et/ou de leur liaison protéique dans le corps. En résumé, la mauvaise corrélation entre l'activité antimicrobienne *in vitro* des PAMs et leur efficacité *in vivo* est l'un des obstacles techniques qui entrave la progression de ces médicaments candidats vers le développement clinique <sup>184</sup>.

Par ailleurs, bien que cela soit un problème général avec la plupart des antibiotiques, les PAMs cationiques ont tendance à présenter une forte affinité pour les protéines sériques. Cela réduit considérablement la concentration efficace des PAMs disponibles pour lutter contre les bactéries <sup>86,335</sup>. Les PAMs peuvent également interagir avec les cellules hôtes entraînant une perte significative de leur activité *in vivo*, d'une manière semblable aux effets de leur liaison aux protéines sériques <sup>86,336</sup>. Pour développer des PAMs interagissant moins avec les protéines sériques et/ou les cellules de l'hôte, des études détaillées de pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK/PD) sont nécessaires <sup>86</sup>.

Bien que la plupart des PAMs sont moins toxiques pour les cellules eucaryotes, leur toxicité systémique lors d'une application orale est difficile à évaluer<sup>315</sup>. La toxicité des PAMs peut se produire à différents niveaux : la toxicité de la membrane, la toxicité cellulaire et la toxicité systémique<sup>86</sup>. La charge moléculaire des membranes bactériennes et des membranes de cellules humaines diffère de sorte que les PAMs avec des charges positives supérieures présentent une affinité accrue pour la membrane bactérienne, ce qui entraîne une activité antimicrobienne plus élevée (CMI plus faible) et inversement moins de toxicité pour les cellules humaines<sup>86,337</sup>. Outre leur charge, l'hydrophobicité des PAMs peut également affecter leur toxicité vis-à-vis des membranes eucaryotes, un facteur utile dans la conception des lipopeptides branchés/ramifiés ayant une toxicité minimale<sup>338</sup>.

La toxicité cellulaire/métabolique et la toxicité systémique sont plus difficiles à prévoir car les mécanismes sous-jacents sont complexes. La toxicité cellulaire se réfère à la toxicité à une seule cellule. Elle peut être mesurée pour des cellules humaines en utilisant des tests MTT, de libération de LDH ou de synthèse d'ATP<sup>86,339</sup>.

Quant à la toxicité systémique, elle peut résulter de divers effets tels que l'activation des facteurs de transcription, la liaison aux récepteurs macromoléculaires dans le corps, l'altération des voies métaboliques et le déclenchement de la réponse immunitaire, ce qui rend difficile de la prédire<sup>86</sup>. Par exemple, la polymyxine B, antibiotique de dernier recours pour le traitement des bactéries Gram négatives résistantes aux médicaments multiples, bien que non toxique au niveau de la membrane, peut causer une néphro- et une neurotoxicité importantes<sup>86,340</sup>. Des stratégies, telles que la toxicologie computationnelle et la formulation sont aujourd'hui utilisées pour aborder et prédire les problèmes liés à la toxicité systémique. La toxicologie computationnelle permet de prédire les résultats toxiques<sup>86,341,342</sup>.

Par ailleurs, la stabilité, la sécurité et l'efficacité des PAMs peuvent être améliorées grâce à des stratégies de formulation innovantes et à la conception de systèmes de délivrance de médicaments. La formulation offre la possibilité de cibler la distribution des PAMs vers un site spécifique avec une libération contrôlée au fil du temps, réduisant ainsi les effets secondaires et augmentant leur efficacité<sup>184,343</sup>. L'utilisation de nanoporteurs ou nanocarriers est particulièrement intéressante dans ce contexte. Leur grande surface permet l'adsorption ou l'encapsulation des PAMs et prévient leur auto-agrégation. En outre, les matériaux nanostructurés permettent la conception de formulations pour la distribution locale à des tissus

spécifiques et, en maîtrisant la dégradation du support, permettent une libération contrôlée dans le temps des PAMs tout en améliorant leur stabilité métabolique et chimique<sup>184,344-346</sup>. Les nanocarriers peuvent être préparés à partir de matériaux biocompatibles et biodégradables tels que les lipides (*e.g.* les phospholipides, les triglycérides, le cholestérol et la mono-oléine) et les polymères (*e.g.* la cellulose, le chitosane<sup>e</sup>, l'acide hyaluronique, l'acide poly-lactique-co-glycolique et Acide poly-lactique)<sup>184</sup>. Il a ainsi été démontré que l'utilisation de systèmes performants d'administration de médicaments, tels que l'encapsulation dans des liposomes, peut être efficace pour réduire la toxicité potentielle et améliorer la stabilité<sup>86,315,347</sup>.

Par ailleurs, le manque de la sélectivité des PAMs vis-à-vis de souches spécifiques peut perturber l'équilibre écologique de la flore microbienne indigène. L'inhibition de ses souches commensales est responsable de nombreuses complications et effets indésirables sur l'organisme. Afin de limiter ces effets, il est important de développer des PAMs spécifiques d'espèces bactériennes capables de cibler précisément les bactéries pathogènes sans endommager les micro-organismes bénins<sup>348</sup>.

Comparés aux petites molécules antibiotiques, les coûts de production des PAMs, qui s'appliquent aux thérapies peptidiques en général, peuvent être plus élevés. Ceci constitue un autre critère de limitation à la commercialisation des PAMs<sup>86,184</sup>. Pour une exploitation à des quantités commerciales, les coûts de production estimés seraient d'environ 50 à 400 dollars par gramme d'acide aminé<sup>315,349</sup>. On estime généralement que le coût de production d'un peptide de masse moléculaire de 5000 Da dépasse le coût de production d'une molécule de masse moléculaire de 500 Da de plus de 10 fois<sup>350</sup>. La Synthèse Peptidique en Phase Solide (SPPS), procédé couramment utilisé pour la synthèse chimique des peptides thérapeutiques est généralement considérée comme la technologie la plus aboutie disponible, au moins pour la production de peptides ayant jusqu'à 50 résidus d'acides aminés. Toutefois, elle est peu compatible avec la production de masse de peptides homogènes<sup>184,351,352</sup>. Les systèmes de production de peptides recombinants tels que des bactéries, des levures, des insectes et des cellules de mammifères sont des alternatives à la synthèse chimique. Cependant, ils nécessitent généralement une phase de R&D longue et coûteuse et ont des limites en ce qui concerne la

---

<sup>e</sup> Polyoside produit par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine, le composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calmars) ou encore de la paroi des champignons. Biodégradable et biocompatible (notamment hémocompatible), il est également bactériostatique et fongistatique.

capacité d'introduire des modifications dans la séquence peptidique. L'une des stratégies industrielles la plus rentable serait tout d'abord de produire les PAMs par synthèse chimique le temps de développer la production par voie recombinante <sup>184,353</sup>. Une autre solution est de réduire au maximum la taille du peptide actif tout en maintenant ou augmentant son activité <sup>315</sup>. L'ingénierie peptidique a permis l'obtention de peptides de taille réduite avec une activité antimicrobienne améliorée <sup>315,354,355</sup>.

De plus, des problèmes de repliement peuvent survenir lors de la synthèse de certains grands PAMs, leur activité peut être réduite lorsqu'on les utilise pour le revêtement de surface et bien que cela soit rare, la résistance bactérienne à certains PAMs existe <sup>176,349,356-358</sup>.

Enfin, des obstacles réglementaires peuvent également retarder considérablement le développement clinique des PAMs. Toutefois, la diminution du nombre d'approbation de nouveaux agents anti-infectieux, combinée à l'augmentation alarmante de la résistance aux antibiotiques conventionnels, a entraîné des initiatives récentes au niveau gouvernemental ainsi que des autorités de réglementation. Pour faciliter le développement de nouveaux anti-infectieux, des années supplémentaires d'exclusivité du marché et plus de souplesse en matière de conception des essais cliniques ont été ajoutés <sup>184,359</sup>. D'un point de vue réglementaire, les thérapies peptidiques sont considérées comme un «mélange» de petites molécules classiques et de molécules biologiques. En effet, ce sont des molécules synthétiques basées sur, ou ayant, le même mécanisme d'action que les protéines/peptides endogènes. L'équilibre dans ce «mélange» peut différer d'un pays à l'autre, ce qui rend le paysage réglementaire, en particulier en relation avec la chimie, la fabrication et les contrôles (CMC), plus complexe.

Les PAMs représentent probablement la meilleure option pour le traitement des infections multi-résistantes aux médicaments. Ils offrent des alternatives prometteuses aux thérapies standards comme agents anti-infectieux et immunomodulateurs avec des mécanismes d'action moins propices à l'induction de résistance que les antibiotiques conventionnels. Bien qu'il existe de nombreux défis pour qu'un PAM candidat non clinique devienne un produit clinique réussi, la découverte et le développement commercial des peptides thérapeutiques de prochaine génération et des peptidomimétiques devraient être accélérés par les progrès récents dans la compréhension globale de leur mécanisme d'action, leurs modèles de résistance et les stratégies de formulation avancées <sup>184</sup>. Pour la plupart des PAMs, les valeurs de CMI étant plus élevées que de nombreux antibiotiques classiques, le principal objectif est d'améliorer leur activité

antimicrobienne, de réduire leur toxicité et d'augmenter leur efficacité de distribution <sup>86</sup>. La conception de peptidomimétiques agissant sur les membranes cytoplasmiques pour mimer l'action des PAMs existants constitue une nouvelle alternative de recherche. Ils peuvent être obtenus par modification chimique des PAMs existants et/ou avec des acides aminés non naturels. Ils permettent ainsi de pallier aux inconvénients inhérents aux PAMs naturels. Avec plusieurs PAMs actuellement en développement clinique en phase tardive dans différents domaines thérapeutiques, les prochaines années se promettent de confirmer le bénéfice thérapeutique de ces nouveaux candidats et conduisent à l'autorisation de mise sur le marché de plusieurs nouveaux médicaments à base de PAMs <sup>184</sup>.

Ainsi, le but de notre étude est d'identifier de nouveaux PAMs à partir des sources naturelles, riches et complexes que sont les venins d'animaux. Ces PAMs pourront être utilisés comme nouvelle molécule antibiotique ou comme modèle dans la conception de molécules innovantes permettant de lutter spécifiquement contre les souches bactériennes multi-résistantes.

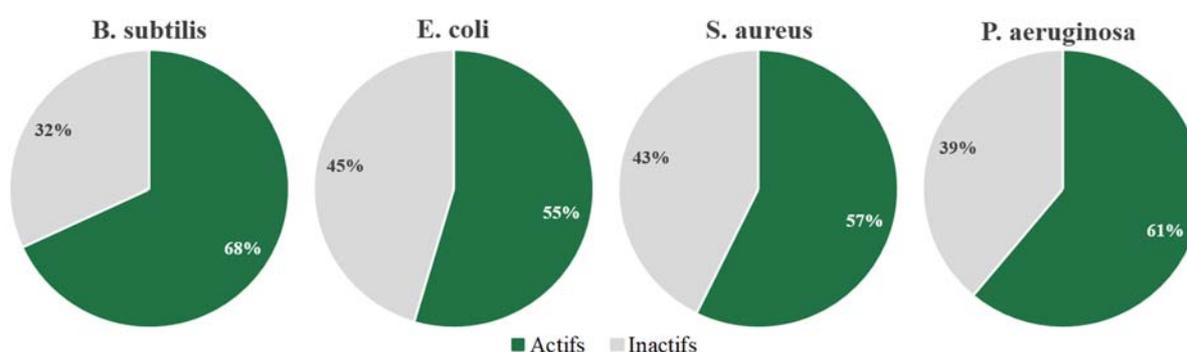
## CHAPITRE II : RESULTATS & DISCUSSION

### I. Etude de l'activité antibactérienne de venins d'animaux

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouvelles molécules antibactériennes à partir de venins d'animaux qui auraient la capacité de lutter contre des souches multirésistantes. Il est donc nécessaire dans un premier temps, d'identifier les venins ayant la capacité d'inhiber la croissance des bactéries afin d'en extraire les molécules d'intérêt.

#### I.1. Criblage des venins en milieu liquide

L'étude de l'activité antibactérienne de venins de différentes espèces animales a été effectuée grâce à un test d'inhibition de la croissance en milieu liquide. Le criblage, effectué à partir de 185 venins, a été réalisé en plaques 96 puits contre des souches bactériennes de références non pathogènes (*B. subtilis* et *E. coli*) et pathogènes (*S. aureus* et *P. aeruginosa*). Chaque venin a été testé en duplicat, sur deux expériences indépendantes. Leur effet antibactérien a été évalué par lecture spectrophotométrique à une DO de 630 nm. La croissance des bactéries induit un trouble du milieu qui peut être observé dans les puits contenant de l'eau (témoin négatif) et ceux contenant du venin n'ayant pas de propriétés antibactériennes. En revanche, les venins actifs, inhibent la croissance bactérienne ; le milieu est limpide, comparable aux puits contenant des antibiotiques contrôles (témoin positif).

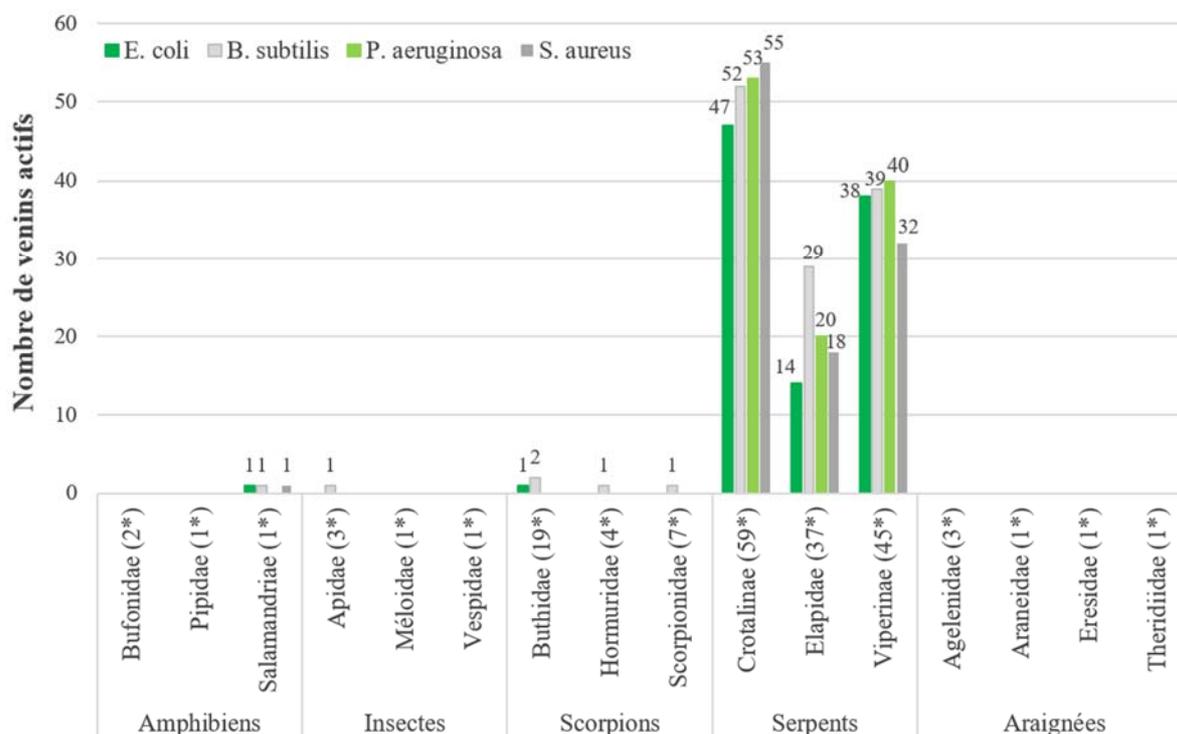


**Figure 30 : Proportion de venins actifs et inactifs à 10mg/mL contre quatre souches bactériennes : *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (de gauche à droite).**

L'activité antibactérienne de 185 venins a été évaluée après 18h d'incubation avec les bactéries selon un test d'inhibition de croissance réalisé en milieu liquide en plaque 96 puits.

La majorité des venins testés présentent une activité antibactérienne (**Figure 30**). En moyenne, 60% de ces venins inhibent la croissance des souches testées. *Bacillus subtilis* est la souche la plus sensible avec 68% de venins qui inhibent sa croissance, suivi par *Pseudomonas aeruginosa* avec 60%, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec 57% et 55% respectivement. Les venins présentent donc un fort effet antibactérien, même contre certaines souches Gram négatives pathogènes.

La Figure 30 présente la proportion des venins actifs et inactifs de l'ensemble des espèces. Ces résultats peuvent également être présentés par famille et sous-espèce à laquelle ils appartiennent (**Figure 31**).



**Figure 31 : Nombre de venins capables d'inhiber la croissance de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* à 10mg/mL en fonctions de la sous-famille à laquelle ils appartiennent.**

(\*) = nombre de venins testés dans chaque sous-famille.

À 10 mg/mL, 40% des venins inhibent à la fois la croissance des souches pathogènes et non pathogènes, Gram positives et Gram négatives, et ce sont tous des venins de serpents. Ces venins semblent donc être efficaces contre une large gamme de bactéries. Par ailleurs, 9 venins ne sont actifs que contre les souches pathogènes, dont 5 inhibent spécifiquement *S. aureus*. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'un antibiotique doit être efficace de manière plus spécifique contre les bactéries pathogènes.

Parmi l'ensemble des venins testés, ceux de serpents représentent près de 80% des venins ayant une activité antibactérienne (70%, 85%, 80% et 75% contre *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement), mais c'est aussi la famille d'animaux venimeux les plus représentés avec 141 venins. Une tendance est également observée par sous-famille. En proportion, les venins des *Elapidae* inhibent moins la croissance bactérienne que les venins de *Crotalinae* et *Viperinae* qui appartiennent tous deux à la Famille des *Viperidae*.

En revanche, les venins de scorpions, d'insectes, d'araignées et d'amphibiens sont plus difficiles à obtenir en quantité et sont donc plus coûteux. Les résultats montrent qu'aucun des venins d'araignées testés ne présentent d'activité antibactérienne. De même, seulement 15% des venins d'amphibiens, d'insectes et de scorpions inhibent la croissance des souches bactériennes non pathogènes et aucun n'inhibe les souches pathogènes, sauf *S. aureus* sensible à l'activité d'un venin de Salamandre. Or d'après AMP database, de nombreux peptides antimicrobiens constituent les venins d'amphibiens, d'insectes et dans une moindre mesure ceux de scorpions, d'araignées et de serpents<sup>181,360-362</sup>. En outre, parmi les venins inactifs en milieu liquide, certains ont été décrits dans la littérature pour leur activité antibactérienne en milieu solide<sup>79,194,363-365</sup>. Ces contradictions de résultats peuvent être liées aux différences phénotypiques présentes au sein de la même espèce bactérienne ou des méthodes utilisées. Le venin de *Bufo viridis* par exemple ne présente pas d'activité contre la croissance de *S. aureus* ATCC 6538P alors qu'il a été décrit pour cette activité en 2004 en milieu solide<sup>47</sup>. Au contraire, certains venins tels que V89, V151 ou V182, ne présentaient aucune activité antibactérienne contre les différentes souches bactériennes cultivées en milieu solide, alors que dans notre cas ils ont été identifiés comme possédant une activité antibactérienne<sup>364,366</sup>.

En complément de ce criblage, les venins inhibant la croissance de *B. subtilis* et *E. coli* à 10 mg/mL ont été dilués jusqu'à la perte de leur activité. *B. subtilis* est plus sensible à l'action des venins qu'*E. coli*. Seulement 31% des venins sont encore actifs contre la croissance d'*E. coli* à 1 mg/mL contre 46% sur *B. subtilis*. 22% d'entre eux continuent à inhiber la croissance de *B. subtilis* à 0,1 mg/mL. Les venins de serpents se sont révélés être les plus efficaces : ils représentent près de 97% des venins bruts actifs à 1 mg/mL (aussi bien contre *B. subtilis* et *E. coli*).

Parmi les venins inhibant la croissance des souches pathogènes à 10 mg/mL, seulement une trentaine de venins ont été testés à 1 mg/mL : 97% conservent leur activité contre *S. aureus* et 88% contre *P. aeruginosa* (données non présentées).

La dilution des venins entraîne une perte d'activité. D'après ces résultats, le criblage des venins à hauteur de 1 mg/mL n'aurait permis d'identifier que 30 à 50% des venins actifs contre *E. coli* et *B. subtilis* suggérant que les molécules actives sont présentes en faible quantité dans ces conditions. Bien que 22% soient encore actifs à 0,1 mg/mL contre *B. subtilis*. En revanche, à 1mg/mL les résultats obtenus contre les souches pathogènes sont comparables à ceux obtenus à 10 mg/mL.

Enfin, à titre d'exemple, si nous comparons l'activité de 19 venins de serpents actifs à 10mg/mL contre ses quatre souches bactériennes, à 1 mg/mL 37% inhibent la croissance de *B. subtilis* et/ou *E.coli*, tandis que la totalité des venins sont encore actifs contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Ces résultats suggèrent que les venins de serpents auraient pu être criblés à une concentration de 1mg/mL contre les souches pathogènes. En revanche, entre 50 et 70% des venins de serpents testés qui étaient actifs à 10 mg/mL ne le sont plus à 1 mg/mL contre les souches de références non pathogènes.

## **I.2. Criblage en milieu solide**

En raison de sa facilité de manipulation et de sa capacité à être appliqué en plaques 96 puits, le test d'inhibition de la croissance bactérienne en milieu liquide permet de cribler un nombre important de venins. Cependant, certains venins, inactifs à 10 mg/mL en milieu liquide, ont été trouvés actifs, dans la littérature, par la méthode de diffusion en milieu solide<sup>79,194,364</sup>.

Une étude comparative entre milieu solide et liquide a été réalisée à partir de venins décrits dans la littérature pour leur activité antibactérienne. En milieu liquide, les venins ont été testés à 10 mg/mL et en milieu solide ils ont été testés à 100µg (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Evaluation de l'activité antibactérienne de venins décrits dans la littérature par comparaison d'un test en milieu liquide et par diffusion en milieu gélosé.**

En milieu liquide, les venins ont été testés à 10 mg/mL et en milieu solide ils ont été testés à 100µg. + : venin actif; - : venin inactif.

Venins	<i>S.aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	liquide	solide	liquide	Solide
V51 – <i>Bothrops jararaca</i> <sup>364,367,368</sup> (Serp, Crot)	+	13 mm	-	2 mm
V175 – <i>Naja annulifera</i> <sup>369</sup> (Serp, Elap)	-	10 mm	+	2 mm
V210 - <i>Notechis scutatus</i> <sup>79,370</sup> (Serp, Elap)	-	5 mm	-	-

Pour ces venins le système utilisé a abouti à des résultats différents. Inactifs en milieu liquide à 10 mg/mL, ils inhibent la croissance de ces souches en milieu solide. Il est évident que certains des venins ayant été discriminés comme inactifs par le test en milieu liquide, possèdent effectivement des propriétés antibactériennes. Par ailleurs, les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus, permettant de valider la méthode de diffusion en milieu solide.

Une étude bibliographique a été réalisée sur les venins d'amphibiens, de scorpions et d'insectes trouvés inactifs dans nos conditions de criblage en milieu liquide. Ceux non décrits dans la littérature pour leur activité antibactérienne ont été testés selon la méthode de diffusion en milieu solide à hauteur de 100 µg. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 5** ci-dessous :

**Tableau 5 : Evaluation de l'activité antibactérienne de venins inactifs en milieu liquide, non décrits dans la littérature, en milieu solide à hauteur de 100µg.**

Diamètre du halo d'inhibition exprimé en millimètre (mm). - : venin inactif. SARM = *S. aureus* résistant à la Méthicilline ; *P. aeruginosa* MR = *P. aeruginosa* multirésistant

Venins	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>E. coli DH5a</i>	SARM	<i>P. aeruginosa MR</i>
V70	-	-	-	-
V143	-	-	-	-
V144	-	-	4 mm	-
V147	-	-	-	-
V167	-	-	8 mm	-
V174	-	-	6 mm	-
V207	-	-	10 mm	-
V214	-	-	-	-
V215	-	-	-	-
V216	-	-	6 mm	-
V220	-	-	-	-
V222	6 mm	7 mm	6 mm	3 mm
V268	-	-	-	-
V270	-	-	-	-

La réalisation de ces tests a permis d'identifier six nouveaux venins antibactériens originaux : V144, V167, V174, V207, V216 qui inhibent la croissance de *S. aureus* résistant à la méthicilline, et V222 actif également contre *B. thuringiensis*, *E. coli* DH5a et *P. aeruginosa* multirésistant.

### I.3. Comparaison des méthodes de criblage

Le criblage des venins a été effectué selon deux techniques qui génèrent des résultats simples d'interprétation et qui permettent une flexibilité dans la sélection des produits et des souches à tester<sup>371</sup>.

La technique de criblage en milieu liquide est facile d'application. C'est une méthode rapide, sensible, reproductible, qui peut être facilement standardisée et partiellement automatisée<sup>372</sup>. Réalisée en plaque 96 puits elle permet de tester simultanément un grand nombre d'agents antibactériens contre un ou plusieurs isolats bactériens. En revanche, c'est une méthode coûteuse qui nécessite l'utilisation d'importante quantité de venin/de produit. Par ailleurs, si l'inoculum n'est pas une culture pure les résultats du test seront affectés. Si la contamination est résistante au produit alors que la souche testée ne l'est pas, ceci pourrait induire de faux résultats négatifs des produits testés. De même, si la concentration en bactéries de l'inoculum ne se rapproche pas de la norme McFarland, un organisme résistant pourrait sembler sensible si l'inoculum est trop faible et inversement<sup>373</sup>.

La technique de diffusion en milieu solide est également facile à réaliser et les résultats sont reproductibles. C'est une technique peu coûteuse en réactifs et consommables, et ne requiert pas d'équipement spécial. De plus, elle est peu consommatrice de produit (e.g. 10 µL d'une solution à 10 mg/mL contre 40 µL (dilution au 1/5) à 50 mg/mL pour les tests en milieu liquide) car celui-ci n'est pas dilué dans le milieu de culture. La contamination est plus facilement détectable par cette technique qu'en milieu liquide<sup>371,374</sup>. Par ailleurs une tendance de résistance de la souche peut être observée. Certaines bactéries se développent à l'intérieur de la zone d'inhibition. Elles peuvent correspondre à des sous-populations de la souche originale qui présentent une résistance accrue à l'agent antibactérien, leur permettant de se développer plus près du dépôt, c'est-à-dire où les concentrations d'agents antimicrobiens sont les plus élevées<sup>375,376</sup>. Toutefois, seul un nombre limité d'échantillons peut être testé par boîte et ce, contre une seule souche bactérienne. Ce test exigeant en main-d'œuvre, nécessite beaucoup de temps pour

préparer les boîtes de culture, en particulier lorsque le test est effectué contre un nombre important de souches bactériennes et/ou que le nombre de composés à évaluer est élevé <sup>371</sup>.

Bien que la plupart des agents antimicrobiens testés en milieu liquide ou par diffusion en milieu solide possèdent une activité antimicrobienne comparable, certains résultats contradictoires peuvent être obtenus <sup>374,377</sup>. Ainsi, des études ont montré qu'il peut y avoir des différences entre les deux méthodes <sup>374,378,379</sup>. Ce phénomène a d'ailleurs été observé avec quelques-uns de nos venins pour lesquels les résultats obtenus en milieu liquide et par diffusion en gélose diffèrent. De nombreux facteurs peuvent affecter l'activité antimicrobienne, tels que les caractéristiques intrinsèques des échantillons, les facteurs microbiens et les facteurs/paramètres extrinsèques.

Le diamètre de la zone d'inhibition dépend de la capacité de diffusion de la molécule active à travers la gélose. Ce processus de diffusion dépend de nombreux facteurs intrinsèques tels que la taille, la forme et la quantité de la substance. Ainsi, les petites molécules diffusent plus rapidement que les plus grosses. Les actifs précipités ne peuvent pas diffuser au travers de la gélose. Cela peut être induit par une variation de pH ou une diminution de température. Cependant, la diffusion peut être facilitée en plaçant les boîtes à 4°C (10 min-2 heures) avant incubation. La limite de détection est ainsi abaissée et le diamètre d'inhibition augmenté. Par ailleurs, les molécules diffusent plus rapidement à un gradient de concentration plus élevé <sup>380</sup>. La solubilité des produits est également un paramètre important. La substance active doit être entièrement solubilisée dans une solution qui permettra d'induire un maximum d'efficacité, mais qui sera également compatible avec le test d'évaluation antibactérien. Ainsi, pour diffuser dans la gélose, les actifs doivent être solubles en solution aqueuse (hydrophiles/polaires) <sup>371,374</sup>. En revanche, le test en milieu liquide peut être utilisé aussi bien pour des molécules hydrophiles que lipophiles <sup>374</sup>. De plus, dans ce test les échantillons solubilisés sont directement en contact avec les bactéries à inhiber. Afin d'éviter la sédimentation des extraits de venins et avoir une répartition homogène des actifs, les plaques auraient pu être agitées au cours de l'incubation <sup>374</sup>.

Des facteurs extrinsèques tels que la composition du milieu de culture, le nombre de bactéries inoculées, le temps d'incubation et la température peuvent influencer sur la susceptibilité du test. Les résultats du test en diffusion solide peuvent être influencés par le pH, la profondeur de la gélose, les concentrations en ions calcium, de thymine ou de thymidine, un nombre de bactéries inégal <sup>373,377</sup>. Si la profondeur de la gélose n'est pas de 3 à 4mm, ou si le pH n'est pas compris

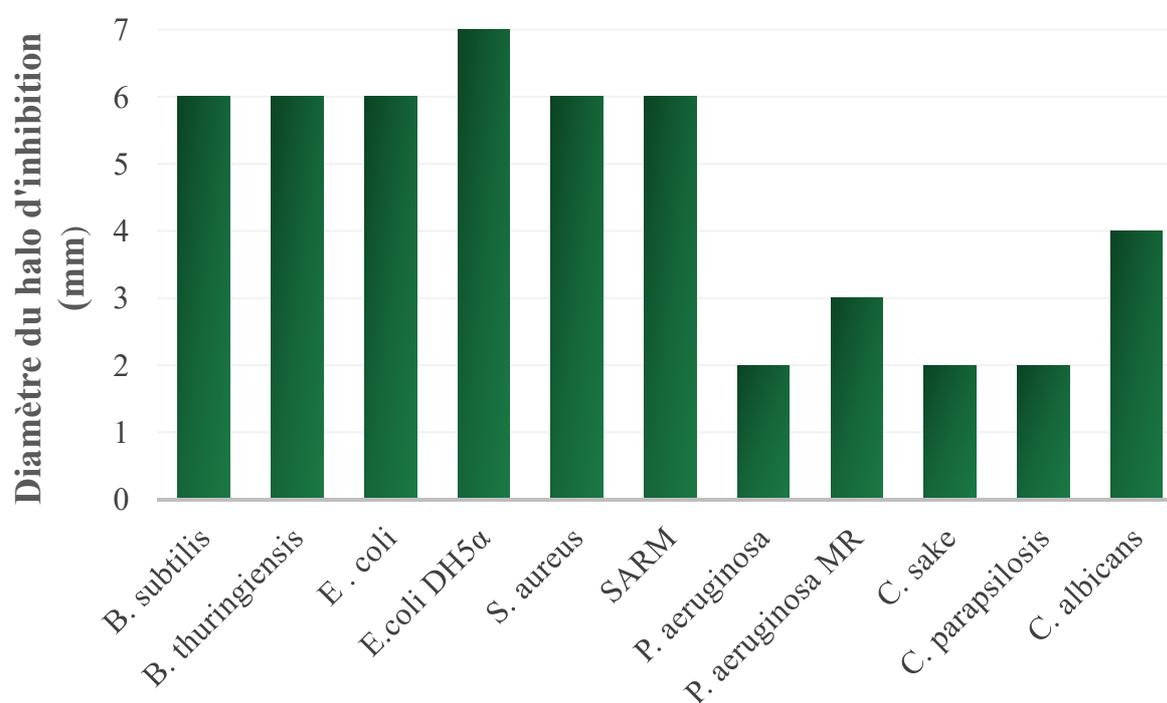
entre 7,2 et 7,4, le taux de diffusion des agents antimicrobiens ou leur activité peut être affecté<sup>373</sup>. Les tests de dilution en milieu liquide peuvent également être affectés par des écarts de pH et d'inoculation<sup>377,381</sup>.

Le genre, l'espèce, l'âge des bactéries utilisées n'influent pas sur la différence de résultats obtenus entre les deux méthodes, les souches étant les mêmes. En revanche, la différence entre les environnements de croissance peuvent influencer sur la physiologie de la bactérie qui seront peut-être plus ou moins aptes à mettre en place des mécanismes de résistances antimicrobiens, tels que la formation de biofilms ou la libération d'enzymes protéolytiques<sup>190,382,383</sup>.

En raison de sa facilité de manipulation et de sa capacité à être appliquée en plaques à 96 puits, le test d'inhibition de la croissance bactérienne en milieu liquide nous a permis de cribler rapidement un nombre important de venins contre différentes souches bactérienne. Étant donné le faible coût, la méthode de diffusion en milieu solide apparaît comme une bonne alternative. Utilisée de manière complémentaire, cette méthode nous a permis d'évaluer l'activité des échantillons trouvés inactifs en milieu liquide (avant de les discriminer définitivement).

## II. Identification des molécules antibactériennes du venin de *Polistes gallicus*

Suite aux résultats de criblage obtenus en milieu liquide et solide, le venin V222, de *Polistes gallicus* (*P. gallicus*), présente un intérêt particulier du fait de son large spectre d'activité antimicrobienne (**Figure 32**). Il inhibe aussi bien la croissance des bacilles Gram + (*B. subtilis*/*B. thuringiensis*) et Gram - (*E.coli*/*P. aeruginosa*), les coques Gram + (*S. aureus*), des souches multirésistantes et même des levures (*Candida spp.*).



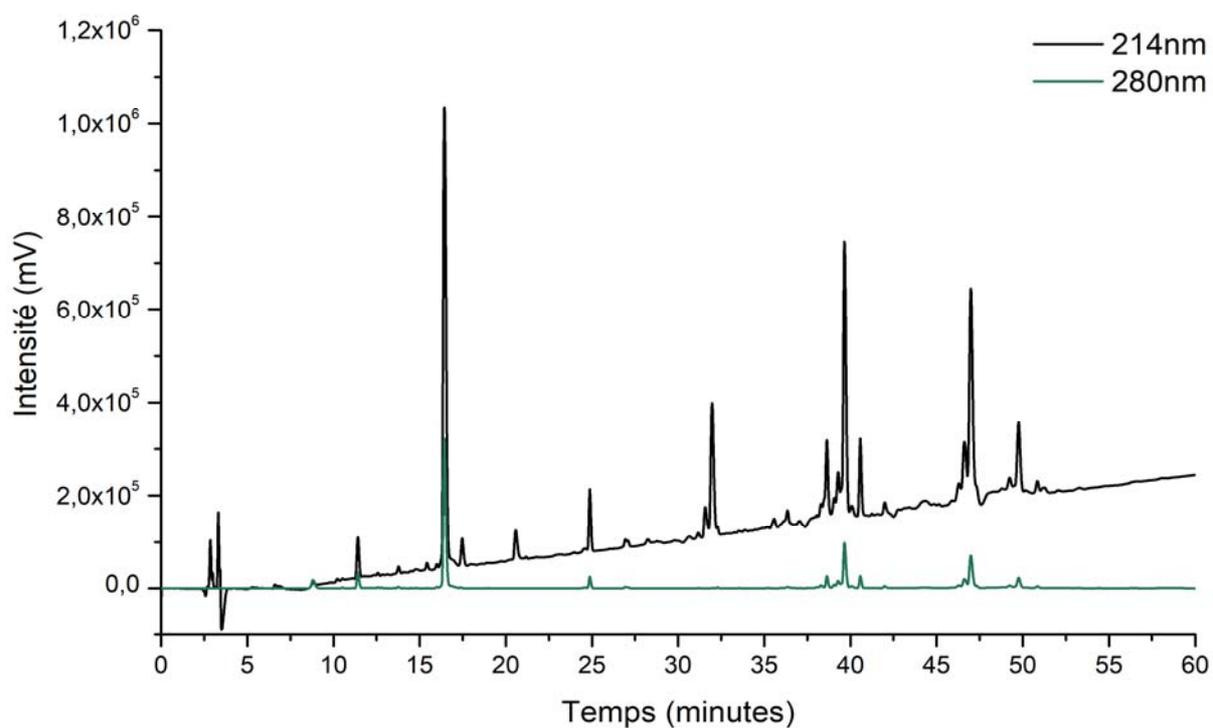
**Figure 32 : Evaluation de l'activité antibactérienne de V222 contre différents micro-organismes à 100 $\mu$ g.**

Diamètre du halo d'inhibition en millimètre (en mm). *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant, *Candida sake*, *Candida parapsilosis* et *Candida albicans*. (n=1).

*Polistes gallicus* est une guêpe sociale du genre *Polistes*<sup>384</sup>. Historiquement connu sous le nom de *Polistes foederatus*, elle fait partie des guêpes sociales les plus répandues en Europe. La distribution de *P. gallicus* s'étend également dans les régions d'Afrique du nord et d'Asie<sup>385,386</sup>. Elle appartient aux Hyménoptères qui est avec plus de 200 000 espèces d'abeilles, de guêpes et de fourmis, l'un des plus grands ordres parmi les insectes. La plupart d'entre eux utilisent du venin pour la capture de proies et l'autodéfense. Il existe deux modes de vie distincts parmi les insectes Hyménoptères. Les insectes sociaux tels que les abeilles, les frelons, les guêpes et les fourmis, et les insectes solitaires qui comprennent des guêpes solitaires et des guêpes parasites<sup>387</sup>.

Les guêpes solitaires utilisent leur venin de manière offensive. Il n'est pas mortel, mais induit une paralysie ainsi qu'une régulation du développement et du métabolisme afin de maintenir la proie en vie pour nourrir leurs larves<sup>388,389</sup>. Sa composition comprend donc diverses molécules bioactives qui ont les fonctions de paralysie, d'activité antimicrobienne et d'arrêt de développement<sup>389,390</sup>. *Polistes gallicus* est une espèce de guêpes sociales qui, au contraire, utilise son venin pour se défendre et pour défendre sa colonie contre les attaques des ennemis et des prédateurs. Une pique produit des douleurs, des dégâts localisés et occasionnellement la mort chez les grands vertébrés, y compris l'homme. Les constituants chimiques de ces venins comprennent i) des amines biogènes, ii) des peptides ayant diverses fonctions y compris neurologiques et antimicrobiennes et iii) des protéines telles que des enzymes et des allergènes, qui agissent ensemble pour produire les effets toxiques et biologiques<sup>387,389,391,392</sup>.

L'empreinte spectrale du venin *P. gallicus* a été réalisée par HPLC analytique suivant deux longueurs d'ondes spécifiques pour la visualisation des molécules protéiques (**Figure 33**). L'une à 214 nm correspond au maximum d'absorption des liaisons amides impliquées dans les protéines et les peptides et permet de visualiser la proportion d'entités protéiques éluées au cours du temps<sup>393</sup>. L'autre à 280 nm, caractéristique des cycles aromatiques, informe sur la présence d'acides aminés aromatiques tels que le tryptophane et la tyrosine<sup>394</sup>.

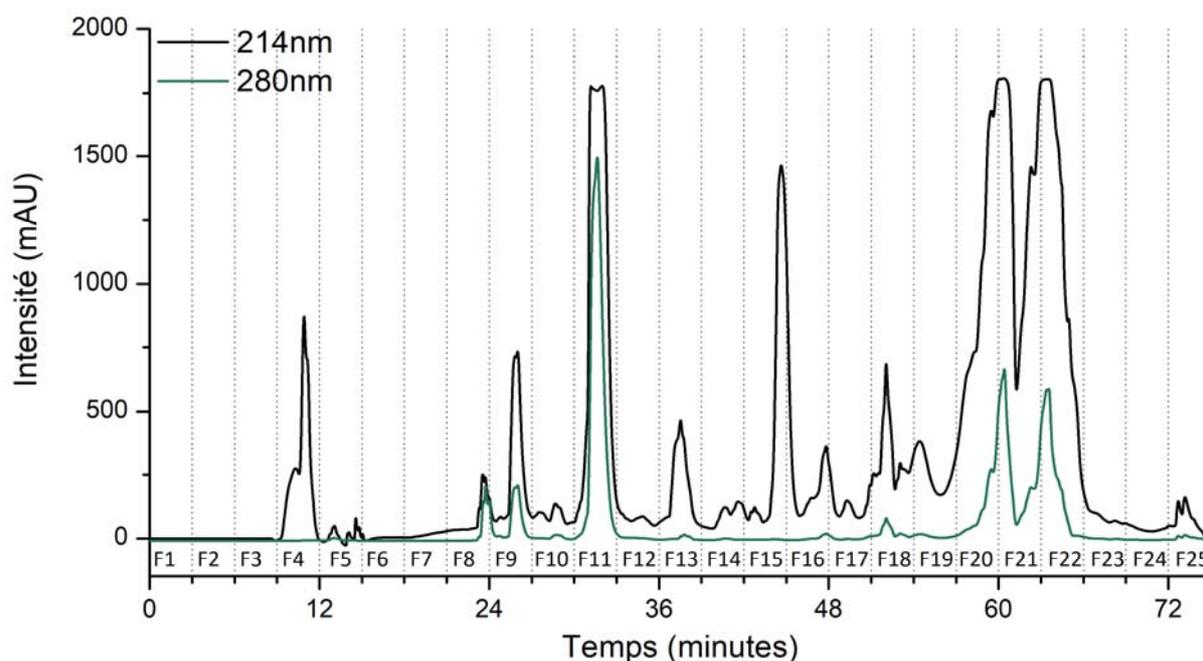


**Figure 33 : Chromatogramme de 250µg de venin *Polistes gallicus* à 214nm (noir) et 280nm (vert) obtenu par HPLC analytique suivant un gradient 0-60% de tampon ACN/10%H<sub>2</sub>O/0,1% TFA en 60 minutes sur colonne C18 Nucléodur.**

Le spectre obtenu présente de nombreux pics qui correspondent, chacun, à une ou plusieurs molécules ayant des activités biologiques diverses. Il est représentatif de la complexité des venins et de l'étendue de leurs effets biologiques.

## II.1. Tests des fractions

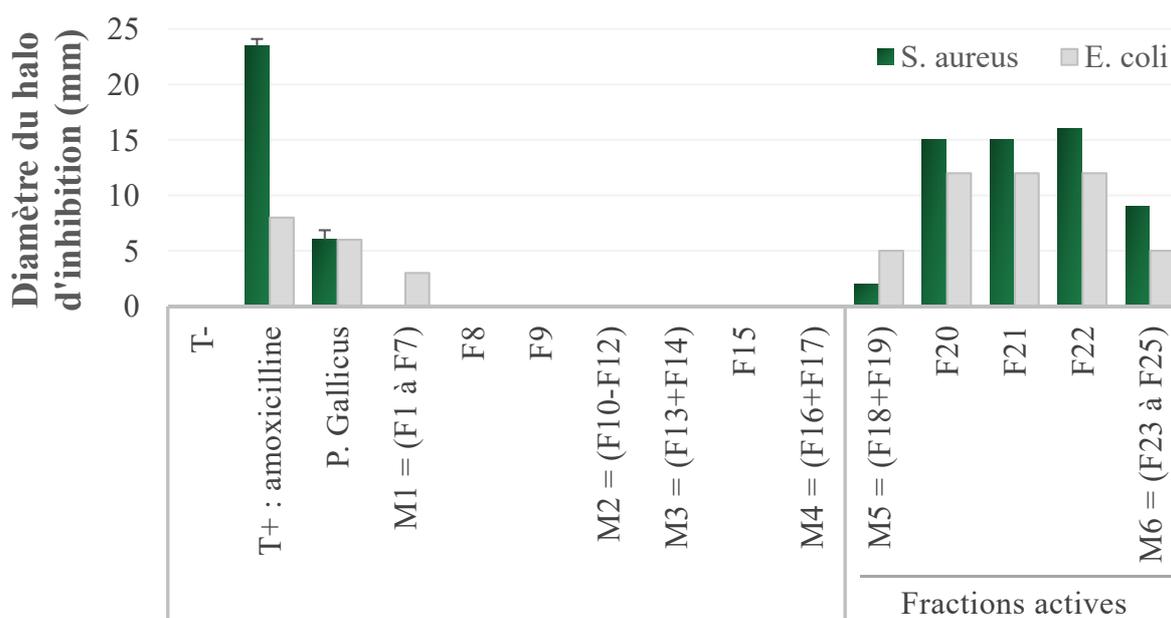
Afin d'identifier les molécules antibactériennes du venin de *P. gallicus*, ce dernier a été fractionné par HPLC préparative en 25 fractions toutes les 3 minutes, nommées F1 à F25 (Figure 34).



**Figure 34 : Fractionnement de 50mg de venin *Polistes gallicus* sur HPLC préparative selon un gradient 0-80% de tampon B pendant 80 minutes et un débit à 6 mL/min sur colonne C18 Nucléodur.**

Les fractions F1 à F25 sont récupérées toutes les 3 minutes.

D'après la Figure 32, à 100 $\mu$ g le venin *P. gallicus* est autant actif contre *S. aureus* et *B. subtilis* (halo d'inhibition de 6 mm). La souche *S. aureus* étant pathogène, elle a été sélectionnée pour la suite des tests. En revanche, *E. coli* est plus sensible que *P. aeruginosa* à cette concentration. Les fractions ont donc ensuite été testées contre *S. aureus* et *E. coli*, bactéries Gram positive et Gram négative les plus sensibles au venin entier (Figure 35).



**Figure 35 : Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions du venin *Polistes gallicus* contre *S. aureus* et *E. coli*.**

T- : eau milliQ stérile. T+ : amoxicilline 1,25µg contre *S. aureus* et 5µg contre *E. coli*. Venin de *P. gallicus* testé à 100µg. Certaines fractions ont été mélangées ensemble selon le profil obtenu (M1=F1 à F7 ; M2=F10 à F12 ; M3 = F13+F14, M4 =F16+F17, M5=F18+F19 et M6=F23 à F25). (n=1).

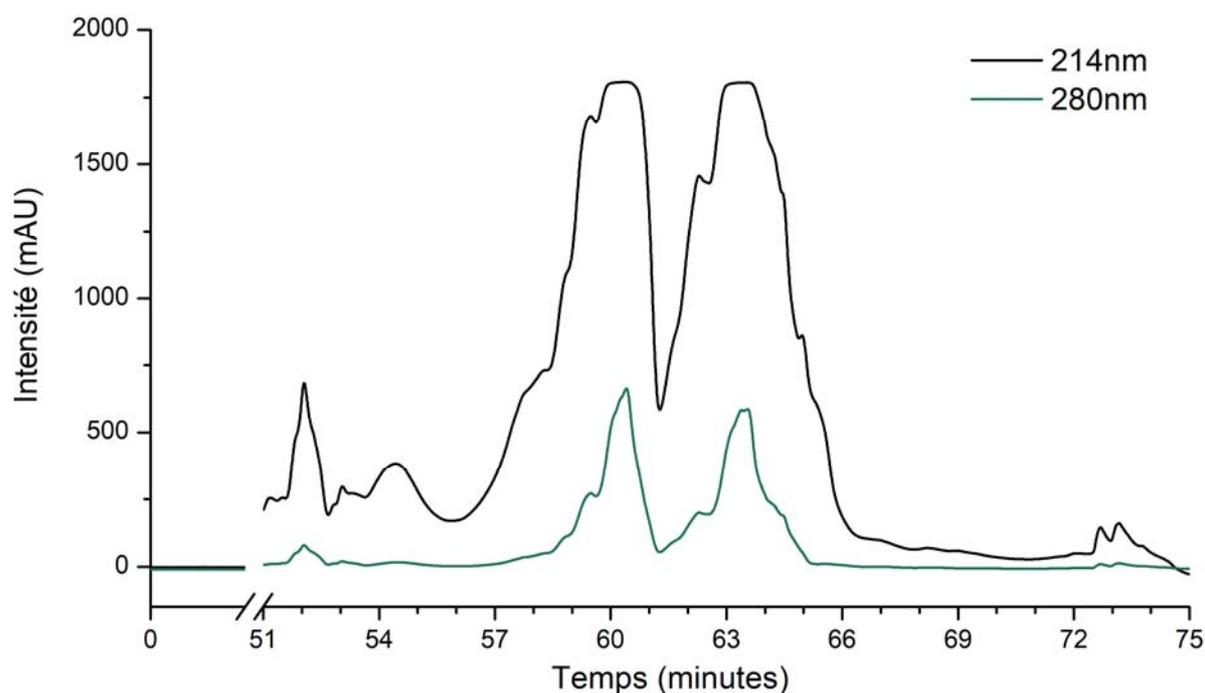
L'activité antibactérienne du venin *P. gallicus* est portée par plusieurs molécules. Deux zones actives se distinguent. Bien que le mélange des fractions F1 à F7 inhibe la croissance d'*E. coli*, cette inhibition reste faible (3 mm). L'activité antibactérienne du venin est principalement exercée par les molécules contenues dans les fractions F18 à F25. Cette partie du venin complexe est très concentrée et riche en molécules. Les fractions F20, F21 et F22 apparaissent comme étant les plus actives, mais cela peut venir du fait qu'elles soient plus concentrées en molécules d'intérêts.

Pour les mêmes quantités testées, *S. aureus* est plus sensible que *E. coli* aux fractions de *P. gallicus*. Les tests réalisés suite aux étapes successives de purification pour l'identification des molécules d'intérêts ont été réalisés uniquement contre *S. aureus*.

## II.2. Tests des sous-fractions

La zone active en début de gradient a été sous-fractionnée jusqu'à purification d'une molécule qui aurait une masse de 132 Da et une formule  $C_4H_8N_2O_3$ , mais dont nous ignorons la structure.

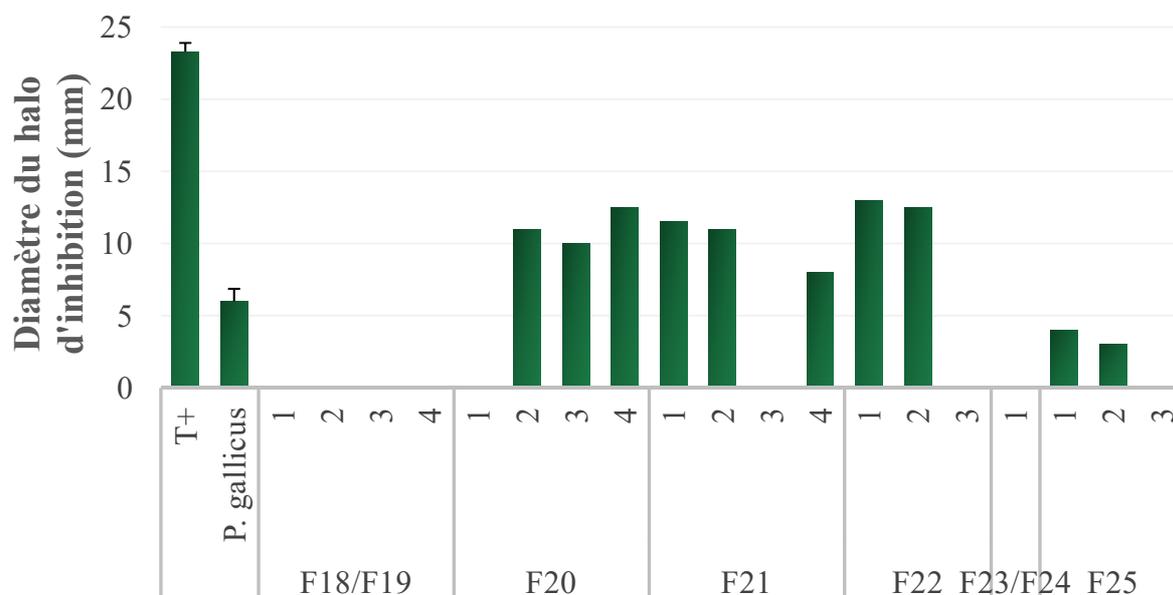
Après avoir identifié la zone active, le venin a été fractionné plus finement dans cette zone, de 51 à 75 minutes d'éluion (**Figure 36**).



**Figure 36 : Profil HPLC préparative de la zone fractionnée pour isoler les molécules antibactériennes du venin de *P. gallicus*.**

Purification de 50mg de venin *Polistes gallicus* sur HPLC préparative selon un gradient 0-80% de tampon B pendant 80 minutes et un débit à 6 mL/min sur colonne C18 Nucléodur.

Les 19 fractions obtenues ont été lyophilisées, pesées et reprises à une concentration d'environ 10 mg/mL. Elles ont ensuite été testées contre *S. aureus* (**Figure 37**).



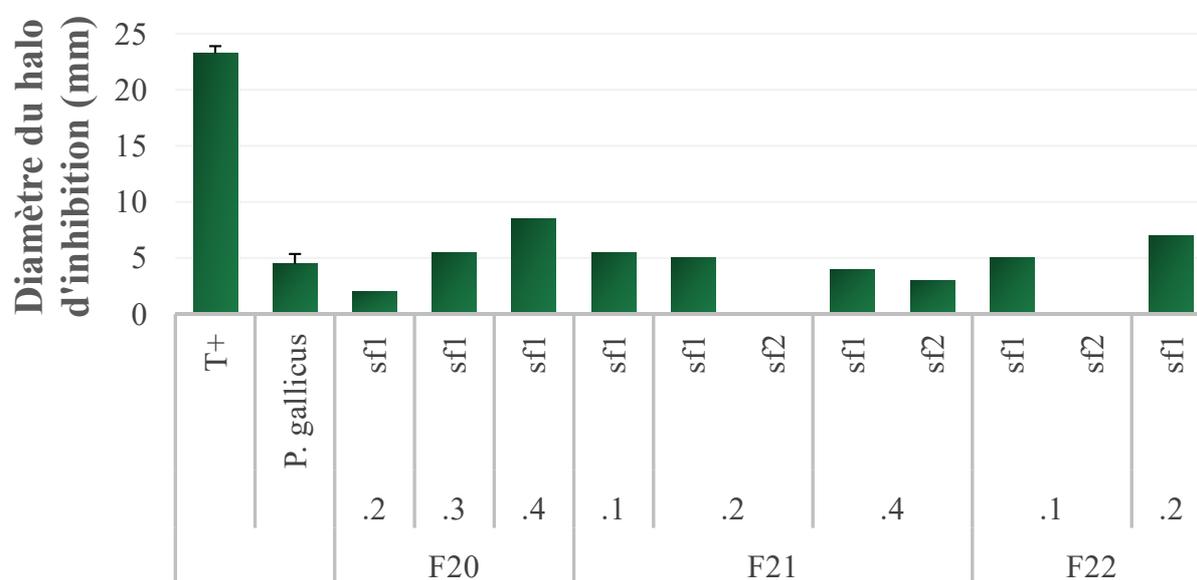
**Figure 37 : Evaluation de l'activité antibactérienne des sous-fractions de F18-F25 du venin *Polistes gallicus* contre *S. aureus*.**

T+ : amoxicilline 1,25µg contre *S. aureus*. Venin de *P. gallicus* entier testé à 100µg. (n=1).

La Figure 37 montre que 10 sous-fractions contiennent des molécules capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* avec des halos supérieurs à celui obtenu avec 100µg de venin entier. Ces sous-fractions sont : F20.sf2, sf.3, sf4, F21.sf1, sf2, sf4, F22.sf1, sf2 ainsi que F25.sf1 et sf2.

### II.3. Tests des produits purifiés

Parmi les 10 sous-fractions actives obtenues, nous nous sommes focalisés sur la purification des 8 sous-fractions les plus actives (F20-F22). Des étapes successives de sous-fractionnement, de lyophilisation et de tests de l'activité antibactérienne ont été répétées jusqu'à l'obtention de 11 molécules purifiées qui ont par la suite été enrichies et testées contre *S. aureus* (Figure 38).



**Figure 38 : Evaluation de l'activité antibactérienne des sous-sous-fractions de F20, F21 et F22 du venin *Polistes gallicus* contre *S. aureus*.**

T+ : amoxicilline 1,25µg contre *S. aureus*. Venin de *P. gallicus* entier testé à 100µg. (n=1).

Finalement, 9 produits purs inhibant *S. aureus* ont été identifiés.

### III. Caractérisations physico-chimiques des molécules antibactériennes

#### III.1. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Neuf molécules actives ont été isolées à partir du venin *P. gallicus*. Afin de connaître la structure et la nature de ces molécules supposées peptidiques, une caractérisation physico-chimique a été réalisée.

La première étape de caractérisation concerne la détermination de la masse des produits qui a été obtenue par spectrométrie de masse par désorption et ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Un système d'ionisation adapté aux échantillons biologiques couplé à un analyseur de temps de vol (TOF), qui permet la détermination des masses globales de nos produits (Tableau 6).

**Tableau 6 : Masses globales des différents échantillons purifiés.**

Echantillons	Masses mesurées (Da)
F20.2.sf1	2017.30 et -16, +22 et +38
F20.3.sf2	2017.30 et -16, +22 et +38
F20.4.sf1	1855.37, +22, +38, +44
F21.1.sf1	1855.37, +22, +38, +44
F21.2.sf1	1855.37, +22, +38, +44
F21.4.sf1	2072.37 et +22
F21.4.sf2	1910.34, et +22, +32, +38 et +44
F22.1.sf1	1839.15, et +22, +32 et +44
F22.2.sf1	1266.87, et +22, +32 et +44

D'après les spectres obtenus, tous les échantillons correspondent vraisemblablement à des produits purs. La masse mesurée des différents produits permet de conclure qu'en réalité 6 molécules ont été purifiées, certaines ayant la même masse et étant contenues dans les mêmes fractions initiales. Ces produits sont nommés Gal1 à Gal6 (Tableau 7). Leurs spectres de masse sont présentés en Annexe (Annexes 1 à 6).

**Tableau 7 : Tableau récapitulatif des masses des produits Gal1, 2, 3, 4, 5 et 6 purs.**

Echantillons	Masses mesurées (Da)
<b>Gal1</b>	2017,30 et -16, +22 et +38
<b>Gal2</b>	1855,37, +22, +38, +44
<b>Gal3</b>	2072,37 et +22
<b>Gal4</b>	1910,34, et +22, +32, +38 et +44
<b>Gal5</b>	1839,15, et +22, +32 et +44
<b>Gal6</b>	1266,87, et +22, +32 et +44

Les incréments observés étant pour la plupart des adduits de sodium (+22 Da) ou/et de potassium (+38 Da). Les adduits +32 ou - 16 peuvent correspondre à des états d'oxydation différents et +44 Da peut correspondre à un double chargé en sodium.

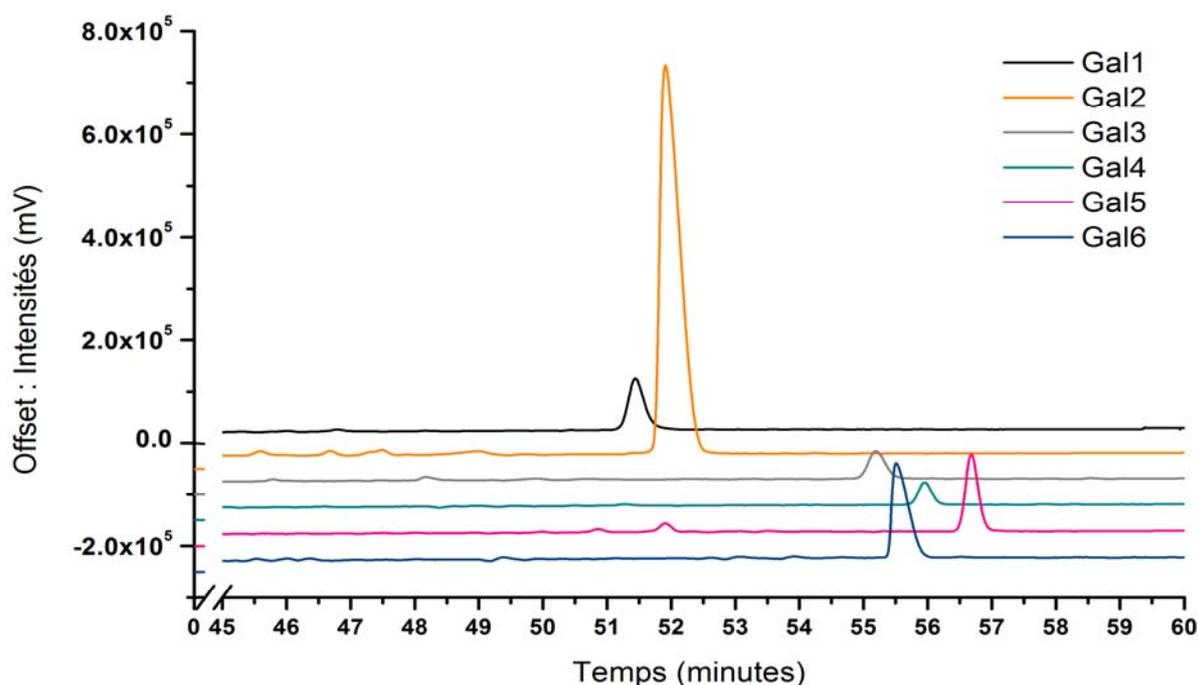
La molécule **Gal2**, 1855,37 Da, pourrait correspondre à la Dominulin A (1854Da), un peptide antimicrobien isolé du venin *Polistes dominula*, qui est également une espèce de guêpes à papier sociales présente en Europe <sup>395</sup>.

De même, le produit **Gal4**, de masse 1910,34 Da pourrait correspondre à la Dominulin B, un peptide antimicrobien également isolé du venin de *Polistes dominula* qui possède 71% d'homologie avec la Dominulin A <sup>395</sup>.

Par ailleurs, **Gal1** et **Gal3** correspondent aux masses de Gal2 et Gal4 respectivement, plus un incrément de 162Da. Or, il est connu que les venins de guêpes (hémynoptères), dont sont extraits ces produits, peuvent présenter des motifs plus ou moins riches de N- ou O-glycosylation <sup>361,396-398</sup>.

Les produits **Gal5** et **Gal6**, semblent être des produits de masses originales n'ayant pas de modification post-traductionnelle. L'ensemble de ces hypothèses pourront être confirmées grâce à un séquençage N-terminal.

Après cette analyse de masse globale, six produits homogènes ont été sélectionnés pour la suite de la caractérisation. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, compris entre 1,8 et 2,1 kDa. L'empreinte spectrale de ces produits nommés Gal1 à Gal6 est présentée **Figure 39**.



**Figure 39 : Chromatogrammes des produits Gal1 à Gal6 purifiés.**

Profils obtenus sur HPLC analytique selon une élution sur colonne C18 Nucléodur, un gradient allant de 0 à 60% d'ACN+10% $H_2O$ +0,1% TFA en 60 minutes, suite à une phase stationnaire de 3 minutes à 100% d' $H_2O$ +0,1% TFA et un débit de 1 mL/min.

### III.2. Séquençage

Parmi l'ensemble des composants des venins de guêpes, les peptides ayant une gamme de poids moléculaire comprise entre 1,4 et 7 kDa sont prédominants, représentant jusqu'à 70% des venins secs des guêpes sociales <sup>389,399</sup>.

Les produits Gal1 à Gal6 supposés être de nature peptidique ont été séquencés en N-terminal par la méthode d'Edman. Les séquences obtenues sont présentées dans le **Tableau 8** ci-dessous :

**Tableau 8 : Tableau récapitulatif des séquences obtenues par séquençage N-terminal.**

Peptides	Masses mesurée (Da)	Séquences	Masse de la séquence (Da)	$\Delta$ Masse (Da)
Gal1	2017,30	INWKKIAEVGGKILS-	1654,97	362,33
Gal2	1855,37	INWKKIAEVGGKILS-	1654,97	200,4
Gal3	2072,37	INWKKIAEIGKQVLSA-	1797,05	275,32
Gal4	1910,34	INWKKIAEIGKQVLS-	1726	184,34
Gal5	1839,15	INWGKIAEIGKQVLS	1655,95	183,2
Gal6	1266,87	ILSAILGLLKNL	1266,87	/

K en rouge = lysines modifiées hypothétiques.

Suite à l'obtention des séquences, la première des hypothèses formulées précédemment concernant la similitude entre Gal1 et Gal2 d'une part et Gal3 et Gal4 d'autre part est vérifiée.

Bien que les séquences obtenues pour **Gal1** et **Gal2** soient incomplètes, -362Da et -200Da, respectivement, elles sont identiques. La séquence de Gal 2 corrélée à sa masse de 1855 Da, nous indique qu'il s'agirait bien de la Dominulin A <sup>395</sup>. Les résidus manquant en C-terminal seraient donc une Sérine (S) et une Leucine (L) dont la masse correspondrait à l'écart entre la masse de la séquence et celle mesurée.

L'ajout du dipeptide (-SL) en C-terminal de la séquence proposée pour Gal1, ramènerait la différence avec la masse globale mesurée à 162 Da. Par ailleurs, aux cycles 4, 5 et 12 de séquençage sont apparus à la fois un pic de Lysine et un doublet de pics qui se situent au niveau de la Proline et devant la Proline. Ces pics pourraient être interprétés comme une Lysine modifiée sur sa chaîne latérale. D'après la littérature, les pics de lysine N- $\epsilon$ -methyl, lysine N- $\epsilon$ -dimethyl et lysine N- $\epsilon$ -tri-methyl sont localisés entre les pics de Tyrosine et de Proline qu'il faudrait confirmer par un standard de PTH Methyl-dimethyl-trimethyl-Lysine dans les mêmes conditions de chromatographie <sup>400</sup>.

Comme pour Gal1, les lysines en position 5 et 11 de la séquence proposée pour **Gal3** présentent potentiellement des modifications au niveau de leurs chaînes latérales. Cette séquence semble également incomplète puisqu'elle présente un écart de 275,32Da avec la masse expérimentale mesurée (de 2072,37Da). Par ailleurs, elle présente un alignement parfait avec **Gal4**, sachant qu'il manque un ou plusieurs résidus d'acides aminés en C-terminal avec un  $\Delta$ Masse de 184,34 Da par rapport à la masse globale mesurée (de 1910,34Da). Ce peptide pourrait effectivement correspondre à la Dominulin B de masse identique et dont la séquence se termine par -AL correspondant à la différence de masse existant entre la séquence obtenue et la masse globale mesurée <sup>395</sup>. Comme pour Gal1, l'ajout du dipeptide (-AL) à l'extrémité C-terminale de la séquence proposée pour Gal3, ramènerait la différence avec la masse globale mesurée à 162 Da.

La séquence obtenue de **Gal5** diffère de 183,2 Da qui pourraient correspondre aux acides aminés (-AL), (-LA), (-PS) ou (-SP) manquants côté C-terminal. Cette séquence possède un alignement quasi-parfait (93%) avec la Dominulin B. Il diffère par une mutation GK en position

4. En outre, les deux derniers résidus d'acides aminés sont (-AL), qui est l'un des quatre enchainements candidat présentés auparavant.

Enfin, le séquençage N-terminal a permis d'obtenir la séquence entière de **Gal6**.

### III.3. Analyse en Acides Aminés

Afin de confirmer la séquence de Gal6 et déterminer la séquence des régions C-terminale manquantes des peptides Gal1 à 5, une analyse en acides aminés (A.A.A.) par hydrolyse acide a été réalisée.

La composition en acides aminés théorique des peptides Gal1 à Gal6 est présenté **Tableau 9**, ci-dessous :

**Tableau 9 : Composition en acides aminés des peptides Gal1, 2, 3, 4, 5 et 6.**

A.A. (Code une lettre)	Nbre A.A théoriques					
	Gal1	Gal2	Gal3	Gal4	Gal5	Gal6
<b>Asp/Asn (D/N)</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Ser (S)</b>	2	/	1	1	1	1
<b>Glu/Gln</b>	1	1	2	2	2	/
<b>Gly (G)</b>	2	2	2	1	2	1
<b>Ala (A)</b>	1	1	2	2	2	1
<b>Val (V)</b>	1	1	1	1	1	/
<b>Ile (I)</b>	3	3	3	3	3	2
<b>Leu (L)</b>	2	2	2	2	2	5
<b>Lys (K)</b>	3	3	3	3	2	1
<b>Autres</b>	0	0	0	0	0	0

La composition en acides aminés (A.A) après hydrolyse acide confirme la séquence I<sub>1</sub>L<sub>12</sub> du peptide Gal6 obtenue par séquençage d'Edman (**Tableau 9**). Cependant, l'analyse en acides aminés obtenue pour les 5 autres peptides ne nous permet pas de déterminer leurs séquences finales. Une analyse MS/MS a donc été effectuée.

### III.4. Analyse MS/MS

Afin d'identifier le reste des séquences de Gal1 à 5, les résultats de l'A.A.A. ont été mis en relation avec ceux de séquençage N-terminal et une analyse MS/MS effectuée après digestion des peptides par l'endoprotéinase GluC. La Glu-C est une sérine protéase qui clive les acides glutamiques et aspartiques en C-terminal<sup>401</sup>. En raison de leurs sites de clivage spécifiques, ces

protéinases créent des fragments peptidiques uniques disponibles pour l'analyse par spectrométrie de masse et permettent ainsi de confirmer la séquence des peptides.

La séquence de **Gal1** obtenue après séquençage est I-N-W-K-K-I-A-E-V-G-G-K-I-L-S-(-X=362,4 Da) et les lysines seraient modifiées. D'après la quantification en acides aminés et la digestion par la GluC suivie par analyse MS/MS, les A.A. manquant seraient une sérine et une leucine (**Annexe 7**). Les 162 Da restant pourraient correspondre aux molécules greffées sur les lysines modifiées ( $162/3 = 54\text{Da}$ ). Le peptide digéré par GluC donne deux fragments de peptides majoritaires :  $M^{+H} = 1001,6 \rightarrow (I/L)NWKK(I/L)AE$  et  $M^{+H} = 872,5\text{Da} \rightarrow VGGK(I/L)(I/L)SS(I/L)$ . La séquence de Gal1 serait donc : INWKKIAEVGGKILSSL, où hypothétiquement les lysines seraient modifiées par une molécule de 54 Da (**Tableau 10**).

La séquence de **Gal2** obtenue I-N-W-K-K-I-A-E-V-G-G-K-I-L-S-(-X) corrélée à sa masse de 1854 Da, nous indique qu'il s'agirait de la Dominulin A<sup>395</sup>. L'analyse en acides aminés confirme la présence supplémentaire d'une leucine (**Tableau 9**). De même pour l'analyse MS/MS (**Annexe 8** et **Tableau 10**). La séquence de Gal2, INWKKIAEVGGKILSL, correspond bien à la Dominulin A.

La séquence de **Gal3** après séquençage est I-N-W-K-K-I-A-E-I-G-K-Q-V-L-S-A-(-X= 275,32 Da) qui présente potentiellement des lysines modifiées sur sa chaîne latérale en position 5 et 11. L'acide aminé manquant en C-terminal est une leucine et 162 Da pouvant correspondre aux molécules greffées sur les lysines modifiées ( $162/2 = 81\text{Da}$ ) (**Annexe 9**, **Tableaux 9 et 10**).

La séquence de **Gal4** serait I-N-W-K-K-I-A-E-I-G-K-Q-V-L-S-(-X=184,34 Da). La quantification en acides aminés confirme la présence de (-AL) ou (-LA) en C-terminal (**Tableau 9**). La séquence obtenue par MS/MS après digestion par la GluC donne  $M+H = 1001,6 \text{ Da} \rightarrow (I/L)NWKK(I/L)AE$  et  $M+H = 927,6 \text{ Da} \rightarrow (I/L)GKQV(I/L)SA(I/L)$  (**Tableau 10** et **Annexe 10**). La séquence finale est donc INWKKIAEIGKQVLSAL confirmant qu'il s'agit de la Dominulin B<sup>395</sup>.

La séquence de **Gal5** I-N-W-G-K-I-A-E-I-G-K-Q-V-L-S-(-X) est incomplète à l'extrémité C-terminale. D'après la masse mesurée et la recherche bibliographique les acides aminés manquant seraient (-AL). Cette hypothèse est confirmée par la quantification en acides aminés, sachant que le tryptophane est dégradé lors de l'hydrolyse acide (**Tableaux 9 et 10**).

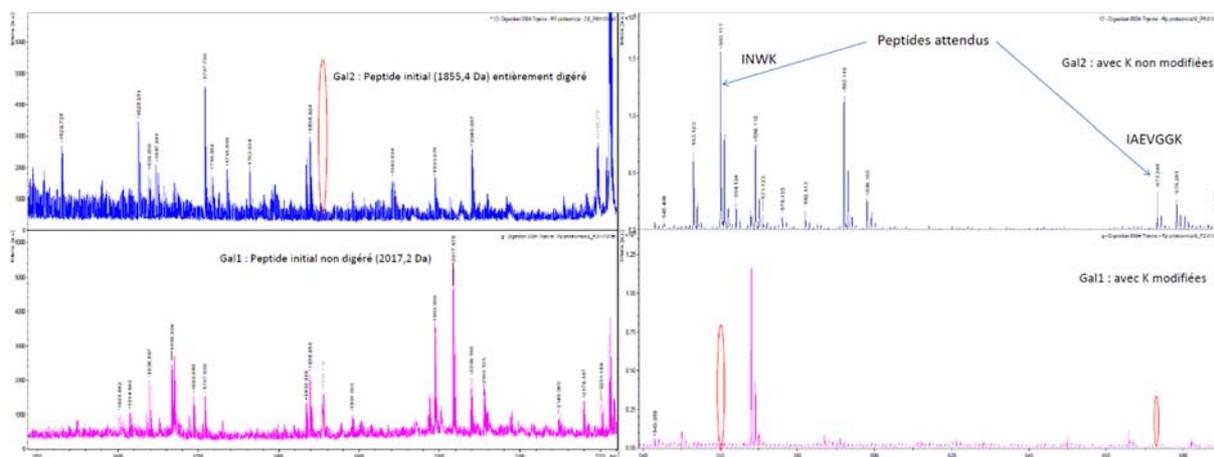
**Tableau 10 : Séquence en acides aminés des peptides Gal1 à Gal6.**

Les flèches allant vers la droite (→) indiquent les résidus identifiés par le séquençage d'Edman (N-terminal). Les flèches allant vers la gauche (←) indiquent les résidus déterminés par MS/MS avec et sans digestion à la Glu-C.

Peptides	Masses (M <sup>+</sup> H)	Séquences proposées	Masse Séquence
<b>Gal1</b>	2017,30 Da (MALDI)	I N W <b>K K</b> I A E V G G <b>K</b> I L S <u>S</u> <u>L</u>	1855,059 Da (+162 Da)
		→→→→→→→→→→→→→→→→	1654,97 Da
	2017,13 Da (MS/MS)	←←←←←←←←←←←←←←←←	1627,96 Da
		Digestion GluC : ←←←←←←←← ←←←←←←←←←←←←←←←←	1001,65 Da (M <sup>+</sup> H) 872,637 Da (M <sup>+</sup> H)
<b>Gal2</b>	1855,37 Da	I N W K K I A E V G G K I L S <u>L</u>	1855,059 Da
		→→→→→→→→→→→→→→→→	1655,059 Da
		←←←←←←←←←←←←←←←←	1855,059 Da
<b>Gal3</b>	2072,37 Da (MALDI)	I N W <b>K K</b> I A E I G <b>K</b> Q V L S A <u>L</u>	1909,98 Da (M <sup>+</sup> H) + (162 Da)
		→→→→→→→→→→→→→→→→	1797,04 Da
		←←←←←←←←←←←←←←←←	1683 Da
		Digestion GluC : ←←←←←←←←←← ←←←←←←←←←←←	1001,6 Da (M <sup>+</sup> H) 927,6 Da (M <sup>+</sup> H)
<b>Gal4</b>	1910,34 Da (MALDI)	I N W K K I A E I G K Q V L S <u>A L</u>	1910,34 Da
		→→→→→→→→→→→→→→→→	
		←←←←←←←←←←←←←←←←	1910,1 Da (MS/MS)
	Digestion GluC : ←←←←←←←←←← ←←←←←←←←←←←	1001,6 Da 927,6 Da	
<b>Gal5</b>	1839,15 Da	I N W G K I A E I G K Q V L S <u>A L</u>	1839,15 Da
		→→→→→→→→→→→→→→→→	
<b>Gal6</b>	1266,87 Da	I L S A I L G L L K N L	1266,87 Da
		→→→→→→→→→→→→→→→→	

Afin de confirmer la présence de lysines modifiées sur les chaînes latérales des peptides Gal1 et Gal3, ces derniers ont été digérés à la trypsine. Les « fragments » obtenus ont été analysés par MS/MS. Ces expériences ont été réalisées en parallèle contre Gal2 et Gal4 qui possèdent respectivement la même séquence que Gal1 et Gal3, et serviront ensuite de témoin positif de la digestion. La trypsine est une sérine-protéase qui hydrolyse la liaison peptidique en C-terminale d'une lysine ou d'une arginine. Nos peptides ne contiennent pas d'arginine. La digestion se fera donc aux niveaux des lysines. La trypsine peut dans la plupart des cas digérer des résidus de lysine non modifiés, en revanche elle est incapable de digérer les lysines modifiées (ex : acétylées en raison des effets stériques et de la perte de charge positive sur le groupe ε-amine)

Le peptide Gal2 a été entièrement digéré par la trypsine. Les fragments obtenus sont ceux attendus, validant ainsi la méthode. En revanche, le peptide Gal1 n'a pas du tout été digéré confirmant la présence de lysines modifiées sur sa chaîne latérale (**Figure 40**).



**Figure 40: Spectres MS/MS obtenus suite à la digestion des peptides Gal2 (en haut, en bleu) en comparaison avec Gal1(en bas, en rose).**

Les digestions à la trypsine de Gal3 sont en cours de réalisation. Elles sont effectuées en comparaison avec le peptide Gal4, non modifié.

### III.5. Comparaison avec la littérature

Les peptides antimicrobiens sont un composant immunitaire humoral basique de la plupart des organismes y compris les guêpes contre les pathogènes microbiens envahissants<sup>389,403,404</sup>. Les guêpes sociales produisent une variété de PAMs (dans leur salive et leur glandes à venins)<sup>405</sup>. La plupart des PAMs isolés à partir de venins de guêpes appartiennent à la famille des mastoparans, des peptides chimiotactiques et des kinines<sup>389,392</sup>.

Six peptides antimicrobiens ont été isolés du venin de guêpe *Polistes gallicus* (**Tableau 11**). Ce sont des PAMs cationiques de charge nette allant de +1 (Gal5 et 6) à + 2 (Gal1 à 4).

**Tableau 11 : Masses et séquences des peptides antimicrobiens Gal1, 2, 3, 4, 5 et 6 isolés à partir du venin de guêpe *Polistes gallicus*.**

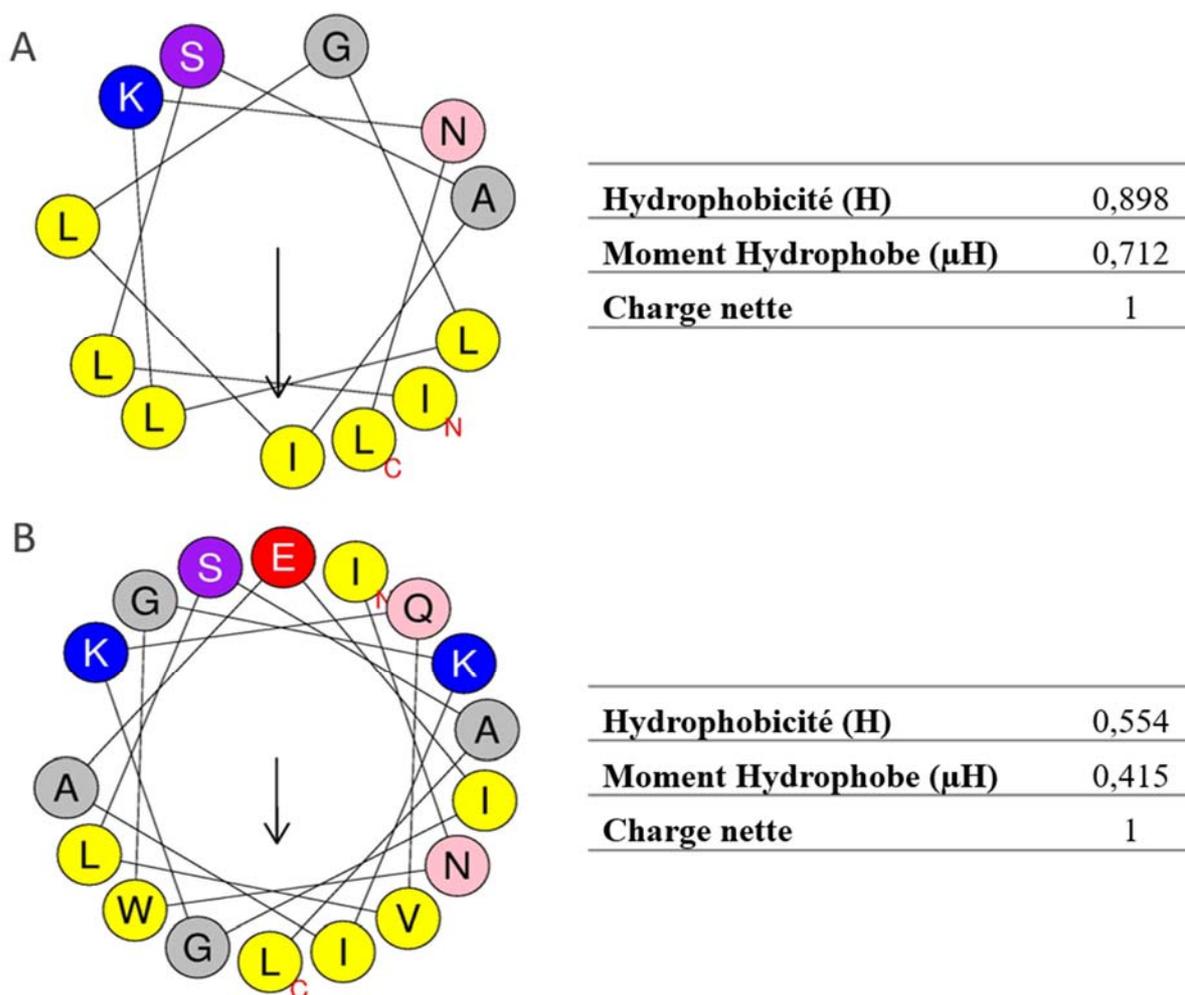
Peptides	Masses (monoisotopiques)	Séquences
<b>Gal1 : Dominulin A</b> « modifié »	2017 Da	INW <b>K</b> KIAEVGG <b>K</b> ILSSL + lysines modifiées
<b>Gal2 : Dominulin A</b>	1855 Da	INWKKIAEVGGKILSSL
<b>Gal3 : Dominulin B</b> « modifié »	2072 Da	INW <b>K</b> KIAEIG <b>K</b> QVLSAL + lysines modifiées
<b>Gal4 : Dominulin B</b>	1910 Da	INWKKIAEIGKQVLSAL
<b>Gal5</b>	1839 Da	INWGKIAEIGKQVLSAL
<b>Gal6</b>	1266 Da	ILSAILGLLKNL

La structure primaire des peptides Gal1 à Gal5 suggère qu'ils appartiennent à la famille des mastoparans qui est la classe de peptide la plus abondante dans le venin de guêpes de la famille des *Vespidae*, dont fait partie *P. gallicus*<sup>389</sup>. En effet, la plupart des peptides de type mastoparans ont 2 ou 3 lysines. Ceux avec 3 résidus de lysine ont généralement un résidu seul (-K-) séparément de deux résidus (-KK-) (cf. **Gal1 à Gal4**)<sup>389</sup>. Par ailleurs, ils sont riches en acides aminés hydrophobes, entre 7 et 10 résidus, tels que A, G, I et L, et basiques tels que K<sup>387,406</sup>. Les peptides semblables au mastoparans, tels que Gal1 à Gal5, sont des peptides cationiques structurés en hélice  $\alpha$  qui agiraient par perforation de la membrane plasmique et qui ont été identifiés dans un large éventail de guêpes sociales<sup>407-410</sup>.

Le peptide Gal6, en revanche, appartiendrait plutôt à la famille des peptides chimiotactiques, second groupe peptidique majeur des venins de guêpes de la famille des *Vespidae*. Ces peptides possèdent des motifs représentatifs tel que XX(G/R)XX où X est un acide aminé hydrophobe, le plus souvent I ou L. Nous retrouvons ce motif dans la structure primaire de Gal6 sous la forme ILGLL. Par ailleurs, les peptides chimiotactiques ne possèdent pas ou possèdent seulement un résidu de lysine, rarement deux. Comme les mastoparans, les peptides chimiotactiques adoptent généralement une structure secondaire amphipathique,  $\alpha$ -hélicoïdale en contact avec une membrane<sup>389</sup>.

Des propriétés physico-chimiques supplémentaires, telles que l'hydrophobicité, le moment hydrophobe, la charge nette à pH neutre et la représentation en roue hélicoïdale (diagramme 2D) des peptides Gal5 et Gal6 ont été déterminées au moyen du logiciel en ligne Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) (**Figure 41**)<sup>411</sup>. La structure

secondaire ainsi que son effet sur l'activité biologique de nos peptides pourraient être déterminés par spectroscopie à dichroïsme circulaire<sup>a 412</sup>.



**Figure 41 : Représentation en roue hélicoïdale et propriétés physico-chimique des peptides Gal6 (A) et Gal5 (B) obtenues au moyen du logiciel en ligne Heliquist.**

Les peptides antimicrobiens Gal2 et Gal4 correspondent à la Dominulin A et B respectivement, déjà décrits dans la littérature pour leur activité antibactérienne contre Gram + et Gram<sup>-395</sup>. Gal1 et Gal3 sont des Dominulin A et B qui seraient modifiées au niveau des lysines avec à priori 3 groupements de 54 Da pour Gal1 et 2 groupements de 81 Da pour Gal3.

La Dominulin A et B possèdent 71% d'homologie. Ce sont des peptides antimicrobiens isolés la première fois à partir du venin *Polistes dominula*, qui est également une guêpe de papier européenne appartenant au sous-genre *Polistes*<sup>384,395,413</sup>. *P. dominula* et *P. gallicus* sont des

<sup>a</sup> La spectroscopie par dichroïsme circulaire permet d'étudier la structure secondaire (hélices, feuillets, etc.) de peptides ou protéines en solution. Cette technique utilise peu de matériel et ne le détruit pas.

espèces apparentées d'un point de vue phylogénétique, biogéographique et écologique <sup>414</sup>. Elles ont été décrites pour leur activité antibactérienne contre *B. subtilis* ATCC 6633 (CMI = 2 µg/mL = 1,09 µM) et *E. coli* JM 109 (CMI = 8 µg/mL = 4,3 µM) <sup>395</sup>.

Ainsi seuls les peptides Gal5 et Gal6 sont originaux. Cependant, le peptide Gal5 est très proche de la Dominulin B, avec laquelle il possède 93% d'identité. Ils ne diffèrent que par une mutation GK en position 4. Le peptide Gal5, sera nommé pour la suite de notre étude Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>).

Notre étude pharmacologique portera principalement sur le peptide Gal6, nommé par la suite Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Ce peptide original de 12 acides aminés présente néanmoins des homologues avec d'autres peptides isolés du venin de guêpes sociales (**Tableau 12**). Sa séquence est à 83% identique à celle du peptide Polistes-Protonectine isolé à partir du venin de la guêpe sociale *Polistes rothneyi iwatai* du Japon. Ces deux séquences diffèrent par deux mutations IL et NS en positions 5 et 11 respectivement. Cependant, ce peptide n'est pas décrit pour son activité antibactérienne <sup>415</sup>. Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) présente également 75% d'identité avec le peptide Polybia Chemotactic Peptide (Polybia-CP). Les mutations correspondent à SG, AT et NS en positions 3,4 et 11 respectivement <sup>408,416</sup>. Ce peptide a été isolé du venin de *Polybia paulista* une espèce de guêpe sociale du Brésil. Il possède une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives *B. subtilis* CCT 2576 et *S. aureus* ATCC 6538 (CMI = 15 µg/mL = 11,8 µM). En revanche, il ne présente qu'une faible activité contre les bactéries Gram-négatives *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 15422 (CMI = 250 µg/mL = 190 µM) <sup>408</sup>. Le peptide Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), présente également 75% d'homologie avec la Protonectine ou Agelaia Chemotactic Peptide (Agelaia-CP). Initialement rapportée dans le venin de la guêpe sociale *Protonectarina sylveirae*, elle a également été identifiée plus tard dans le venin d'*Agelaia pallipes pallipes*. Ce peptide polyfonctionnel présente notamment une antibiose contre les bactéries Gram + et Gram - <sup>417-419</sup>. Enfin, Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) présente 75% d'identité avec le peptide PMM3 <sup>409</sup>. Les mutations IF, IL, et LM se situent en positions 1, 5 et 8 respectivement.

**Tableau 12 : Séquences des peptides isolés à partir de venin de guêpes sociales présentant une forte homologie avec celle de Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>).**

Les différences en A.A. des séquences par rapport à Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) sont mentionnées en rouge.

Peptides	Séquences	Origine
Gal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	ILSAILGLLKNL	<i>Polistes gallicus</i>
Polistes-Protonectine	ILSALLGLLKSL	<i>Polistes rothneyi iwatai</i>
Polybia-CP	ILGTILGLLKSL	<i>Polybia paulista</i>
Protonectine = Agelaia-CP	ILGTILGLLKGL	<i>Protonectarina sylveirae</i> , <i>Agelaia pallipes pallipes</i>
PMM3	FLSALLGMLKNL	<i>Polistes major major</i>

## IV. Caractérisations pharmacologiques

Suite à la l'identification de six molécules antibactériennes et de leur caractérisation physico-chimique, deux peptides présentent des séquences originales sur lesquels ont été effectuées les caractérisations pharmacologiques. L'étude s'est principalement axée sur le peptide Gall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>).

### IV.1. Etude préliminaire de relation structure/activité à l'aide d'analogues de synthèse

La séquence des peptides antimicrobiens étant déterminée, il est possible de les synthétiser par voie chimique en quantité importante pour pouvoir caractériser leur activité pharmacologique. En outre, la synthèse d'analogues permet d'identifier les résidus jouant un rôle dans l'activité du peptide et de démontrer la spécificité de chacun d'entre eux.

Il est également possible de moduler leur activité antibactérienne et leur toxicité en modifiant leur taille par délétion ou addition d'acides aminés aux extrémités N ou C-terminale et/ou en inversant la séquence. Afin de déterminer les acides aminés essentiels à l'activité, certains A.A. sont délétés ou substitués en respectant ou non la polarité des résidus d'acides aminés. Enfin l'utilisation d'acides  $\alpha$ -aminés, de résidus non naturels ainsi que l'introduction de formes cycliques permettent l'obtention d'analogues plus stables vis-à-vis des dégradations notamment des clivages enzymatiques.

Le peptide Gall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) a été synthétisé et nommé sGall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). A partir de cette séquence, 14 analogues ont été obtenus au laboratoire par voie chimique en phase solide selon la stratégie Fmoc/t-butyl (**Tableau 13**). Les peptides 1.2) à 1.10) sont des analogues structuraux du peptide sGall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) délétés à l'extrémité N- et/ou C- terminale. En revanche, les séquences des peptides 1.13) à 1.15) sont inspirées de celle du peptide sGall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) mais la taille a été modifiée et certains acides aminés ont été substitués par d'autres, modifiant notamment la charge et l'hydrophobicité.

L'ensemble des peptides synthétiques obtenus à partir de sGall(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est récapitulé dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : Caractéristiques du peptide synthétique sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et de ses analogues.**

Peptides	Masses	Séquences	Nombre d'A.A.	Charge	A.A. Hydrophobes
1.1) sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	1266 Da	ILSAILGLLKLN	12	+1	75%
1.2) sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>9</sub> )	911 Da	ILSAILGLL	9	0	89%
1.3) sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	1039 Da	ILSAILGLLK	10	+1	80%
1.4) sGal1(K <sub>10</sub> I <sub>1</sub> )	1039 Da	KLLGLIASLI	10	+1	80%
1.5) sGal1(L <sub>2</sub> K <sub>10</sub> )	926 Da	LSAILGLLK	9	+1	78%
1.6) sGal1(L <sub>2</sub> L <sub>9</sub> )	798 Da	LSAILGLL	8	0	87,5%
1.7) sGal1(L <sub>8</sub> L <sub>12</sub> )	599 Da	LLKNL	5	+1	60%
1.8) sGal1(L <sub>6</sub> L <sub>12</sub> )	769 Da	LGLLKNL	7	+1	71%
1.9) sGal1(S <sub>3</sub> L <sub>12</sub> )	1040 Da	SAILGLLKLN	10	+1	70%
1.10) sGal1(S <sub>3</sub> L <sub>9</sub> )	685 Da	SAILGLL	7	0	85%
1.11) sGal1(L <sub>12</sub> I <sub>1</sub> )	1266 Da	LNKLLGLIASLI	12	+1	75%
1.12) sGal1(D <sub>1</sub> I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	1266 Da	D <sub>1</sub> I <sub>1</sub> D <sub>1</sub> S <sub>1</sub> D <sub>1</sub> A <sub>1</sub> D <sub>1</sub> I <sub>1</sub> D <sub>1</sub> G <sub>1</sub> D <sub>1</sub> L <sub>1</sub> D <sub>1</sub> K <sub>1</sub> D <sub>1</sub> N <sub>1</sub> D <sub>1</sub> L	12	+1	75%
1.13) sGal1(K <sub>1</sub> I <sub>8</sub> )	882 Da	KLLGLILI	8	+1	87,5%
1.14) sGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	1056 Da	R <sub>1</sub> W <sub>8</sub>	8	+1	87,5%
1.15) sGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )	1281 Da	I <sub>1</sub> N <sub>11</sub>	11	+4	54,5%

Le peptide Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) obtenu par voie chimique a été baptisé sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>). Quatre analogues ont été synthétisés à partir de cette séquence. Les peptides sGal2(K<sub>11</sub>L<sub>17</sub>) et sGal2(I<sub>1</sub>K<sub>11</sub>) dont les modifications sont localisées aux extrémités N- et C- terminales. Le peptide sGal2(N<sub>1</sub>S<sub>14</sub>) est un analogue de Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) délété aux extrémités N- et C-terminales et modifié par une substitution d'un acide aminé polaire et une addition d'un acide aminé apolaire. Enfin, sGal<sub>ch</sub>(W<sub>1</sub>W<sub>13</sub>) est une chimère regroupant partiellement des séquences des peptides sGal1 et sGal2.

L'ensemble des peptides synthétisés à partir du peptide sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) sont récapitulés dans le Tableau 14 ci-dessous.

**Tableau 14 : Caractéristiques du peptide synthétique sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) et de ses analogues.**

Peptides	Masses	Séquences	Nombre d'A.A.	Charge	A.A. Hydrophobes
sGal2(I <sub>1</sub> L <sub>17</sub> )	1840Da	INWGTKIAEIGKQVLSAL	17	+1	65%
sGal2(K <sub>11</sub> L <sub>17</sub> )	758 Da	KQVLSAL	7	+1	57%
sGal2(W <sub>3</sub> K <sub>11</sub> )	1001 Da	WGKIAEIGK	9	+1	67%
sGal2(N <sub>1</sub> S <sub>14</sub> )	1742 Da	NWKKIAEIKQVLS	14	+2	50%
sGal <sub>ch</sub> (W <sub>1</sub> W <sub>13</sub> )	1584 Da	WGKGKLLGLWLW	13	+3	77%

IV.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

L'activité antibactérienne *in vitro* des peptides synthétiques a été évaluée, dans un premier temps, contre des bactéries de références Gram positives (*B. subtilis* et *S. aureus*) et Gram négatives (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Elle a été déterminée par la technique de microdilution en milieu liquide à différentes doses de peptides permettant de déterminer leur Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI correspond à la concentration la plus faible requise pour inhiber visuellement la croissance bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Elle permet ainsi de connaître la concentration d'agent antimicrobien efficace contre une souche bactérienne.

L'activité de chaque peptide a été testée au moins dans deux expériences distinctes. Les CMI des peptides obtenues contre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis* sont présentées dans le **Tableau 15** ci-dessous :

**Tableau 15 : Concentration minimale inhibitrice des peptides synthétiques contre la croissance de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis*.**

Peptides	CMI (µM)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	100	6,25-3,1	100-50	3,13-1,56
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>9</sub> )	/	100	/	100
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	50-25	100-50	25-12,5
sGal1(K <sub>10</sub> I <sub>1</sub> )	/	12,5-6,25	100-50	6,25-3,13
sGal1(L <sub>2</sub> K <sub>10</sub> )	/	/	/	100
sGal1(L <sub>2</sub> L <sub>9</sub> )	/	/	/	/
sGal1(L <sub>8</sub> L <sub>12</sub> )	/	/	/	/
sGal1(L <sub>6</sub> L <sub>12</sub> )	/	/	/	/
sGal1(S <sub>3</sub> L <sub>12</sub> )	/	/	/	/
sGal1(S <sub>3</sub> L <sub>9</sub> )	/	/	/	/
sGal1(L <sub>12</sub> I <sub>1</sub> )	50	3,13-1,56	50-25	3,13-1,56
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	100	6,25	100	3,13
sGal1(K <sub>1</sub> I <sub>8</sub> )	/	25	/-50	12,5-6,25
sGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	/	12,5	/	12,5
SGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )	12,5-3,13	/-100	50-6,25	12,5-1,56
sGal2(I <sub>1</sub> L <sub>17</sub> )	25	6,25-3,13	12,5	2,5-1,56
sGal2(K <sub>11</sub> L <sub>17</sub> )	/	/	/	/
sGal2(W <sub>3</sub> K <sub>11</sub> )	/	/	/	/
sGal2(N <sub>1</sub> S <sub>14</sub> )	50	100	50	12,5
sGal <sub>ch</sub> (W <sub>1</sub> W <sub>13</sub> )	/	/	/	100
Mélicitine	6,25	1,56	6,25-12,5	1,56
Amoxicilline	/	0,9	9	0,45-0,9
Gentamycine	0,3	NT	NT	NT

« / » correspond à une valeur de CMI supérieure à 100µM. NT = Non Testé. (n=2) sauf sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>, (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) testés n=4.

Les peptides ayant une CMI inférieure à 100µM semblent agir de manière dose-dépendante contre la croissance des différentes souches testées.

Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) présente un large spectre d'activité. Plus efficace contre la croissance des souches Gram + (CMI=6,25µM et 3,13µM contre *S. aureus* et *B. subtilis* respectivement), il inhibe également les souches Gram – a des doses plus élevées (CMI=100µM et 50µM contre *P. aeruginosa* et *E.coli* respectivement).

L'étude de relation structure/activité à l'aide d'analogues synthétiques montre que l'isoleucine (I) et la lysine (K) sont des acides aminés essentiels à l'activité antibactérienne du peptide Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). En effet, ceux dépourvus de I et/ou de K à leurs extrémités sont très faiblement actifs (sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>9</sub>) et (L<sub>2</sub>K<sub>10</sub>)) ou inactifs (sGal1(L<sub>2</sub>L<sub>9</sub>) à (S<sub>3</sub>L<sub>9</sub>)). Ainsi, seuls les peptides possédant à la fois I et K à chacune de leur extrémité ont un effet antibactérien significatif et ce, contre plusieurs souches : sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>1</sub>I<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). A noter que la présence du tryptophane, plus hydrophobe, à la place de l'isoleucine à l'extrémité C-terminale et de la substitution de la lysine par l'arginine, plus polaire, maintient l'activité antimicrobienne de sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>).

Par ailleurs, l'analogue sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) inhibe fortement la croissance des souches Gram – (CMI = 6,25µM contre *P. aeruginosa* et *E. coli*). Bien qu'il agît également efficacement contre la croissance de *B. subtilis* (CMI=6,25µM), c'est le seul des analogues ayant une activité Gram +/Gram - qui possède une faible activité contre *S. aureus* (CMI ≥ 100µM). La séquence de ce peptide est semblable en taille au peptide parent. En revanche, comparé à ce dernier et à ses variants, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) n'est constitué qu'à 50% d'acides aminés hydrophobes et possède quatre charges positives (4K) contre 80% d'A.A. hydrophobes et une seule charge positive en moyenne pour les autres peptides respectivement. Ce peptide serait plutôt un anti-Gram négatif, contrairement à l'analogue sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) qui lui semble être Gram + spécifique. Ces résultats seront enrichis en criblant ces deux peptides sur un plus grand nombre de souches.

Par ailleurs, sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) plus court et moins actif que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) suggère l'importance des acides aminés délétés N<sub>11</sub> et L<sub>12</sub>. L'activité antibactérienne est améliorée en inversant la séquence (sGal(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>)). De même, l'inverso sGal1(L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>), présente une CMI plus faible que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Ainsi, ces peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>) d'une part et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) d'autre part, présentent la même charge et la même hydrophobicité, mais sont des séquences

miroirs. L'enchaînement des résidus en acides aminés dans un sens ou dans l'autre peut aboutir à deux structures différentes dont l'activité antibactérienne sera plus ou moins importante.

Enfin, la synthèse de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) à partir d'acides  $\alpha$ -aminés (D.A.A.=sGal1(DI<sub>1</sub>L<sub>12</sub>)), énantiomères des acides aminés L.A.A., ne modifie pas l'activité antibactérienne. L'activité de sGal1(DI<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est identique à celle de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) quel que soit la souche bactérienne. Ceci a également été observé pour les énantiomères d'autres PAMs tels que la Magainine 2, Cecropine A, Polybia-MPI ou Protonectine <sup>420-422</sup>.

Le peptide sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) présente également un large spectre d'activité avec un effet comparable à sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) contre les souches Gram + (CMI=6,25 $\mu$ M et 1,56 $\mu$ M contre *S. aureus* et *B. subtilis* respectivement). En revanche, il est quatre fois plus efficace contre les souches Gram - (CMI=25 $\mu$ M et 12,5 $\mu$ M contre *P. aeruginosa* et *E. coli* respectivement). L'étude préliminaire de relation structure/activité montre que les acides aminés localisés aux extrémités N et C-terminales sont essentiels à l'efficacité de la molécule. En effet, les variants sGal2(K<sub>11</sub>L<sub>17</sub>) et (W<sub>3</sub>K<sub>11</sub>), dépourvus de l'une ou de l'autre extrémité sont inactifs. Par ailleurs, ces peptides sont deux fois plus courts que le peptide original, paramètre pouvant aussi influencer sur leur activité <sup>176</sup>. Le peptide sGal2(N<sub>1</sub>S<sub>14</sub>) de taille comparable au peptide original est actif contre l'ensemble des souches. Cependant, il requiert 2 à 4 fois plus de produit pour inhiber la croissance des bactéries Gram - et jusqu'à 30 fois plus pour les Gram +. Ce peptide a été rendu plus cationique et sa proportion d'acides aminés hydrophobes a été abaissée à 50% en déléant I<sub>1</sub>, A<sub>16</sub> et L<sub>17</sub> et en substituant les glycines (G) par le tryptophane (W), plus hydrophobe, et une lysine (K) polaire cationique.

Enfin, la chimère des deux peptides naturels, sGal<sub>ch</sub>(W<sub>1</sub>W<sub>13</sub>), n'est pas actif à 100 $\mu$ M contre aucune des souches.

La taille, la charge, l'hydrophobicité et l'enchaînement de la séquence influent sur la structure primaire et secondaire des peptides et donc sur leur activité antibactérienne. Ces paramètres étant interdépendants, la modification de l'un d'entre eux peut influencer sur d'autres et sur l'activité finale du peptide <sup>84,224</sup>. Le maintien de la conformation en hélice  $\alpha$  des peptides est important pour l'activité antibactérienne <sup>412</sup>.

Par ailleurs, l'activité de nos peptides a été comparée à celle de la mélittine et d'antibiotiques de références : amoxicilline et gentamycine. La mélittine est un peptide antimicrobien de 26

résidus d'acides aminés connu pour son large spectre d'activité antibactérien, avec une meilleure efficacité contre les souches Gram<sup>+</sup> <sup>422-424</sup>. Ceci a été confirmé sur nos souches avec une activité contre les bactéries Gram positives et négatives, pathogènes et non-pathogènes allant de 1,56µM contre *S. aureus* et *B. subtilis* à 12,5µM contre *E. coli*. L'activité du peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) est la plus proche de celle de la mélittine.

La gentamycine a une CMI de 0,3µM contre la croissance de *P. aeruginosa*. Elle est 10 à 20 fois plus efficace que le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) qui est le plus actif contre cette souche. L'amoxicilline est respectivement 1,7 et 7 fois plus active contre *S. aureus* que le peptide sGal1(L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>) et contre *B. subtilis* que les peptides sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et sGal1(L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>). En revanche, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) présente une CMI inférieure à celle de l'amoxicilline contre la croissance d'*E. coli*. Il est 1,44 fois plus efficace.

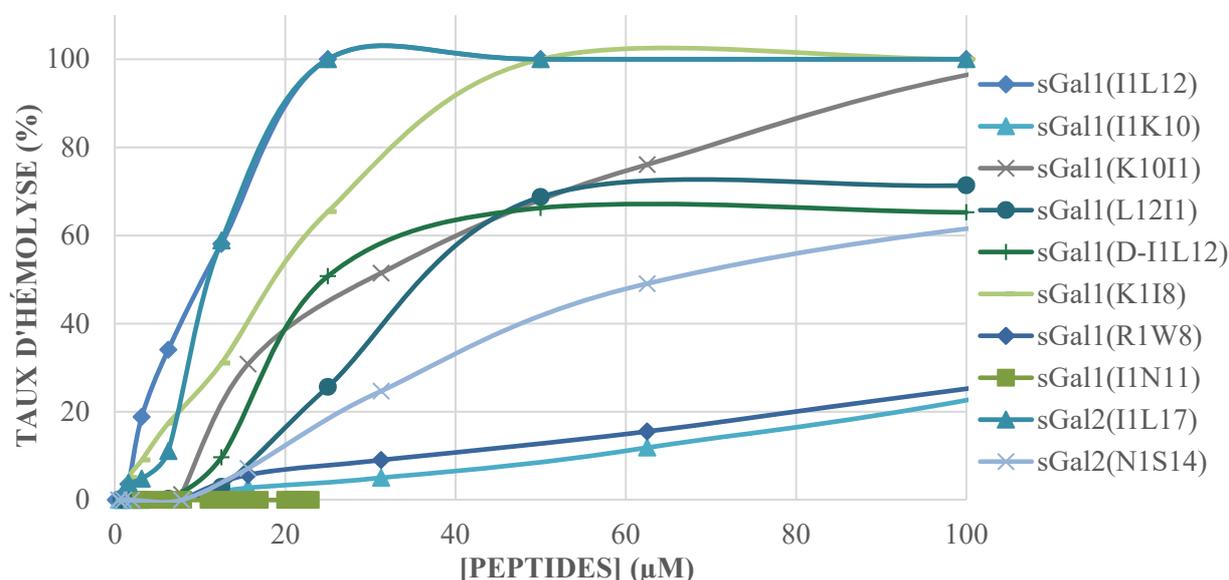
Les PAMs des venins de guêpes sociales sont connus pour présenter une activité antimicrobienne à large spectre contre diverses souches Gram positives et Gram négatives, parmi lesquels on retrouve la Protonectine, Polybia-MPI ou les Dominulin A et B. Cependant ces peptides sont souvent hémotoxiques <sup>361,389,395,410</sup>.

#### IV.1.2. Détermination de l'activité hémolytique

L'évaluation de la toxicité de « molécules médicaments » au niveau de l'organisme et en particulier contre les hématies est primordiale, surtout pour une administration orale ou parentérale, comme cela est le cas pour des antibiotiques. En effet, les globules rouges sont vitaux. La lyse des hématies ou l'hémolyse peut être problématique car les globules rouges étant très nombreux dans l'organisme, s'ils sont détruits, même en petite quantité, les débris risquent d'encrasser les reins qui pourront se bloquer et cesser de fonctionner. Par ailleurs, ils contiennent l'hémoglobine qui permet la respiration cellulaire aérobie en transportant l'oxygène O<sub>2</sub> depuis l'appareil respiratoire (poumons, branchies) vers le reste de l'organisme. Ainsi, de par l'absence de distribution d'oxygène dans le corps, l'hémolyse peut entraîner un risque d'asphyxie.

De ce fait, la toxicité des peptides synthétiques présentant une activité antibactérienne (CMI < 100µM) a été déterminée par un test d'hémolyse sur des érythrocytes humains sains. Ce test mesure la quantité d'hémoglobine libérée des globules rouge en séparant par centrifugation l'hémoglobine des érythrocytes intacts. La mesure de l'absorbance du surnageant contenant

l'hémoglobine libérée permet de déterminer l'effet hémolytique des produits. Le pourcentage hémolytique des peptides en fonction de leur concentration est présenté dans la **Figure 42**.



**Figure 42 : Pourcentage d'hémolyse des érythrocytes humains induit par les peptides antimicrobiens synthétiques en fonction de leur concentration.**

Peptides testés selon une dose-réponse de 0 à 100µM sur des érythrocytes de sang humain (n=1).

La Concentration Minimale Hémolytique induisant 50% (CMH<sub>50</sub>) et 100% (CMH<sub>100</sub>) d'hémolyse pour chaque peptide antimicrobien sont présentées dans le **Tableau 16** ci-dessous :

**Tableau 16 : Concentration minimale hémolytique 50% et 100% des peptides synthétiques sur des érythrocytes de sang humain et indices thérapeutiques correspondant.**

Peptides	CMH <sub>50</sub>	CMH <sub>100</sub>	Indice Thérapeutique (CMH <sub>50</sub> /CMI)			
			<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	10µM	25µM	0,1	1,6-3,2	0,1-0,2	3,2-6,4
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	135µM	250-500µM	/	2,7-5,4	1,35-2,7	5,4-10,8
sGal1(K <sub>10</sub> I <sub>1</sub> )	30µM	125µM	/	2,4-4,8	0,3-0,6	4,8-9,6
sGal1(L <sub>12</sub> I <sub>1</sub> )	36µM	>100µM	0,72	11,5-23	0,72-1,5	11,5-23
sDGal1(DI <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	25µM	>100µM	0,25	4	0,25	8
sGal1(K <sub>1</sub> I <sub>8</sub> )	20µM	50µM	/	0,8	0,4	1,6-3,2
SGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	225µM	1000µM	/	18	/	18
SGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )	>10000µM	>10000µM	800-3200	/	200-1600	800-6400
sGal2(I <sub>1</sub> L <sub>17</sub> )	12,5µM	25µM	0,5	2-4	1	5-10
sGal2(N <sub>1</sub> S <sub>14</sub> )	65µM	500µM	1,3	0,65	1,3	5,2

« / » correspond à une valeur de CMI supérieure à 100µM. Chaque peptide a été testé en triplicat (n=1).

L'hémotoxicité des peptides est dose-dépendante. La plupart des peptides qui présentent une forte activité antibactérienne présentent également une forte hémotoxicité ( $CMH_{50} < 100\mu M$ ). La dose de peptide toxique pour les érythrocytes humains est proche de la dose nécessaire à l'inhibition de la croissance bactérienne. Cependant la toxicité varie en fonction de la structure des différents analogues.

Le peptide parent sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est très hémotoxique. En effet, 10 $\mu$ M suffisent à induire 50% d'hémolyse. Les peptides chimiotactiques des venins de guêpes sociales sont souvent hautement hémotoxiques, d'où la nécessité de synthétiser des analogues antibactériens moins toxiques contre les cellules eucaryotes<sup>389</sup>. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), délété à l'extrémité C-terminale de 2 A.A., est 10 fois moins toxique. Ceux dont les A.A. ont été modifiés, sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et surtout sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), sont respectivement 20 à 1000 fois moins toxiques. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) n'étant pas hémolytique à 1mM, il a été testé jusqu'à 10mM sans présenter aucune toxicité vis-à-vis des hématies. En revanche, le peptide sGal1(K<sub>1</sub>I<sub>8</sub>) est seulement deux fois moins toxique que le peptide parent.

Les deux peptides « inversés » sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>) possèdent une toxicité comparable. Ils ne diffèrent que par une délétion de 2 A.A. à l'extrémité C-terminale et sont 3 fois moins toxiques que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Par ailleurs, le peptide sGal1(DI<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), énantiomère du peptide parent, est moins toxique et requiert au moins 4 fois plus de quantité pour induire une hémolyse totale.

Le peptide sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) est également très hémotoxique. Sa toxicité est comparable à celle du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Les mastoparans sont effectivement connus pour leur activité hémotoxique<sup>387,389</sup>. Son analogue sGal2(N<sub>1</sub>S<sub>14</sub>), dont les A.A. ont été modifiés, est 5 fois moins toxique et requiert 20 fois plus de produit pour induire une hémolyse totale.

Ainsi, la composition en acides aminés impactant entre autres la charge, l'hydrophobicité ainsi que la structure primaire et secondaire des peptides est également déterminante pour leur toxicité<sup>315,423,425</sup>. Ces peptides cytolytiques, Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>), jouent probablement un rôle dans la défense des guêpes sociales. La synthèse peptidique a permis d'obtenir des analogues moins toxiques tels que sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>).

A partir des résultats de CMI et d'hémolyse à 50%, l'indice thérapeutique de chaque peptide a pu être calculé. Il correspond au rapport de la dose toxique pour 50% des globules rouges et de la dose efficace. Plus cet indice est faible, moins il existe de différence entre la dose susceptible

de créer un effet thérapeutique et celle induisant la toxicité des hématies. Plus une substance a un indice élevé, moins elle est dangereuse et susceptible d'induire des effets indésirables.

Les peptides peuvent ainsi être classés en trois catégories :

- Ceux qui sont très actifs mais très toxiques et qui présentent donc un indice thérapeutique faible : sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>), (I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (K<sub>1</sub>I<sub>8</sub>) et sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) et (N<sub>1</sub>S<sub>14</sub>)
- Ceux non toxiques mais moyennement actifs et qui présentent un indice thérapeutique moyen : sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>)
- Ceux très actifs et non toxiques avec un fort indice thérapeutique : sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>).

D'après ces résultats, la synthèse des peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal2(N<sub>1</sub>S<sub>14</sub>) sous la forme entière D, pourrait diminuer leur toxicité tout en conservant leur activité antibactérienne et permettre ainsi d'obtenir un meilleur indice thérapeutique. La D-rétro mélittine, D-cecropine A, D-magainine 2, D-protonectine et D-Polybia MPI ont d'ailleurs montré une hémotoxicité plus faible que leurs énantiomères naturels <sup>420-423</sup>.

L'hémotoxicité de la mélittine et des antibiotiques de référence devra être réalisée pour la comparer à nos peptides. D'après Moerman et. al, la mélittine a une CMH<sub>50</sub> proche de 2µM (après incubation 30min à 37°C) <sup>424</sup>. Ce peptide antimicrobien est connu pour son activité très cytotoxique contre les cellules eucaryotes et a été sujet de nombreuses études de modification afin d'en diminuer sa toxicité tout en conservant son activité antibactérienne <sup>423,426</sup>.

Par ailleurs, une étude préliminaire a été réalisée pour évaluer la toxicité de certains peptides contre les hématies humaines en comparaison avec des hématies de mouton. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 17** ci-dessous.

**Tableau 17 : Comparaison des CMH<sub>50</sub> obtenues suite à la mise en présence des peptides synthétiques avec des hématies humaines et des hématies de mouton.**

Peptides testés en triplicat (n=1).

Peptides	CMH <sub>50</sub>	
	<i>humain</i>	<i>mouton</i>
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	10µM	10µM
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	>100µM	>100µM
sGal1(L <sub>12</sub> I <sub>1</sub> )	36µM	70µM
sGal1(ϕI <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	25µM	50µM
sGal1(K <sub>1</sub> I <sub>8</sub> )	20µM	60µM
sGal2(I <sub>1</sub> L <sub>17</sub> )	12,5µM	15µM

Les peptides sont moins hémotoxiques contre le sang de mouton. Ceci peut être expliqué du fait que la composition membranaire des globules rouges diffère d'une espèce à l'autre <sup>427</sup>. Alors que la composition en phospholipides du feuillet externe des érythrocytes humains est constituée à peu près à 50% de PhosphatidylCholines (PC) et 50% de SphingoMyélines (SM), celui des érythrocytes de mouton est composé à 51% de SM et seulement 0-2% de PC <sup>427</sup>. D'après les résultats, les hématies de mouton seraient ainsi moins sensibles à l'activité de nos peptides que ceux de sang humain. L'indice thérapeutique de ces peptides sera donc meilleur dans ces conditions. Cependant, les antimicrobiens développés sont destinés aux traitements humains. Il est donc plus pertinent de prendre en compte les résultats de toxicité obtenu sur les hématies humaines plutôt que celles de mouton. Par ailleurs, pour certains peptides, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) et peut-être sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), les CMH<sub>50</sub> obtenues avec le sang de mouton sont similaires à celles obtenues avec le sang humain suggérant que ces peptides interagissent avec les SM. Ils peuvent cependant également agir avec les PC. En revanche, les peptides pour lesquels les CMH<sub>50</sub> sont plus faibles avec le sang de mouton (sGal1(L<sub>12</sub>I<sub>1</sub>), sGal1(DI<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(K<sub>1</sub>I<sub>8</sub>)) doivent agir préférentiellement avec les PC.

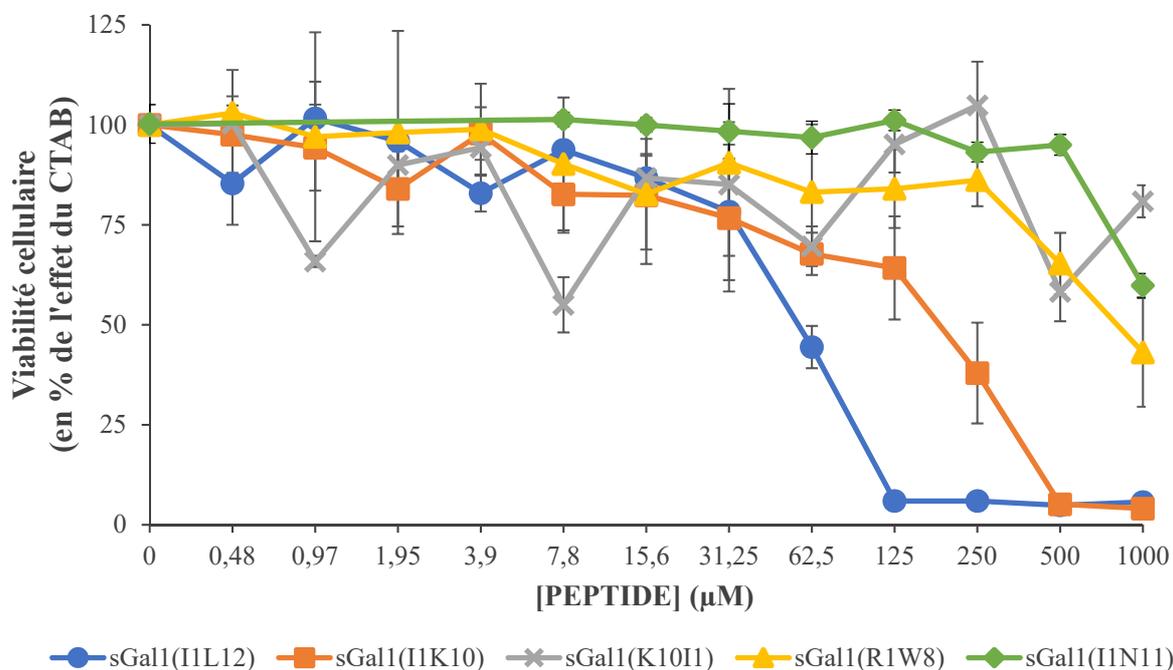
D'après l'ensemble des résultats obtenus, quatre peptides ont été retenus pour la suite des études pharmacologiques : sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), son inverso sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Ces tests seront effectués en comparaison avec le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) initial non modifié.

#### IV.1.3. Evaluation de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité des peptides sélectionnés pour le reste de l'étude a également été déterminée sur des cellules primaires de kératinocytes humains néonatal sains (NHEK-Néo) au moyen d'un test MTT. Ce test permet de déterminer la toxicité des peptides sur l'activité mitochondriale des cellules. Leur effet a été évalué selon une dose réponse entre 0 et 1mM (**Figure 43**).

La cytotoxicité a été effectuée sur des cellules primaires, de sang en suspension dans un premier temps, puis épithéliales adhérentes car ce sont des cellules très sensibles à leur environnement qui conservent assez bien les caractéristiques du tissu ou de l'organe d'origine. Par ailleurs, ce sont les cellules « saines » qui constituent notre organisme et qu'il est important de préserver. Contrairement à une lignée, une culture primaire n'est pas immortelle, les cellules sont soumises au phénomène de senescence. Les effets des peptides sur ces cellules *in vitro* seront donc probablement plus proche de ceux engendrés au sein de l'organisme *in vivo*. Le choix s'est porté sur des cellules humaines, car les antibiotiques développés seront à application

humaine. Bien que plus facile à cultiver et plus stables dans le temps, une lignée cellulaire peut donner des résultats qui ne seront pas représentatif de l'*in vivo*.



**Figure 43 : Evaluation de la cytotoxicité des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) sur des cellules adhérentes NHEK-néo jusqu'à 1mM.**

La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage de l'effet en CTAB. Peptides testés en triplicat (n=1).

Les peptides testés ont une activité dose-dépendante sur la viabilité des NHEK-néo, cependant ils sont moins cytotoxiques contre ces cellules que contre les érythrocytes humains.

Par ailleurs, aucun des peptides n'est cytotoxique aux doses actives. Ils pourraient donc être utilisés pour une application topique dans des crèmes antiseptiques par exemple.

Néanmoins, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) induit 50% de mortalité des cellules NHEK-néo à 62µM, ce qui est comparable à son activité contre *P. aeruginosa* et *E. coli* (CMI=50-100µM). Il est le plus cytotoxique, bien que son effet contre ces cellules soit six fois moins important que contre les érythrocytes (CMH<sub>50</sub> = 10µM). Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), moins cytotoxique, a une concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>) de 250µM. Sa CMH<sub>50</sub> était de 135µM. Ce peptide est donc quasiment deux fois moins toxique pour des cellules primaires épithéliales que pour les érythrocytes. Le peptide sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) dont la séquence a été inversée ne semble pas être cytotoxique jusqu'à 1mM. Le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) présente 50% de cytotoxicité sur NHEK-néo à partir de 1mM. Il est quatre fois moins toxique que sur les globules rouges. Enfin, le

peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) n'étant pas hémotoxique jusqu'à 10mM, son effet cytotoxique sur les kératinocytes a été évalué aux mêmes concentrations. Dans ces conditions, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) induit la mortalité des cellules NHEK-néo dès 500µM avec une CI<sub>50</sub> comprise entre 1 et 2,5mM. Toutefois, ce peptide inhibe la croissance de *B. subtilis* et *P. aeruginosa* avec une CMI comprise entre 1,6 et 12,5µM suggérant qu'il possède une action sélective contre les charges négative des membranes bactériennes en comparaison avec celles zwitterioniques des membranes des cellules eucaryotes.

La synthèse peptidique a donc permis d'obtenir des analogues moins cytotoxiques que le peptide naturel. La toxicité des peptides semble dépendre de la composition membranaire de la cible et du mode d'interaction avec les cellules en suspension (pour les globules rouges) ou adhérentes (NHEK-néo). L'ensemble des résultats de cytotoxicité obtenus montrent l'importance de sélection du modèle cellulaire vis-à-vis de l'application thérapeutique du produit. Les peptides sont moins cytotoxiques contre les cellules NHEK-néo que contre les érythrocytes humains, à l'exception du peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Cependant, la CI<sub>50</sub> de ce peptide est induite à une concentration supérieure à 1mM, bien au-delà des concentrations efficaces. Ces peptides pourraient donc être utilisés pour une application topique dans des crèmes antiseptiques par exemple.

#### IV.1.4. Etude préliminaire du mécanisme d'action

Les activités antibactérienne et cytotoxique de ces peptides ayant été déterminées, il est nécessaire de comprendre la différence d'efficacité des peptides sur les différentes souches bactériennes et d'identifier leurs cibles cellulaires. Une étude préliminaire du mécanisme d'action des peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) a donc été réalisée en comparaison avec le peptide original sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Dans un premier temps, la capacité des peptides à interagir avec les membranes des cellules procaryotes et eucaryotes a été évaluée sur cellules entières par un test de perméabilisation membranaire. Une étude plus spécifique a ensuite été réalisée afin de déterminer plus précisément le ou les lipides reconnus par les peptides à l'aide de la technique dite des monocouches lipidiques ou balance de Langmuir.

*IV.1.4.2. Tests de perméabilisation*

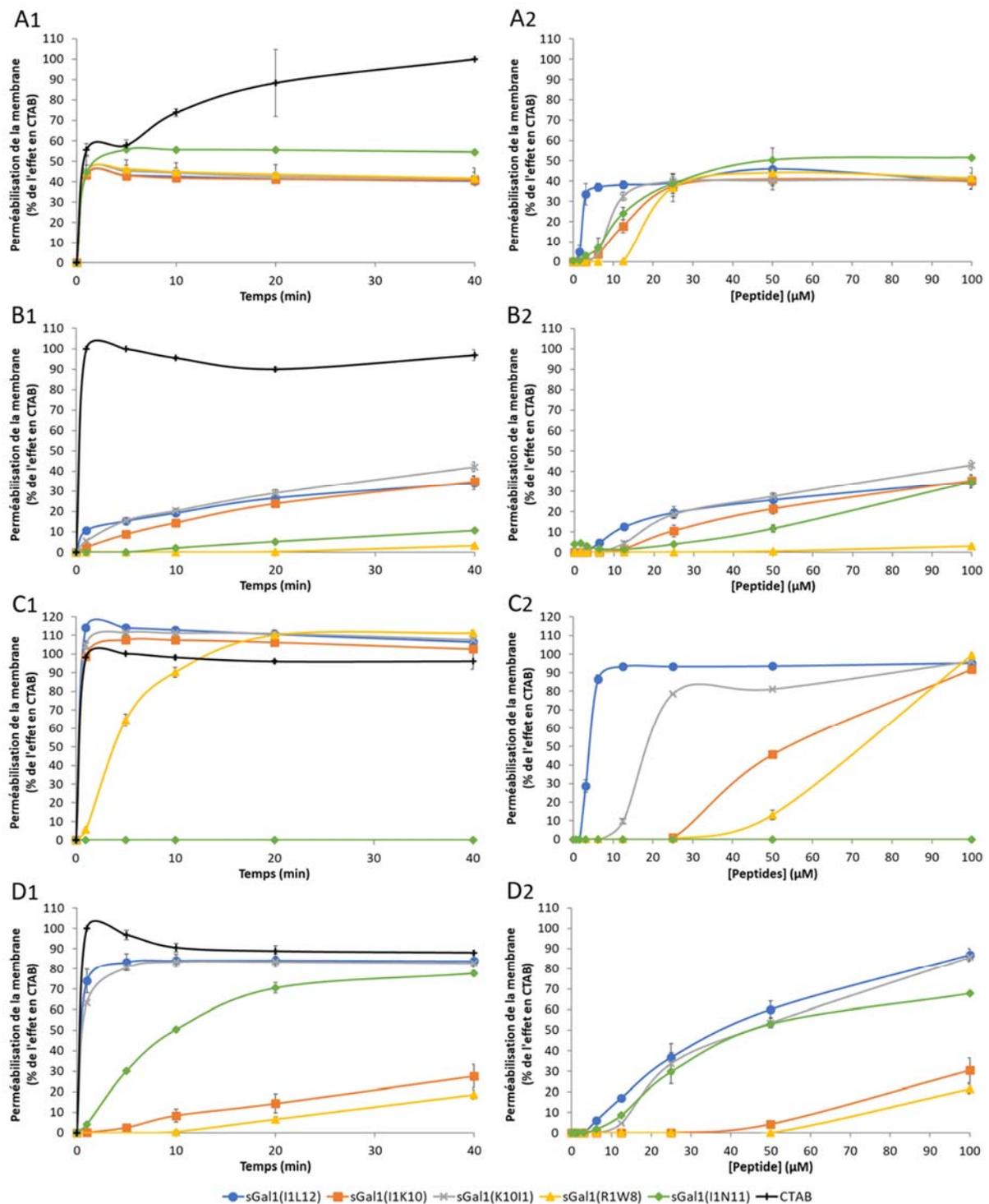
Le mécanisme d'action des peptides a tout d'abord été étudié sur les cellules entières : bactéries et cellules humaines (kératinocytes). La plupart des peptides antimicrobiens cationiques induisent la mort bactérienne en impactant l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Ils peuvent former des pores (modèles «barrel-stave» et toroïdal) ou perturber l'intégrité de la structure supramoléculaire de la membrane par fragmentation (modèle «carpet») <sup>86</sup>. La mélittine par exemple agit en formant des pores toroïdaux <sup>86</sup>. Quant à la protonectine, elle pourrait perturber l'intégrité de la membrane cytoplasmique selon le modèle «carpet» <sup>419</sup>. La capacité perméabilisante de nos peptides a donc été analysée.

Cette étude a été réalisée par comparaison avec l'effet du Bromure de Cétrimonium (CTAB). Le CTAB est un détergent cationique induisant la perméabilisation membranaire. L'interaction des PAMs avec les membranes bactériennes a été étudiée en utilisant un dosage à base d'Iodure de Propidium (IP). L'IP est un agent intercalant de l'ADN et de l'ARN <sup>428,429</sup>. Lorsqu'il est lié aux acides nucléiques il est 20 à 30 fois plus fluorescent qu'une molécule libre en solution. Il émet une fluorescence à 590nm suite à une excitation à 540nm. De par son caractère hydrophile, ce fluorophore ne peut pénétrer dans les cellules que si leurs membranes sont altérées <sup>430</sup>.

- **Sur cellules procaryotes**

Les expériences ont été effectuées sur les mêmes souches bactériennes que celles utilisées pour la détermination de la CMI. Ce sont deux souches Gram + et deux souches Gram -, dont l'une de chaque est pathogène.

Pour chacune des souches, la cinétique de la perméabilisation membranaire a été mesurée à différentes doses de peptides à 37°C (**Figure 44**).



**Figure 44 : Suivi de la cinétique de perméabilisation des membranes cytoplasmique de *B. subtilis* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (C) et *P. aeruginosa* (D) par les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (●), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (■), sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) (x), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (▲) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (◆).**

Les bactéries ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à fond noir à  $1 \times 10^8$  UFC/puits. Elles ont été traitées avec du CTAB ou des concentrations croissantes de peptides de  $1,6 \mu\text{M}$  à  $100 \mu\text{M}$ . Les variations de la fluorescence liée à la perméabilisation membranaire et à l'entrée de l'iodure de propidium ont été mesurées après 1, 5, 10, 20 et 40 minutes d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . Les puits sans échantillons, contenant seulement du PBS constituent le témoin négatif. L'effet de perméabilisation de chaque peptide a été calculé en pourcentage de l'effet en CTAB à 0,2%

(=100% perméabilisation) et tracé en fonction du temps d'incubation (figures A2, B2, C2 et D2) ou de la concentration en peptide (figures A1, B1, C1 et D1). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.D (n = 3). A1, B1, C1 et D1) Effet de 100 $\mu$ M de peptides sur la perméabilisation membranaire de *B. subtilis*, *E.coli*, *S. aureus* et *P.aeruginosa*, respectivement, en fonction du temps. A2, B2, C2 et D2) Effet dose-dépendant des peptides sur la perméabilisation membranaire de *B. subtilis*, *E.coli*, *S. aureus* et *P.aeruginosa*, respectivement après 40 minutes d'incubation.

Les résultats montrent que l'effet antibactérien des peptides est lié à leur capacité à perméabiliser les membranes bactériennes. Ils induisent une augmentation de la perméabilisation membranaire de manière dose dépendante (**Figure 44.A2, B2, C2 et D2**).

L'effet perméabilisant est très rapide contre *B.subtilis*. A 100  $\mu$ M, tous les peptides induisent un effet perméabilisant qui atteint un plateau entre 40 et 50% de l'effet normalisé du CTAB au bout d'une minute. De même, après 40 minutes d'incubation, l'ensemble des peptides induisent une perméabilisation membranaire qui atteint un plateau entre 40 et 50% de l'effet de CTAB dès 25 $\mu$ M. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), est le plus actif avec un maximum de perméabilisation atteint dès 6 $\mu$ M, suivi par le peptide sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) à 25 $\mu$ M et enfin les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) entre 25 et 50 $\mu$ M avec un effet perméabilisant moins important aux faibles doses pour sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>). Par ailleurs, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est perméabilisant dès 1,5 $\mu$ M, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) dès 3 $\mu$ M, sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) dès 6 $\mu$ M et sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) entre 12,5 et 25 $\mu$ M. Les doses perméabilisantes correspondent à leurs CMI (**Tableau 15**).

De même les résultats de perméabilisation obtenus sur *E. coli* sont en accord avec la CMI de chaque peptide. En effet, sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) qui n'inhibe pas la croissance d'*E.coli*, ne perméabilise pas sa membrane. Après 40 minutes d'incubation à 100 $\mu$ M, l'effet perméabilisant est négligeable. Par ailleurs, l'activité antibactérienne des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) contre *E. coli* semble être corrélée à leur effet peu perméabilisant. Ces peptides qui ont une faible activité contre la croissance d'*E.coli* (entre 50 et 100 $\mu$ M), perméabilisent lentement sa membrane. A 100 $\mu$ M, la cinétique de perméabilisation de ses trois peptides est similaire. Aucun plateau n'est atteint après 40 minutes d'exposition. Il faut 40 minutes d'incubation à 100 $\mu$ M pour que ces peptides induisent une perméabilisation à hauteur de 40% de l'effet en CTAB. Enfin, bien que sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) soit le peptide le plus actif contre *E. coli* (CMI < 50 $\mu$ M), il n'induit que 10% de perméabilisation après 40 minutes d'incubation à 100 $\mu$ M. Toutefois, les résultats de CMI sont déterminés après 18h d'incubation avec les peptides. Une cinétique de 18h permettrait d'évaluer l'effet perméabilisant des peptides sur la membrane d'*E. coli* au cours de cette période. Ces résultats suggèrent que : i) Ce peptide agit plus lentement que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>),

(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) mais de manière plus efficace puisque sa CMI est plus faible. Ce processus plus lent peut résulter d'un mode d'action différent pour franchir la membrane externe qui ralentirait son accumulation au niveau de la membrane cytoplasmique. ii) Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) peut également agir sur d'autres cibles bactériennes, soit au niveau intracellulaire, soit par un mécanisme inconnu. En effet, les PAMs peuvent avoir différentes cibles membranaires et/ou intracellulaire<sup>184</sup>. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) pourrait ainsi se transloquer dans le cytoplasme par perméabilisation, puis inhiber les processus vitaux à la bactérie.

Par ailleurs, l'analyse de perméabilisation a également été effectuée sur *P. aeruginosa*, souche Gram – plus sensible qu'*E. coli* à l'action de sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Ce peptide est 8 fois plus perméabilisant contre *P. aeruginosa* que contre *E. coli*. A 100µM, il perturbe l'intégrité de la membrane dès la première minute d'incubation. Un plateau à 80 % de l'effet normalisé du CTAB est atteint entre 10 et 20 minutes (**Figure 44.D1**). Après 40 minutes d'exposition, 6µM suffisent à induire une perméabilisation. Son action dose-dépendante est similaire à celle des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) (**Figure 44.D2**). A 100µM, ces peptides induisent une perméabilisation comparable à celle du CTAB dès 1 minute. Ils agissent 10 fois plus rapidement que sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Ces résultats sont en accord avec ceux de la CMI. Bien que sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) n'apparait pas actif contre *P. aeruginosa* (**Tableau 15**), les résultats de perméabilisation suggèrent que sa CMI est proche de 100µM. Par ailleurs, tout comme pour *E. coli*, il semblerait qu'il existe un processus qui limite l'action des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) chez *P. aeruginosa*. Bien qu'ils apparaissent plus perméabilisant que sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), ils sont pourtant moins efficaces. Ceci suggère de nouveau que sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) possède un mode d'action plus lent mais plus efficace que ces peptides. En outre, il semble également agir au niveau de plusieurs cibles bactériennes, pouvant ainsi limiter les processus de résistance. Enfin, les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) perméabilisent faiblement la membrane de *P. aeruginosa* et ce, selon des cinétiques et des doses comparables. Un début de perméabilisation est induit dès 50µM après 40 minutes d'incubation, pour atteindre 20 à 30% de l'effet du CTAB à 100µM. Ces résultats corroborent l'inactivité de ces peptides à 100µM contre *P. aeruginosa* (**Tableau 15**).

Enfin, la perméabilisation des peptides a également été effectuée sur *S. aureus*. Excepté pour sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), l'effet des peptides sur la membrane cytoplasmique de *S. aureus* est comparable à celui contre *B. subtilis*. De manière générale, il est cependant moins rapide et nécessite plus de produit. Après 40 minutes d'incubation, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), est le plus actif avec un

maximum de perméabilisation atteint dès 6 $\mu$ M, suivi par le peptide sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) à 25 $\mu$ M et enfin les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) entre 50 et 100 $\mu$ M avec un effet perméabilisant moins important aux faibles doses pour sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>). A 100 $\mu$ M, 100% de perméabilisation est induit dès la première minute d'incubation avec les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). Bien que le processus soit plus lent pour sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), ce même plateau est atteint également rapidement (entre 10 et 20 minutes d'incubation). Quant au peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), il ne perméabilise pas la membrane de *S. aureus*, justifiant son inactivité à 100 $\mu$ M (**Tableau 15**). L'ensemble de ces résultats de perméabilisation concordent avec ceux de CMI.

L'effet perméabilisant des peptides est corrélé à leur activité antibactérienne. Les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) principalement actifs contre les souches Gram + ont un effet perméabilisant en quelques minutes sur ces souches et à des doses comparables à leur CMI (entre 3 et 25 $\mu$ M). D'autre part, ils sont peu ou pas actifs contre les souches Gram - et ceci semble s'expliquer par une faible capacité perméabilisante à des concentrations inférieures à 100 $\mu$ M. Outre sa capacité à perméabiliser les membranes d'*E.coli* et de *P. aeruginosa*, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) semble avoir un mode d'action complémentaire. En effet, moins perméabilisant que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) il est pourtant plus efficace (CMI plus faibles).

La différence d'activité des peptides contre les souches Gram + et Gram - peut venir des différences structurelles au niveau des enveloppes bactériennes. L'absence de perméabilisation des souches Gram négatif par sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) peut être liée à la présence d'une membrane externe qu'il ne serait pas capable de franchir. sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) semble avoir les capacités de passer à travers cette membrane (par diffusion ou perforation) mais ce processus est lent et difficile (surtout contre *E. coli*). L'utilisation de N-phenyl-1-naphthylamine<sup>b</sup> permettrait de visualiser l'activité de nos peptides sur la membrane externe des bactéries Gram - <sup>431,432</sup>. Ces bactéries peuvent par ailleurs mettre en place des mécanismes de défense qui pourraient expliquer la faible activité de ces peptides à l'encontre de ses souches Gram -.

Ces 5 peptides sont capables, totalement ou en partie, de perturber l'intégrité de la membrane bactérienne. Ces résultats ne permettent cependant pas de connaître le mécanisme exact de perméabilisation membranaire (formation de pores, déstabilisation ou désintégration de la

---

<sup>b</sup> Sonde hydrophobe qui permet d'évaluer les altérations de la perméabilité membranaire externe des bactéries, car son rendement quantique augmente lorsqu'il est transféré d'un environnement hydrophile à hydrophobe <sup>431</sup>.

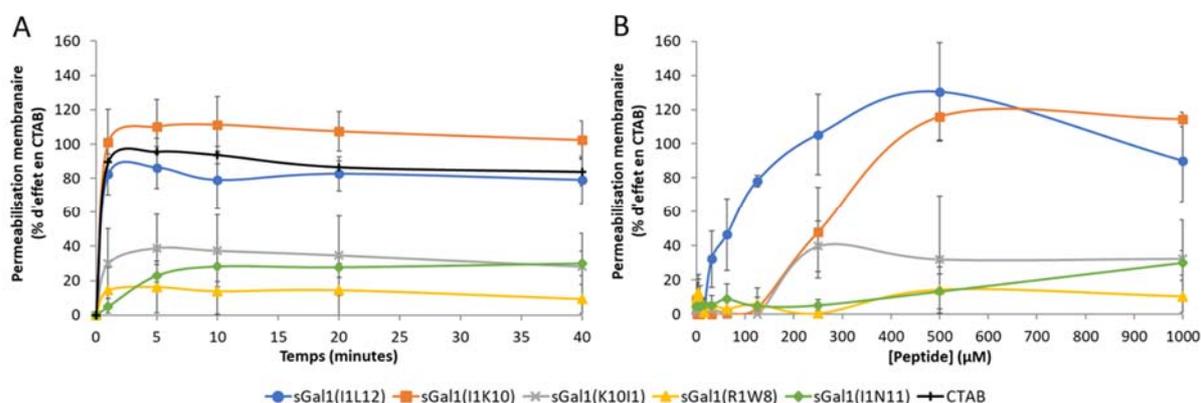
membrane). La mort des bactéries surviendrait donc par fuite de leur cytoplasme. Ceci peut être associé à d'autres mécanismes comme cela semble être le cas pour sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>).

Bien que nécessaire, la charge cationique seule n'est pas suffisante pour provoquer la perméabilisation des membranes bactériennes ou la mort des bactéries<sup>433,434</sup>. Alors qu'elle permet l'adsorption des peptides à la surface des membranes anioniques, c'est la fraction hydrophobe des PAMs qui est responsable de leur insertion dans le noyau lipophile de la bicouche lipidique bactérienne, conduisant à la perméabilisation de la membrane et finalement à la mort bactérienne<sup>429,435,436</sup>. D'ailleurs, ces peptides de charge nette +1, contiennent une forte proportion de résidus hydrophobes comprise entre 75 et 87,5%. Bien que son mécanisme semble différent, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), moins hydrophobe (54%) et plus cationique (+4), est également perméabilisant. La charge et l'hydrophobicité des PAMs peuvent influencer sur leur mode de perméabilisation. Dans le modèle « barrel-stave », les interactions électrostatiques et hydrophobes sont importantes puisque les PAMs interagissent avec les têtes chargées et les queues lipidiques. En revanche, la formation de pores toroïdaux nécessite des interactions électrostatiques importantes. Dans ce cas, la surface des pores est couverte par les groupements phosphate chargés et les PAMs ont peu de contacts avec les queues lipidiques hydrophobes<sup>86,244,245</sup>. Par ailleurs, certains PAMs, en particulier ceux hautement cationiques, peuvent induire des réarrangements lipidiques et la formation de radeaux lipidiques. Une fois adsorbé sur la membrane bactérienne, les lipides anioniques entourant le peptide sont recrutés entraînant la formation de micro-domaines riches en lipides anioniques dans le feuillet externe de la membrane<sup>86,437</sup>. De par leur liaison aux PAMs, les molécules lipidiques entourant les PAMs diffusent lentement, ce qui affecte non seulement la fluidité et la structure de la membrane, mais crée aussi des tensions importantes<sup>86,438</sup>. D'autres PAMs induisent un flip-flop de lipides anioniques du feuillet interne au feuillet externe, aboutissant à une membrane externe fortement chargée négativement et à un feuillet interne moins anionique<sup>86,439</sup>. Cette répartition asymétrique des lipides chargés détruit davantage le potentiel de la membrane, ce qui entraîne une déstabilisation de la membrane interne<sup>86</sup>.

- **Sur cellules eucaryotes (NHEK-néo)**

Afin d'évaluer si la toxicité induite sur les NHEK-néo est due à la formation de pores ou à l'inhibition de processus cellulaire, un test de perméabilisation a été effectué sur ces cellules.

Par comparaison avec les résultats de perméabilisation obtenus avec les cellules procaryotes, cela permettra également d'évaluer la sélectivité cellulaire de nos peptides.



**Figure 45 : Suivi de la cinétique de perméabilisation des membranes plasmique des NHEK-néo par les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (●), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (■), sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) (x), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (▲) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (◆).**

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à fond noir à 25000 cellules/puits. A confluence (après 48-72h d'incubation), elles ont été traitées avec du CTAB ou des concentrations croissantes de peptides de 1µM à 100µM. Les variations de la fluorescence liée à l'iodure de propidium ont été mesurées après 1, 5, 10, 20 et 40 minutes d'incubation à 37°C. Les puits sans échantillons, contenant seulement du PBS constituent le témoin négatif. L'effet de perméabilisation de chaque peptide a été calculé en pourcentage de l'effet en CTAB 0,2% (=100% perméabilisation) et tracé en fonction du temps d'incubation (figure A) ou de la concentration en peptide (figures B). Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.D (n = 3). A) Effet de 1mM de peptides en fonction du temps. B) Effet dose-dépendant des peptides sur la perméabilisation plasmique des NHEK-néo après 40 minutes d'incubation.

Les peptides perméabilisent la membrane des NHEK-néo de manière dose dépendante. Les plus perméabilisants sont sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), suivi de sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) puis sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>).

A 1mM, les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ont une cinétique de perméabilisation comparable à celle du CTAB. Elle est comprise entre 80 et 100%, dès 1 minute d'incubation avec les cellules. Ces peptides sont d'ailleurs cytotoxiques à cette concentration (**Figure 43**). A T40 minutes, un début de perméabilisation est généré entre 15 et 30µM de peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) à hauteur de 25%. De plus, sa CI<sub>50</sub> (62,5µM, voir **Figure 43**) correspond à 50% de perméabilisation. Après 40 minutes d'incubation, 250µM de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) sont nécessaires pour induire 100% de perméabilisation. Moins toxique que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) apparait également moins perméabilisant. Deux fois plus de peptide (500µM) sont nécessaires pour lyser l'ensemble des cellules. Sa concentration toxique médiane (250µM), correspond également à celle qui induit 50% de perméabilisation. L'effet de ces peptides est rapide. Ils perturbent l'intégrité membranaire dès les premières minutes d'incubation avec les cellules. Ces résultats

concordent avec ceux du test de cytotoxicité suggérant que la mort cellulaire est induite suite à la perméabilisation de la membrane et à la fuite du contenu cytoplasmique.

Comme pour sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), 125 à 250µM de peptide sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) sont nécessaires pour initier une perméabilisation de ces cellules primaires. En deçà, la concentration du peptide est insuffisante. Cependant, son action est plus faible. A 1mM, son taux de perméabilisation stagne à 40% après 5 minutes. Après 40 minutes d'incubation, ce plateau est atteint dès 250µM. Pourtant à cette concentration, sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) n'est pas cytotoxique contre les NHEK-néo (**Figure 43**). Le postulat énoncé précédemment pour sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) n'est ici pas vérifié. Cela pourrait suggérer que les cellules développent un mécanisme de résistance à la perméabilisation.

Enfin, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) n'induisent pas de perméabilisation membranaire à des concentrations inférieures à 250µM, même après 40 minutes d'incubation. Pour le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), 10 minutes à 1mM sont nécessaires pour générer 40% de perméabilisation induisant 40% de mortalité cellulaire. Pour le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), une concentration entre 250 et 500µM est nécessaire pour induire une faible perméabilisation. De 500µM à 1mM, le taux de perméabilisation stagne entre 10 et 20%. Or à ces concentrations la viabilité cellulaire est de 65% et 50% respectivement. Ces résultats suggèrent que le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) agit faiblement sur les membranes cellulaires et qu'il pourrait déclencher d'autres mécanismes conduisant à la mort cellulaire.

Ainsi, bien que les peptides perméabilisent la membrane des NHEK-néo, leur effet est plus lent et plus faible que contre les cellules procaryotes. Contrairement aux bactéries, après 40 minutes d'incubation, aucun peptide ne perméabilise la membrane des NHEK-néo entre 0 et 100µM, sauf le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) qui induit une perméabilisation d'environ 60% à 100µM. sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) ne perméabilisent pas les membranes des NHEK-néo à leurs concentrations actives (CMI<100µM). Ce qui est en accord avec les résultats de cytotoxicité et confirme leur potentielle utilisation topique. Ainsi, excepté sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), nos PAMs candidats semblent plus sélectifs des cellules procaryotes qu'eucaryotes. Par ailleurs, la modification des peptides par synthèse chimique a permis d'obtenir des analogues moins perméabilisants des membranes eucaryotes que leur peptide parent (sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>)).

En corrélant les résultats obtenus pour les tests de perméabilisation et de toxicité sur cellules procaryotes et eucaryotes, les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) semblent agir uniquement par perméabilisation, alors que sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) impliqueraient également d'autres mécanismes.

Ces résultats montrent qu'une concentration seuil critique doit être atteinte pour entraîner une déstabilisation ou une perforation de la membrane. Cette concentration est proche de la CMI ou de la CI<sub>50</sub>. Les concentrations de peptides nécessaires pour induire 50% de perméabilisation bactérienne sont au moins 10 fois plus faibles que celles permettant la lyse de 50% des kératinocytes. Ce résultat suppose une interaction préférentielle des peptides, surtout sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), pour les membranes bactériennes plutôt qu'eucaryotes. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), le moins cytotoxique, agit dès 3µM contre la membrane cytoplasmique de *B. subtilis*, alors que 250µM sont nécessaires pour initier la perméabilisation des kératinocytes. Le facteur de différence d'interaction est dans ce cas de 83. En revanche, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), le plus cytotoxique, agit dès 1,56µM contre la membrane cytoplasmique de *B. subtilis* et est perméabilisant dès 15,5µM contre les kératinocytes (facteur 10).

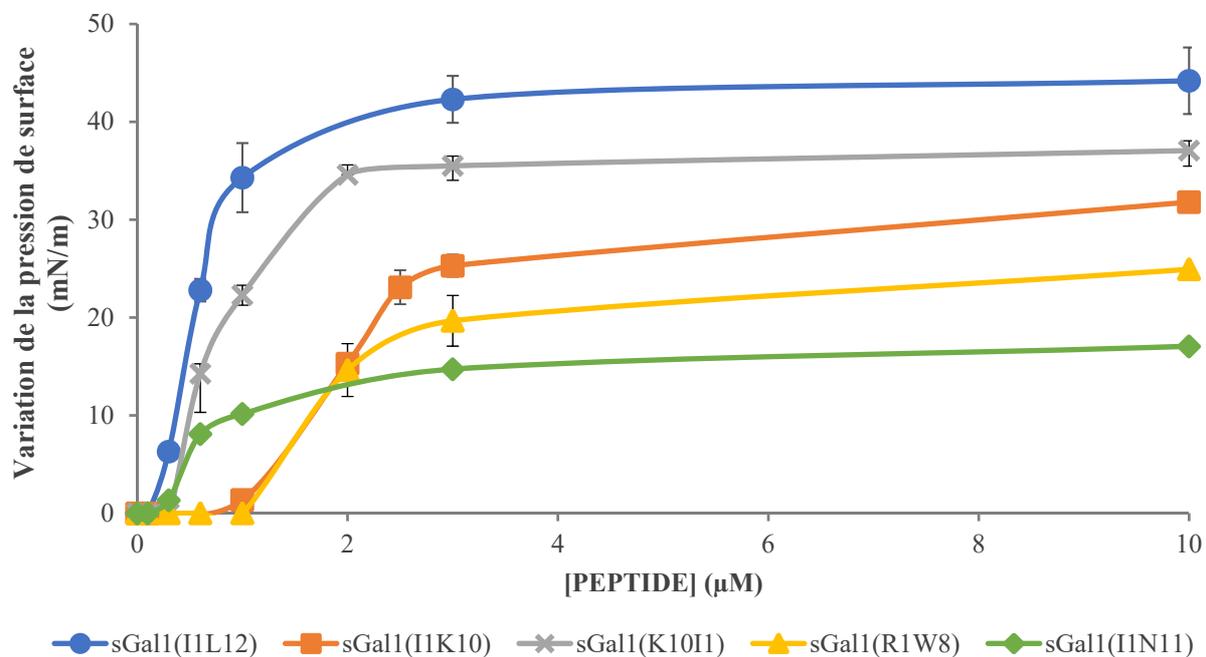
#### IV.1.4.3. *Caractérisation biophysique*

D'après les résultats des expériences de perméabilisation réalisées sur les cellules entières, les peptides antimicrobiens agissent au niveau de la membrane plasmique. Par ailleurs, il existe une différence de sélectivité des peptides pour les membranes procaryotes par rapport aux eucaryotes. Afin d'évaluer si cette différence est liée aux propriétés de liaison avec les lipides membranaires, une étude d'interaction des peptides avec des monocouches lipidiques a été réalisée. En effet, la technique monocouche est parfaitement adaptée pour étudier les propriétés physico-chimiques et biologiques des PAMs agissant au niveau des membranes cellulaires<sup>440</sup>.

- **Etude de l'adsorption des peptides à l'interface eau/air**

Dans un premier temps, il est nécessaire d'évaluer la tensioactivité des peptides seuls à l'interface eau-air. Ceci a été effectué par injection des peptides à différentes concentrations dans une sous-phase de PBS, solution physiologique isotonique de pH 7,4. Pour chacune des concentrations, l'adsorption des peptides à l'interface PBS/air a été évaluée en suivant l'augmentation de la pression de surface en fonction du temps. Cette augmentation de pression de surface traduisant la localisation des peptides à la surface de la solution aqueuse. La variation

de pression de surface pour chacun des peptides aux différentes concentrations est présentée **Figure 46**.



**Figure 46 : Tensioactivité des peptides antimicrobiens sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) seuls à l'interface PBS/air.**

Variation de la pression induite par chaque peptide en fonction de sa concentration dans la sous-phase de PBS.

Comme attendu pour des peptides capables de perméabiliser des bicouches lipidiques, les cinq peptides induisent des variations de pression de surface : ils sont tensio-actifs.

La variation de pression de surface augmente avec la concentration en peptide de manière sigmoïdale. Les profils de variation de pression de surface sont comparables pour tous les peptides (**Figure 46**). En effet, il existe une concentration seuil en deçà de laquelle aucune différence de pression de surface n'est mesurée : les peptides restent en solution aqueuse ou la concentration de peptide localisée à la surface est insuffisante pour créer une différence de pression de surface. Il existe ensuite une gamme de concentrations, au cours de laquelle la pression de surface augmente significativement. Une quantité croissante de peptides diffuse jusqu'à l'interface PBS/air et forment une monocouche en surface. Cette gamme varie selon les peptides. Elle est comprise entre 0,1 μM et 1,5-2 μM pour les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et 1 et 2 μM pour les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>). Aux fortes concentrations, entre 2 et 3 μM, la pression de surface ne varie plus, elle a atteint sa valeur maximale (plateau) : la monocouche se sature. A partir d'une concentration, appelée concentration micellaire critique,

les peptides dans la sous-phase s'organisent différemment. Ils forment des agrégats de telle manière que les parties hydrophobes des molécules ne soient pas en contact avec l'eau <sup>441</sup>.

La tensioactivité ou activité de surface des peptides, correspond à la capacité qu'ils ont à modifier la pression de surface au cours du temps. Celle-ci diffère selon les peptides. Elle est influencée par des facteurs conformationnels tels que la structure primaire, secondaire, amphipatique, la taille, la flexibilité moléculaire ou la charge nette <sup>440,442</sup>. Les variations de pression de surface induites par le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) sont plus importantes que pour ses analogues quel que soit la concentration injectée dans la sous-phase. Aux plus fortes concentrations, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) induisent une variation de pression de surface comprise entre 35 et 40mN/m. Ils sont suivis par sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) avec une pression maximale de surface de 30mN/m (à 10μM). Les peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) induisent environ deux fois moins de variation de pression de surface (entre 15 et 25mN/m). Plus la différence de pression induite est élevée au niveau du plateau, plus les propriétés tensioactives du peptide sont importantes.

Ainsi, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est le plus tensioactif, suivi des peptides sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), puis (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Nous remarquons que les peptides les plus tensioactifs sont également les plus hémolytiques (sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>)). Au contraire, les peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), deux fois moins tensioactifs, sont peu ou pas hémolytiques.

D'après ces résultats, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) aura une plus grande propension à s'insérer dans les membranes que les peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>). Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est d'ailleurs plus perméabilisant que sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) contre les cellules procaryotes et eucaryotes (NHEK-néo et érythrocytes).

Enfin, d'après les études de Ksenzhek et al., plus un peptide est hydrophobe, plus sa tensioactivité est importante <sup>440,443</sup>. Ceci est vérifié pour les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) par rapport au peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) dont la proportion de résidus polaires/apolaires est de 0,8 (proche de 1) contre 0,125 à 0,3 pour les autres peptides. Cependant, il semblerait qu'à partir d'un seuil d'hydrophobicité (< 0,3) cela soit inversé. En effet, sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) dont la proportion en A.A. hydrophobes est plus importante que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) sont pourtant moins tensioactifs.

- **Etude de l'insertion des peptides dans les lipides**

Plusieurs approches sont possibles pour étudier les interactions entre les PAMs et les membranes cellulaires. Nous avons dans un premier temps travaillé avec des cellules entières vivantes. Cependant, les membranes naturelles étant des entités très complexes avec une grande variété de lipides et de protéines, cela ne nous permet d'étudier que les phénomènes généraux. Des modèles membranaires artificiels permettent au contraire de caractériser plus spécifiquement les interactions entre les PAMs et les membranes, tel que le système de monocouche. Bien que, les vésicules lipidiques possèdent un compartiment interne aqueux et conviennent pour l'étude de la perméabilité, elles présentent certains inconvénients dont le système de monocouche permet de s'affranchir<sup>440,444</sup>. Ce modèle permet de choisir un certain nombre de paramètres, y compris la nature des molécules lipidiques, la composition de la sous-phase et la température. L'intérêt des monocouches lipidiques comme modèle membranaire consiste également dans leur homogénéité, leur stabilité et leur géométrie plane où les molécules lipidiques ont une orientation spécifique<sup>440,445</sup>. En outre, il s'agit d'un système bidimensionnel bien défini qui fournit une analyse thermodynamique rigoureuse. Enfin, c'est un modèle très approprié pour étudier, dans des conditions proches des conditions biologiques réelles, ce qui se passe lorsqu'un peptide hydrosoluble, présent dans le milieu extracellulaire, arrive à la surface de la membrane de la cellule cible<sup>440</sup>.

Ainsi, l'affinité spécifique de chaque peptide pour différents lipides membranaires eucaryotes et procaryotes a été évaluée en mesurant leur insertion au sein de monocouches lipidiques.

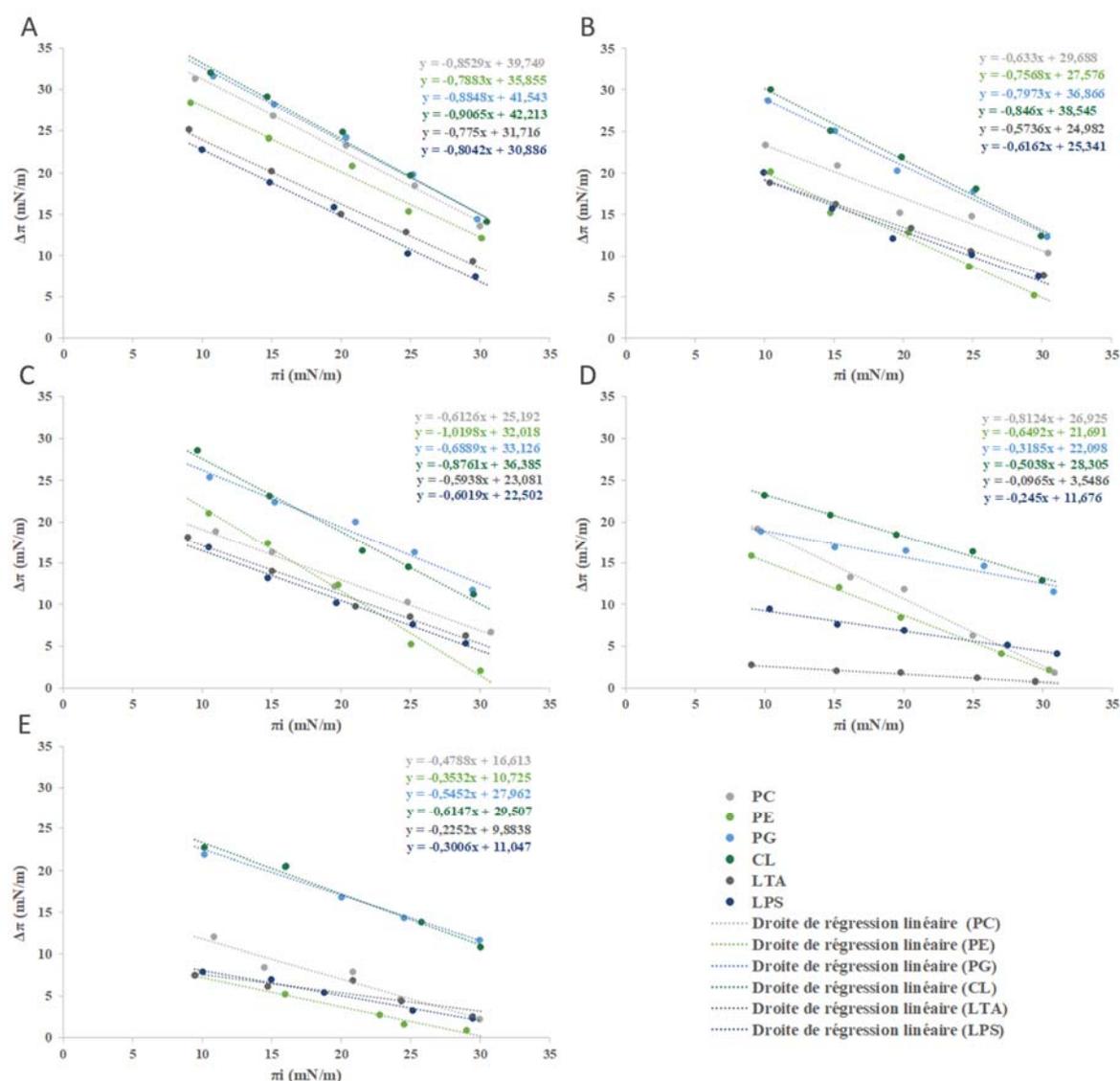
La méthode consiste à maintenir constante la pression de surface ( $\pi$ ) du film lipidique et à mesurer les variations de pression ( $\Delta\pi$ ) induites lors de l'ajout du peptide antimicrobien dans la sous-phase de PBS. Les monocouches lipidiques sont formées à la pression requise ( $\pi_i$ ) par dépôt des lipides à l'interface PBS/air de la goutte de PBS. Les paramètres qui doivent être pris en compte sont : (1) la pression initiale ( $\pi_i$ ) du film lipidique qui reflète la densité des lipides dans la monocouche ; (2) la concentration du peptide dans la sous-phase ; (3) la variation maximale de la pression superficielle ( $\Delta\pi$ ) du film lipidique lors de l'interaction avec le peptide dissous dans la sous-phase.

L'interaction des peptides a été évaluée avec différents lipides purs présents dans les membranes eucaryotes et/ou procaryotes. Les lipides purs testés sont la PhosphatidylCholine (POPC), phospholipide principal du feuillet externe des membranes eucaryotes (tels que les érythrocytes humains) ainsi que la PhosphatidylEthanolamine (POPE), le PhosphatidylGlycérol (POPG) et la Cardiolipine (CL), phospholipides majeurs des membranes cytoplasmique procaryotes. Le POPE est également présent dans les cellules eucaryotes mais principalement au niveau de leur feuillet interne. L'Acide LipoTeichoïque (LTA) et le LipoPolyShaccharide (LPS), étant respectivement des constituants spécifiques des bactéries Gram + et Gram –, ont également été utilisés. PC, PE et PG sont sous leur formes Palmitoyl-Oleoyl (PO) puisque dans les membranes biologiques, ces lipides contiennent un acides gras saturé et un non saturé

184,446,447 .

Pour chaque lipide, les mesures ont été effectuées à partir de plusieurs pressions de surface initiale ( $\pi_i$ ) (comprises entre 10 et 30 mN/m). Pour chacune de ces  $\pi_i$ , le  $\Delta\pi$  a été mesuré suite à l'injection de 1  $\mu$ M de peptide dans la sous-phase, des tests préliminaires ayant montrés que l'interaction des peptides avec les différents lipides était maximale à cette concentration.

L'insertion de 1  $\mu$ M de peptide dans les différentes monocouches lipidiques est présentée dans la **Figure 47** ci-après.



**Figure 47 : Détermination de la pression d'insertion maximale des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (A), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) (B), sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (C), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (D) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (E) dans différentes monocouches de lipides purs.**

Variation maximale de la pression de surface en fonction de la pression initiale de la monocouche lipidique suite à l'injection de  $1\mu\text{M}$  de peptide dans la sous-phase de PBS ( $\text{pH}=7,4$ ). La pression d'insertion maximale correspond à la valeur de la pression de surface initiale pour laquelle la variation de pression (induite par l'insertion du peptide) est égale à  $0\text{ mN/m}$ . Elle est calculée grâce à l'équation de droite obtenue pour chaque peptide dans les différentes monocouches lipidiques (Tableau 18). POPC = PhosphatidylCholine, POPE = PhosphatidylEthanolamine, POPG = PhosphatidylGlycérol, CL = Cardiolipine, LTA = Acide LipoTeichoïque et LPS = LypoPolySaccharide. Température =  $20^\circ\text{C}$ .

L'augmentation de la pression de surface ( $\Delta\pi$ ) lors de l'insertion des peptides diminue linéairement avec la pression de surface initiale ( $\pi_i$ ). La pente négative observée s'explique par le fait que plus la monocouche lipidique est dense, plus il est difficile pour les peptides de s'y insérer. Pour chaque peptide, cette insertion est dépendante de la pression initiale de la

membrane et de sa nature lipidique. La droite de régression linéaire obtenue permet de déterminer la pression d'insertion maximale (PIM) des peptides dans chacune des monocouches lipidiques. La PIM ou pression critique d'insertion correspond à la pression de surface jusqu'à laquelle la molécule peut s'insérer dans les membranes. Pour chaque lipide, elle se rapporte à la pression de surface ( $\pi_i$ ) où la droite coupe l'axe des abscisses ( $\Delta\pi = 0$ ). Les PIMs, calculées à partir des différentes équations de droite obtenues sont présentées dans le **Tableau 18** ci-dessous :

**Tableau 18 : Valeurs des pressions d'insertions maximales des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) dans les différentes monocouches de lipides purs.**

Les pressions d'insertions maximales (PIM) des peptides ont été déterminées grâce aux équations de droites obtenues suite à l'insertion des peptides au sein de monocouche de lipides purs pour une variation de pression de surface égal à 0mN/m.

Monocouche lipidique	PIM calculée (mN/m)				
	sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	sGal1(K <sub>10</sub> I <sub>1</sub> )	sGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	sGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )
POPC	46,60	46,90	41,12	33,14	34,70
POPE	45,48	36,44	31,40	33,41	30,37
POPG	46,95	46,24	48,09	69,38	51,29
CL	46,57	45,56	41,53	56,18	48,00
LTA	40,92	43,55	38,87	36,77	43,89
LPS	38,41	41,12	37,38	47,66	36,75

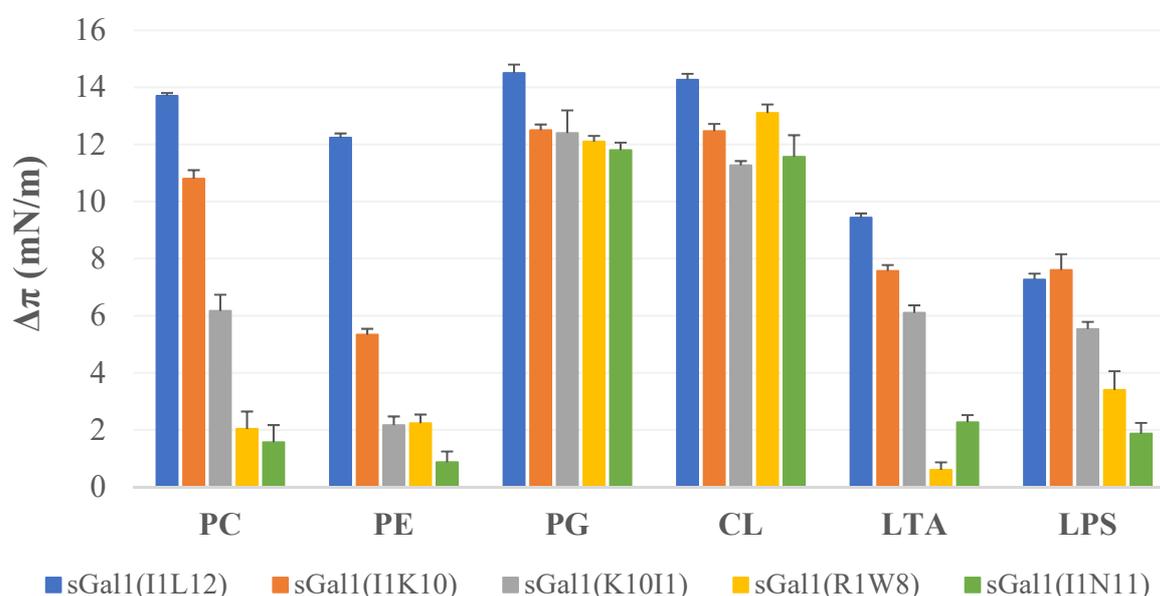
La comparaison de différentes valeurs de PIM pour des compositions de monocouches données permet d'évaluer le pouvoir membranotrope d'une molécule, c'est-à-dire sa capacité à interagir avec les lipides formant les membranes. Plus la PMI d'un peptide pour un lipide donné est importante, plus l'affinité du peptide pour ce lipide est grande. Par ailleurs, la pression latérale des membranes biologiques a été évaluée entre 30 et 35 mN/m<sup>448</sup>. Une PMI supérieure à 30-35 mN/m en monocouche traduirait donc une insertion du peptide dans des membranes lipidiques formées à pression latérale physiologique.

D'après les différentes PIM calculées, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) s'insèrent dans les lipides procaryotes et eucaryotes. Ces peptides principalement actifs contre la croissance des bactéries Gram + sont également hémotoxiques. Leurs PIM sont supérieures à 40mN/m pour les monocouches de POPG, CL, mais également POPC. Par ailleurs, ces peptides présentent une plus forte affinité avec les LTA que les LPS, pouvant expliquer leur effet principalement anti-Gram +.

En revanche, les peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) s'insèrent préférentiellement dans les lipides bactériens. D'après les PIM, l'ordre de sélectivité pour sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) (POPG > CL > LPS >>

LTA > POPE > POPC) est relativement similaire à celui pour sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) (POPG > CL > LTA >> LPS > POPC > POPE). Leurs PIM dans POPC et POPE sont proches de la pression latérale des membranes eucaryotes (entre 30 et 35 mN/m). Ils ne s'introduisent pas dans ces monocouches à pression latérale physiologique confirmant leur caractère moins hémotoxique. En outre, ils sont capables de s'insérer dans les lipides procaryotes à des pressions initiales de surface plus importantes que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>). Alors que ces peptides ont des PIM dans POPG et CL en moyenne de 47 et 44 mN/m respectivement, sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) est capable de pénétrer jusqu'à 69 et 56 mN/m respectivement dans chacune de ces monocouches lipidiques et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) jusqu'à 51 et 48 mN/m respectivement.

Un autre paramètre peut être étudié, le  $\Delta\pi_{30}$ . Il correspond au différentiel de pression  $\Delta\pi$  généré suite à l'insertion d'une molécule dans une monocouche comprimée à une pression initiale de 30 mN/m. Ce paramètre permet ainsi de comparer la capacité des peptides à s'insérer dans une monocouche à une pression équivalente à la pression latérale des membranes biologiques (Figure 48).



**Figure 48 : Insertion des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) dans des monocouches de lipides purs à une pression initiale de 30 mN/m.**

Les lipides purs ont été déposés à l'interface PBS/air pour former une monocouche de pression initiale de 30 mN/m  $\pm$  0,5 mN/m. La variation de pression de surface induite par l'insertion des peptides, à une concentration de 1  $\mu$ M, a été mesurée (n=3, Moyenne  $\pm$  Ecart-type). POPC = PhosphatidylCholine, POPE = PhosphatidylÉthanolamine, POPG = PhosphatidylGlycérol, CL = Cardiolipine, LTA = Acide LipoTeichoïque et LPS = LypoPolySaccharide. Température = 20°C.

A 30mN/m, les peptides s'insèrent tous préférentiellement dans les monocouches lipidiques procaryotes, POPG et CL, induisant une variation de pression de surface d'environ 13mN/m.

Le peptide parent sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est celui qui présente le plus d'affinité pour l'ensemble des phospholipides. Il a le même taux d'insertion dans les POPG, CL, POPC et POPE avec des  $\Delta\pi$  similaires compris entre 12 et 14mN/m. Ce résultat confirme que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) s'insère de manière non spécifique dans les lipides membranaires procaryotes et eucaryotes. Par ailleurs, il a également une affinité pour les LTA et les LPS, bien qu'elle soit plus importante pour les LTA (10 vs. 7mN/m). Ces résultats reflètent sa forte activité antibactérienne majoritairement dirigée contre les bactéries Gram positives ainsi que son fort pouvoir hémolytique.

L'ordre de sélectivité des peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) est similaire (POPG = CL > POPC > LTA = LPS > POPE). Cependant, la différence de pression induite dans chacune des monocouches lipidiques par sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) est toujours inférieure à celle induite par sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). Le pouvoir d'insertion de ce peptide dans les lipides serait donc supérieur.

Ces deux peptides ont la même affinité pour les LTA et les LPS. A 30mN/m, la quantité de sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) qui s'insère dans ces lipides induit une variation de pression d'environ 8mN/m, proche de l'effet du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Le peptide sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) induit un  $\Delta\pi$  de 6 mN/m. Ces résultats confirment leur large spectre d'activité antibactérien. Ils ne sont cependant pas actifs contre *P. aeruginosa*. Les LPS peuvent différer d'une espèce Gram – à une autre, y compris au sein de la même espèce. Les LPS utilisés sont extraits d'une souche d'*E.coli* (055:B5) pouvant expliquer les différences avec les résultats de CMI. Ainsi, bien que ces peptides soient capables de s'insérer dans des membranes de LPS, cela ne semble pas suffisant pour inhiber la croissance de *P. aeruginosa*. Toutefois, ils présentent une insertion modérée dans POPE, principal constituant des membranes des souches Gram - (**Tableau 19**) pouvant expliquer leur meilleur efficacité contre les souches Gram + ( $\Delta\pi$  sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) = 5 mN/m et  $\Delta\pi$  sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) = 2 mN/m).

Ces peptides présentent également une affinité pour POPC ( $\Delta\pi$  sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) = 11 mN/m et  $\Delta\pi$  sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) = 6 mN/m). Cette capacité d'insertion est plus faible que celle de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) ( $\Delta\pi$  = 14 mN/m) pouvant correspondre aux différences d'hémostoxicité induites entre les trois peptides. Par ailleurs, bien que POPE ne soit présent qu'en faible proportion dans le feuillet externe des érythrocytes humains, le taux d'insertion de sGal(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) dans POPE est respectivement 2 à 6 fois plus faible que sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). D'après ces résultats, sGal(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) serait plus hémolytique que (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), or c'est le contraire, il présente une

hémotoxicité plutôt comparable à sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) (**Tableau 19**). Ces résultats suggèrent donc que sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) pourrait avoir une forte affinité pour les sphingomyélines, lipides présents entre 45 et 50% avec les POPC dans le feuillet externe des érythrocytes humains <sup>427,449</sup>.

Les résultats présentés **Figure 47** confirment la capacité des peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) à interagir et à s'insérer au sein de phospholipides membranaires du feuillet externe avec une spécificité pour ceux d'origine procaryotes plutôt qu'eucaryotes. sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) n'a pas d'affinité pour les lipides eucaryotes, ce qui est en accord avec sa faible activité hémolytique. Il s'insère de manière identique dans POPC et POPE induisant environ 2mN/m de variation de pression, soit 7 fois moins que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). De même, le taux d'insertion de sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) dans POPC et POPE est faible/négligeable ( $\Delta\pi = 2\text{mN/m}$  et  $1\text{mN/m}$  respectivement) et concorde avec son caractère non hémolytique.

Par ailleurs, bien que sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) soit un inhibiteur spécifique des Gram +, son taux d'insertion dans les LTA est négligeable ( $\Delta\pi = 0,6\text{mN/m}$ ). Celui dans les LPS est même plus important ( $\Delta\pi = 3,5\text{mN/m}$ ), bien que cela reste faible. Néanmoins, les LPS et LTA peuvent différer d'une espèce bactérienne à une autre. Ainsi, le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) serait peut-être actif contre la souche *E.coli* dont sont extraits ces LPS. Par ailleurs, l'absence de perméabilisation membranaire des souches Gram - (**Figure 44**) pourrait indiquer que sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) a la capacité de s'insérer dans les LPS mais pas de diffuser jusqu'à membrane cytoplasmique. Ceci suggèrerait la présence d'une pompe à efflux de type RGD qui protège ces bactéries contre sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>). Par ailleurs, la composition de la membrane cytoplasmique d'*E.coli* et de *P.aeruginosa* est majoritairement constituée de POPE (**Tableau 19**), or, le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) n'a que très peu d'affinité pour POPE <sup>446</sup>. Son insertion à 30mN/m induit une variation de 2mN/m expliquant sa faible activité contre les souches Gram -. De plus, il présente 6 à 7 fois plus d'affinité pour POPG et CL (représentants entre 74% et 100% des membranes de *B. subtilis* et *S. aureus*). Ces résultats peuvent justifier la spécificité d'action contre les souches Gram +.

*A contrario*, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) présente une forte activité contre les souches Gram - dont le POPE est le constituant majoritaire de leur membranes cytoplasmique. Pourtant, son taux d'insertion dans POPE ainsi que dans les LPS est négligeable ( $\Delta\pi = 1$  et  $2\text{mN/m}$  respectivement) suggérant qu'il possède un mode d'action différent et/ou complémentaire de l'insertion membranaire pour induire la mort bactérienne. Tout comme les quatre autres

peptides, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) a tout de même une forte affinité pour les lipides procaryotes POPG et CL avec des taux d'insertion comparables aux autres peptides ( $\Delta\pi = 13\text{mN/m}$ ). Ses lipides représentent respectivement 20% et 32% des phospholipides de la membrane cytoplasmique d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*. Ceci pourrait justifier le fait que sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) soit moins actif (CMI plus élevée) et moins perméabilisant contre *E. coli* que contre *P. aeruginosa*. Cependant, afin de modéliser au mieux l'interaction entre le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et la membrane de *Pseudomonas aeruginosa* il serait intéressant d'utiliser un mélange ayant des proportions représentatives de la composition membranaire de cette bactérie POPE/CL/POPG (60 :11 :21)<sup>446</sup>. En revanche, bien que, son taux d'insertion dans les LTA (issus de *S. aureus*) soit également faible ( $\Delta\pi = 2\text{mN/m}$ ), ces résultats n'expliquent pas l'absence d'activité de ce peptide contre *S. aureus* dont POPG et CL représentent en moyenne 65% des phospholipides membranaire.

**Tableau 19 : Proportion moyenne des cardiolipines (CL), Phosphatidylglycérol (POPG) et Phosphatidyl-étanolamine (POPE) par rapport aux lipides totaux présents dans les membranes cytoplasmiques d'*E. coli*, de *P. aeruginosa*, *B. subtilis* et *S. aureus*<sup>224,446</sup>.**

Espèces Bactériennes	% Lipides Totaux			
	CL	POPG	POPE	Autres
<b>Bactéries Gram négatives</b>				
<i>E. coli</i>	5	15	80	/
<i>P. aeruginosa</i>	11	21	60	8
<b>Bactéries Gram positives</b>				
<i>B. subtilis</i>	4	70	12	14
<i>S. aureus</i>	22	43	/	35

**L'ensemble de ces résultats confirme les tendances suivantes :**

Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) s'insère de manière non spécifique dans les membranes procaryotes et eucaryotes. Ces résultats reflètent sa forte activité antibactérienne et hémotoxique.

Les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), s'insèrent dans les membranes eucaryotes mais présentes une affinité plus élevée pour les membranes bactériennes.

En revanche, les peptides sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) présentent une spécificité d'action contre les membranes procaryotes par rapport aux membranes eucaryotes, reflétant leur forte activité antibactérienne et leur faible activité hémolytique.

sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ont une forte activité contre la croissance de *S. aureus* et *B. subtilis*. Cela peut être lié à la forte capacité d'insertion de ces 4 peptides dans POPG, principaux phospholipides de ces membranes à 43% pour *S. aureus* et 70% *B. subtilis*. Ils ont une affinité comparable pour les CL qui représentent respectivement 22% et 4% des lipides membranaires de *S. aureus* et *B. subtilis*. En outre, *B. subtilis* contient également 12% de POPE. Ainsi, 86% des phospholipides membranaires de *B. subtilis* et 65% de ceux de *S. aureus* sont perméables au peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et à ses analogues. Cependant, contrairement aux autres peptides sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) n'inhibe pas la croissance de *S. aureus*. Ceci pourrait être dû à la présence à 30% de lys-PG dans sa membrane <sup>224</sup>. En effet, ce phospholipide cationique (de charge nette +1) pourrait entraîner une répulsion plus importante du peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) du fait de ses 4 charges positives et limiter ainsi son action avec la membrane cytoplasmique de *S. aureus*. Toutefois, ceci n'est qu'une hypothèse et il existe probablement de nombreux autres phénomènes non étudiés ici qui peuvent expliquer la résistance de *S. aureus* face à ce peptide. La production de lys-PG est un processus de résistance aux PAMs permettant aux bactéries de réduire la charge globale anionique de leur membrane cytoplasmique <sup>190,222</sup>. La présence de lys-PG dans la membrane de *S. aureus* pourrait donc participer à sa résistance naturelle à certains PAMs cationiques. Par ailleurs, ce peptide perméabilise la membrane de *B. subtilis* qui ne contient pas de lys-PG <sup>224</sup>.

En outre, ce peptide est très actif contre les souches Gram -, *P. aeruginosa* en particulier, mais ne s'insère pas dans POPE, principal constituant membranaire des souches Gram négatives. Ce peptide pourrait donc avoir un autre mode d'action que celui de perméabiliser les membranes. Il ne s'insère pas non plus dans les LPS. Cependant, l'adsorption de ce peptide hautement cationique (charge nette +4) au niveau du LPS anionique, via des interactions électrostatiques, peut suffire à déstabiliser la membrane externe. Le peptide pourrait ensuite diffuser à travers l'espace périplasmique et s'adsorber au niveau de la membrane cytoplasmique et induire la mort bactérienne par perméabilisation de la membrane cytoplasmique et/ou perturbations de mécanismes intracellulaires vitaux à la bactérie <sup>86</sup>.

De même, le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) ne présente aucune affinité pour les POPE et les LPS, confortant son absence d'activité contre les souches Gram -. Cependant, ce peptide Gram + spécifique, ne s'insère pas non plus dans les LTA. Ceci ne semble pas être un facteur limitant. Le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) cationique s'adsorberait à la surface de l'enveloppe bactérienne des souches Gram + par interaction électrostatique avec les acides teichoïques et lipoteichoïques

anioniques. Celui-ci peut ensuite diffuser à travers les pores du peptidoglycane via des interactions électrostatiques avec les LTA présents au sein du peptidoglycane (PDG) et s'accumuler à la surface de la membrane cytoplasmique. Par la suite, le LTA ne représente que 10% (1 pour 10 phospholipides) des phospholipides cytoplasmiques<sup>224</sup>. Le peptide peut donc s'insérer dans POPG et CL majoritairement présents et pour lesquels il a une forte affinité. Par ailleurs, contrairement aux phospholipides membranaires, les LTA ne forment pas de monocouche stable en solution aqueuse, mais des structures micellaires supramoléculaires<sup>224,450,451</sup>. Les peptides présents en solution dans la sous-phase peuvent donc interagir avec les micelles de LTA en solution et donc entraîner une diminution de la quantité de peptides disponibles pour s'insérer dans la monocouche. Des tests pourraient être effectués avec du dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (DPPG) qui stabilise de LTA et donne un mélange stable<sup>224,450</sup>.

Par ailleurs, ces expériences de monocouche lipidique pourraient être réalisées à partir de LTA et de LPS extraits spécifiquement de nos souches bactériennes car comme pour les phospholipides des différences structurelles et quantitatives peuvent exister entre les différentes souches, même au sein d'une même espèce bactérienne. Une étude à partir de lipides totaux extraits de nos différentes souches bactériennes et cellulaire permettrait de comprendre de manière plus spécifique les résultats de CMI ou ceux de cytotoxicité et de perméabilisation. De plus, d'autres approches utilisant les méthodes microscopiques (microscopies électronique à balayage et confocales) pourraient nous permettre de mieux visualiser les interactions entre les peptides et les bactéries.

#### IV.1.5. Etudes/caractérisations pharmacologiques complémentaires

##### *IV.1.5.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide*

Afin d'évaluer l'activité bactéricide ou bactériostatique de nos peptides, la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée successivement à une CMI, par sous-culture de la suspension bactérienne sur milieu gélosé. L'absence de colonie après 24h d'incubation à 37°C témoigne de l'effet bactéricide du produit (CMB/CMI < 2). Dans le cas contraire, le peptide possède une activité bactériostatique. La CMB correspond donc à la concentration minimale capable de tuer la totalité des bactéries présentes.

L'activité bactéricide de chaque peptide a été testée au moins dans deux expériences distinctes. Les CMI et CMB des peptides obtenues contre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *B. subtilis* sont présentées dans le **Tableau 20** ci-dessous :

**Tableau 20 : Détermination de la concentration minimale bactéricide de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(K<sub>1</sub>I<sub>10</sub>), sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) contre différentes souches bactériennes.**

Peptides	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	CMB = CMI 100µM	CMI = 3,1µM CMB = 6,2µM CMB = 2xCMI	CMB = CMI 100µM	CMB = CMI 1,56µM
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	CMI = 50µM CMB = 100µM CMB = 2xCMI	MBC = CMI 100µM	CMB = CMI 25µM
sGal1(I <sub>10</sub> K <sub>1</sub> )	/	CMB = CMI 12,5µM	CMI = 100µM MBC > 100µM	CMB = CMI 6,25µM
sGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	/	CMB = CMI 25µM	/	CMB = CMI 12,5µM
sGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )	CMB = CMI 12,5µM	/	CMB = CMI 50µM	CMB = CMI 12,5µM
Mélicitine	CMI = 6,25µM CMB = 25µM CMB = 4xCMI	CMB = CMI 1,56µM	CMI = 6,25µM CMB = 12,5µM CMB = 2xCMI	CMB = CMI 1,56µM
Gentamycine	CMI = 0,3µM MBC = 0,6µM CMB = 2xCMI	NT	NT	NT
Amoxicilline	//	CMI = 0,9µM MBC = 1,8µM CMB = 2xCMI	CMB = CMI 9µM	CMB = CMI 0,45-0,9µM

Les CMI et les CMB des peptides sont remarquablement similaires. Ils ont majoritairement une activité bactéricide contre les différents isolats bactériens. Au maximum, la CMB correspond au double de la CMI. *B. subtilis* est très sensible à l'action des peptides. Leurs CMB correspondent à leurs CMI et vont de 1,56µM pour sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) à 25µM pour sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). En revanche, les deux souches Gram négatives et *S. aureus* apparaissent plus résistantes.

Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est bactéricide contre *B. subtilis* dès 1,56µM (= CMI) et 6,5µM pour *S. aureus* (2x la CMI). Contre les souches Gram négatives, la CMB de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est identique à sa CMI, en revanche 100µM de peptide sont nécessaires à leur inhibition. Soit 15 à 64 fois plus que contre les souches Gram positives. Le peptide sGal1(K<sub>1</sub>I<sub>10</sub>) est inactif contre *P. aeruginosa*. Il est bactéricide dès 25µM contre *B. subtilis* et dès 100µM contre *E. coli* (= CMI)

et *S. aureus* (2x la CMI). Les peptides sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) n'inhibent pas la croissance des bactéries Gram négatives. En revanche, ils ont un effet bactéricide dès la CMI contre la croissance de *B. subtilis* (dès 6,25µM et 12,5µM respectivement) et *S. aureus* (dès 12,5µM et 25µM respectivement). Enfin, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) est également bactéricide dès la CMI contre *P. aeruginosa* et *B. subtilis* dès 12,5µM et *E. coli* dès 50µM.

La mélittine est bactéricide dès 1,56µM (= CMI) pour les souches Gram positives. En revanche, elle a un effet bactériostatique entre 2 et 4 fois la CMI contre *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement.

Les antibiotiques de références ont un effet bactéricide dès la CMI contre les souches non pathogènes. Ils sont bactéricides dès deux fois la CMI contre les souches pathogènes.

Ces résultats indiquent une activité bactéricide puissante de ces cinq peptides (CMB/CMI ≤ 2). Par ailleurs, les résultats de CMI étant en accord avec ceux de perméabilisation, cela suggère que les peptides induisent la mort des bactéries par perméabilisation de leur membrane. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) semble néanmoins avoir un mécanisme d'action différent et/ou complémentaire contre *E. coli*. En effet, bien qu'il présente une activité bactéricide équivalente à sa CMI dès 50µM, il ne semble pas perméabiliser sa membrane (**Figure 44**).

#### *IV.1.5.2. Détermination de la CMI sur des souches bactériennes multirésistantes*

Après avoir évalué l'activité du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et de ses analogues contre des souches bactériennes de références non pathogènes et pathogènes, leur activité a été déterminée contre des agents pathogènes résistants à des antibiotiques. Il s'agit d'une souche de *P. aeruginosa* résistante aux fluoroquinolones (*P. aeruginosa* FQR), de *S. aureus* résistante à la méthicilline (*SARM*) et de *B. subtilis* résistante à la nisine (*B. subtilis* nisine R).

L'activité de chaque peptide a été testée dans deux expériences distinctes. Les CMI des peptides obtenues contre *P. aeruginosa* FQR, *SARM* et *B. subtilis* nisine R ainsi que les indices thérapeutiques correspondants sont présentés dans le **Tableau 21**.

**Tableau 21 : Concentrations minimales inhibitrices des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) contre la croissance de *P. aeruginosa* FQR, SARM et *B. subtilis* nisine R, ainsi que leurs indices thérapeutiques correspondant.**

Peptides	CMI			Indice Thérapeutique		
	<i>P. aeruginosa</i> FQR	SARM	<i>B. subtilis</i> nisine R	<i>P. aeruginosa</i> FQR	SARM	<i>B. subtilis</i> nisine R
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	/	6,25µM	3,13µM	/	1,6	3,2
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	100µM	12,5µM	/	1,35	10,8
sGal1(I <sub>10</sub> K <sub>1</sub> )	/	25µM	12,5µM	/	1,2	2,4
sGal1(R <sub>1</sub> W <sub>8</sub> )	/	50µM	25µM	/	4,5	9
SGal1(I <sub>1</sub> N <sub>11</sub> )	50µM	/	12,5µM	200	/	800

Parmi les cinq peptides testés, seul sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) inhibe la croissance de *P. aeruginosa* résistant aux fluoroquinolones et ce avec un indice de sureté de 200.

*P. aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste impliqué dans les infections respiratoires, urinaires, gastro-intestinales chez les patients atteints de déficiences immunitaires (dans le cas de cancer, brûlure, VIH et fibrose kystique). Ces infections entraînent souvent une morbidité et une mortalité significatives et constituent une proportion de plus en plus importante dans les infections hospitalières. En France, il est impliqué dans 10% des infections nosocomiales et plus rarement dans des infections communautaires <sup>452</sup>. Ce micro-organisme possède de nombreux facteurs de virulence qui contribuent à sa pathogénicité et se caractérise par une résistance intrinsèque à de nombreux antimicrobiens en raison de sa membrane externe, de la présence de transporteurs d'efflux multidrogues et de l'inactivation antimicrobienne endogène <sup>453-455</sup>. Bien que des agents anti-*Pseudomonas* tels que des carbapénèmes, fluoroquinolones et aminoglycosides aient été découverts et développés, *P. aeruginosa* acquiert facilement une résistance à des agents individuels via des mutations chromosomiques et un transfert de gène latéral <sup>454,456</sup>.

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre couramment utilisés pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Cette classe d'agents cible l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV empêchant la réplication de l'ADN bactérien. La résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones est due aux mutations des gènes codant pour ces cibles et à la surexpression de plusieurs pompes à efflux de type RND (Résistance-Nodulation-Division) <sup>452-</sup>

<sup>454,456</sup>. Bien que quatre fois moins efficace que contre *P. aeruginosa*, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) inhibe *P. aeruginosa* FQR selon un indice thérapeutique encore très sûr (>100). Ce résultat suggère que les cibles de sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), ou du moins une partie, sont différentes de celles des fluoroquinolones. En effet, contrairement aux fluoroquinolones, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) a la capacité de perméabiliser les membranes telles que celles de *P. aeruginosa* (**Figure 44**). Il pourrait donc constituer une alternative intéressante pour la lutte contre *P. aeruginosa* FQR qui en 2015, en France, représentait 20% des isolats invasifs de *P. aeruginosa* testés <sup>457</sup>.

Les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), (K<sub>1</sub>L<sub>10</sub>) et (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) permettent l'inhibition de la croissance de *S. aureus* résistant à la méthicilline. *S. aureus* résistant à la méthicilline représente la cause la plus importante d'infections nosocomiales pour lequel les options thérapeutiques sont limitées <sup>457</sup>. Les infections à *SARM* représentent jusqu'à 70% des infections à *S. aureus* dans les unités de soins intensifs et sont associées à une morbidité et à une mortalité préoccupante, ainsi qu'à une augmentation des coûts de soins de santé <sup>458-460</sup>. En 2015, en France, 16% des isolats de *S. aureus* étaient résistants à la méthicilline <sup>457</sup>. Cet antibiotique est une enzyme de la famille des  $\beta$ -lactamases qui inhibe la synthèse du PDG et donc de la paroi des bactéries Gram + en se liant aux Protéines de Liaison des Pénicillines (PLP). La résistance est habituellement conférée par l'acquisition d'un gène non natif codant pour une protéine de liaison à la pénicilline (PLP2a) ayant une faible affinité pour les  $\beta$ -lactames. Cette résistance permet de maintenir la biosynthèse de la paroi cellulaire en présence de concentrations inhibitrices d'antibiotiques <sup>461</sup>. L'inhibition de ses souches par nos peptides suggère qu'ils ont un mécanisme d'action différent de la méthicilline. Tout comme pour *S. aureus*, ils semblent agir par perméabilisation de la membrane cytoplasmique. *SARM* est aussi sensible que *S. aureus* à l'action du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), suggérant que l'effet perméabilisant de ce peptide est aussi efficace contre les deux souches. En revanche, *SARM* est plus résistant à l'action de ces trois analogues. Deux à quatre fois plus de produit sont nécessaires pour inhiber sa croissance, diminuant d'autant les indices de sureté. Comme pour *S. aureus*, le peptide qui présente le meilleur indice thérapeutique reste sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) avec un indice néanmoins faible de 4,5.

Enfin, les cinq peptides inhibent la croissance de *B. subtilis* résistant à la nisine. La nisine est un PAM cationique polycyclique produit par certaines bactéries Gram-positives. Elle fait partie de la famille des bactériocines et plus particulièrement des lantibiotiques. Utilisée comme conservateur alimentaire depuis plus de 60 ans, elle constitue un intérêt particulier pour les

applications cliniques du fait de son efficacité contre un large spectre de bactéries Gram +, y compris des pathogènes et d'une faible cytotoxicité cellulaire aux concentrations antimicrobiennes <sup>462,463</sup>. La nisine agit selon un double mécanisme. D'une part, elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en se liant au lipide II (précurseur de la synthèse des PDG). D'autre part, le complexe nisine/lipide II induit la formation de pores dans la membrane cytoplasmique et perturbe ainsi son intégrité. La formation de pores est rendue possible par une région charnière flexible au milieu du peptide qui permet à l'extrémité C-terminale de s'insérer dans la membrane tandis que l'extrémité N-terminale reste liée au lipide II <sup>462,464</sup>. Malgré un double mécanisme d'action, la nisine a été associée au développement d'une résistance minimale à laquelle nos peptides pourraient ne pas être sujet. Dans ce cas, le processus de perméabilisation des peptides sGall1 pourrait différer de celui de la nisine.

La résistance de *B. subtilis* à la nisine est due à des mutations qui induisent des changements dans la composition de la membrane et de la paroi cellulaire. Elles contribuent notamment à : i) un épaissement de la paroi cellulaire et à la synthèse supplémentaire de LTA pour empêcher la liaison de la nisine au lipide II, ii) à la réduction de l'acidité du milieu extracellulaire pour stimuler la liaison de la nisine à la paroi et induire sa dégradation, iii) à empêcher l'insertion de nisine dans la membrane et iv) transporter ou extruder la nisine à travers la membrane. Ces changements peuvent survenir indépendamment ou ensemble et ont été décrits comme des adaptations physiologiques <sup>456,465-467</sup>. Cependant, seuls quelques exemples de résistance à la nisine ont émergé et ce, uniquement dans des conditions de laboratoire <sup>463</sup>.

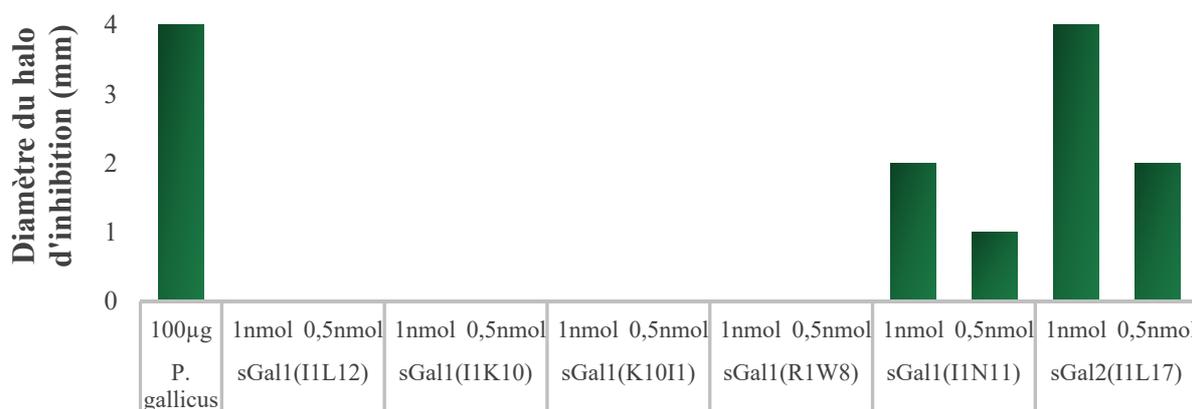
Les peptides sGall1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) sont aussi efficaces contre *B. subtilis* résistant à la nisine que *B. subtilis* sauvage. En revanche, sGall1(K<sub>1</sub>I<sub>10</sub>), (R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et (I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) sont deux à quatre fois moins efficaces que contre *B. subtilis*, impactant ainsi leur indice de sureté. Toutefois, avec un indice de 800, le peptide sGall1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) pourrait constituer un traitement sûr pour l'inhibition de ses souches Gram positives.

**Ainsi**, sGall1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et ses analogues ont la capacité d'inhiber la croissance de souches pathogènes Gram + et -, y compris celles résistantes à des antibiotiques telles que *P. aeruginosa* FQR, *SARM* et *B. subtilis* nisine R. Ceci pourrait suggérer qu'ils ne sont pas affectés par les mécanismes conventionnels de résistance aux antibactériens (pompes à efflux MDR, modification de la paroi cellulaire, modification des processus intracellulaire). Afin d'en être sûr, des tests de résistance sont à prévoir.

L'activité inhibitrice des peptides sGal1 contre ces souches résistantes est probablement liée à leur mécanisme d'action différent de ceux des antibiotiques auxquelles ces souches sont devenues résistantes. En effet, s'ils avaient le même mécanisme d'action, ils ne seraient pas actifs. Cependant, ces souches sont moins sensibles à l'action de ces peptides que leur correspondant sauvage, excepté sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) qui est aussi efficace. Ces résultats confirment le large spectre antibactérien de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) ainsi que de ces analogues. Le peptide parent sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est le plus actif contre la croissance de *SARM* et *B. subtilis* nisine R. En revanche, c'est sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) qui présente le meilleur indice thérapeutique contre *SARM*, bien qu'il soit faible. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) reste le plus sûr pour la lutte contre *P. aeruginosa* FQR et *B. subtilis* nisine R.

#### IV.1.5.3. Evaluation de l'activité antifongique

En plus d'avoir une large gamme d'activité contre la croissance des bactéries Gram + et -, le venin de *Polistes gallicus* inhibe la croissance de *Candida sake*, *Candida parapsilosis* et *Candida albicans* (Figure 32). *C. parapsilosis* et *albicans* font parti des 5 espèces pathogènes de *Candida* responsables, à plus de 90%, des infections invasives <sup>468</sup>. Afin d'évaluer si les peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et ses analogues possèdent une activité antifongique, ils ont été testés en solide à 1 et 0,5 nmol finale contre *Candida albicans*, la plus sensible des trois levures au venin entier. De plus, c'est l'espèce de *Candida* la plus impliquée dans les infections humaines <sup>469</sup>. L'activité du peptide sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) a également été évaluée dans les mêmes conditions.



**Figure 49 : Evaluation de l'activité antifongique des peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sGal1(K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) et sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) contre la croissance de *Candida albicans* à 0,5 et 1nmol.**

D'après la **Figure 49**, le peptide sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) présente une activité antifongique à 1 et 0,5 nmol (soit 1,84 et 0,92µg respectivement), équivalente à celle du venin entier à 100µg (4 mm de diamètre d'inhibition). D'autres mastoparans issus de venins de guêpes sociales sont connus pour leur activité antibactérienne et antifongique tels que Polybia-MPII ou MP-VBs<sup>399,470</sup>. Des peptides chimiotactiques sont également décrits pour cette activité, y compris la Protonectine, Polybia-CP et VESP-VBs<sup>470-472</sup>. Toutefois, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) n'inhibe pas la croissance de *C. albicans*. Ses analogues structuraux sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et (K<sub>10</sub>I<sub>1</sub>) ne sont pas non plus actifs. De même pour le peptide sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>). En revanche, le peptide modifié sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) présente la capacité d'inhiber la croissance de *C. albicans* à 1 et 0,5 nmol (1,28 et 0,64µg soit respectivement).

Bien que la majorité des espèces de *Candida* soient incapables de croître à 37°C, une quinzaine d'entre elles peuvent agir comme agents pathogènes opportunistes chez des patients immunodéprimés<sup>468,469</sup>. Elles provoquent des infections fongiques (candidoses) au niveau de la peau, des muqueuses et du système sanguin pouvant conduire à la mort. Dans les années 1980, l'augmentation de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et de l'épidémie du SIDA a entraîné une recrudescence du nombre de candidoses. En outre, les progrès médicaux conduisant à la pratique accrue de procédures cliniques invasives et à une utilisation plus répandue des traitements immunosuppresseurs ont également contribué au problème<sup>469</sup>. L'infection invasive due aux espèces de *Candida* est reconnue comme une cause majeure de morbidité et de mortalité dans l'environnement de la santé<sup>468</sup>. Elle est notamment la 4<sup>ème</sup> cause la plus fréquente d'infections sanguines, avec un taux de mortalité estimé à plus de 25%<sup>471</sup>. Du fait de la résistance acquise de *Candida* aux traitements conventionnels, les antifongiques sont aujourd'hui limités, suscitant un intérêt particulier pour la recherche de nouveaux agents.

Ainsi, bien qu'il semble moins efficace que sGal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) (diamètres d'inhibition plus faibles aux deux concentrations), sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) apparaît plus intéressant du fait de son absence de toxicité à l'encontre des érythrocytes humains. De part cette caractéristique antifongique, le PAM sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) pourrait donc constituer une alternative potentielle aux antibiotiques classiques.

IV.1.5.4. Comparaison avec des analogues de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>)

D'après sa séquence, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) appartiendrait à la famille des peptides chimiotactiques. Bien qu'original, ce peptide présente 83% d'homologie avec le peptide Polistes-Protonectine (P-Protonectine) et 75% avec PMM3, Polybia-CP et la Protonectine (**Tableau 22**), peptides chimiotactiques également issus de venins de guêpes sociales 408,409,415,417.

Polybia-CP et la Protonectine sont décrits dans la littérature pour leur activité antibactérienne. Polybia-CP inhibe *S. aureus* et *B. subtilis* selon une CMI de 4µM. Ses CMI contre *E. coli* et *P. aeruginosa* sont de 16µM et 128µM respectivement <sup>432</sup>. La Protonectine qui diffère par une mutation GS<sub>11</sub> à son extrémité C-terminale possède un effet antibactérien comparable. Sa CMI contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* est de 8µM, 4µM, 32µM et 128µM respectivement <sup>422</sup>. Les peptides P-Protonectine et PMM3 n'ont en revanche pas été décrits pour leur activité antibactérienne. Leur origine et leur forte identité avec sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), la Protonectine et Polybia-CP suggèrent qu'ils ont une activité anti Gram – et + comparables à ces peptides.

Etant donné que le peptide sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) présente moins de cytotoxicité et d'hémotoxicité que le peptide parent sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) une étude comparative des activités pharmacologiques des peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et trois analogues décrits dans la littérature a été réalisée. En effet, l'analogue sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), délété de 2 A.A. à l'extrémité C-terminale, présente 90% d'identité avec P-Protonectine, 80% avec Polybia-CP et la Protonectine, et 70% avec PMM3.

**Tableau 22 : Séquences de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et de ses analogues.**

Les différences en A.A. des séquences de Polistes-Protonectine, Protonectine, PPM3, sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) par rapport à sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) sont mentionnées en rouge.

Peptides	Séquence	Charge nette	A.A. Hydrophobes
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	ILSAILGLLKNL	+1	75%
Polistes-Protonectine	ILSALLGLLKSL <sup>415</sup>	+1	75%
Protonectine	ILGTILGLLKGL <sup>417</sup>	+1	83%
Polybia-CP	ILGTILGLLKSL <sup>408</sup>	+1	75%
PMM3	FLSALLGMLKNL <sup>409</sup>	+1	75%
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	ILSAILGLLK	+1	80%
sP-Protonectine(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	ILSALLGLLK	+1	80%
sP/Polybia-CP(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	ILGTILGLLK	+1	80%
sPMM3(F <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	FLSALLGMLK	+1	80%

Pour effectuer cette étude, les peptides analogues P-Protonectine, PMM3, Polybia-CP et Protonectine ont été synthétisés par voie chimique en phase solide délétés des 2 derniers A.A. en C-terminal. Ils sont nommés sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). La Protonectine et Polybia-CP ont alors la même séquence. Un seul peptide a été synthétisé et nommé sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et ces trois peptides obtenus sont de taille identique, avec un charge nette +1 et présentent 80% d'A.A. hydrophobes (**Tableau 22**).

L'activité antibactérienne de chaque peptide a été testée dans deux expériences distinctes. Les CMI des peptides obtenues contre les différentes souches bactériennes sont présentées dans le **Tableau 23** ci-dessous :

**Tableau 23 : Concentrations minimales inhibitrices de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) contre la croissance de *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* FQR, *S. aureus*, SARM, *E. coli*, *B. subtilis* et *B. subtilis* nisine R.**

« / » correspond à une valeur de CMI supérieure à 100µM (n=2) sauf sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et (I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) testés n=4.

Peptides	CMI (µM)						
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> FQR	<i>S. aureus</i>	SARM	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> nisine R
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	100	/	6,25-3,1	6,25	50	3,13	3,13
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	/	50-25	100	100-50	25-12,5	12,5
sP-Protonectine(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	/	50-100	100	100	25	12,5
sP/Polybia-CP(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	/	50	100	100	12,5	12,5
sPMM3(F <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	/	/	50	100	/	12,5	25

Ces cinq peptides inhibent la croissance des bactéries de manière dose-dépendante. Actifs contre les souches non pathogènes, ils ont également la capacité d'inhiber la croissance de souches pathogènes plus ou moins résistantes à un antibiotique. Leur activité est principalement anti-bactéries Gram +. Aucun de ces peptides n'est actif contre *P. aeruginosa* FQR. Seul sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) inhibe la croissance de *P. aeruginosa* et ce avec une CMI élevée (100µM). Enfin, leur activité contre *E. coli* est également faible (CMI comprises entre 50 et 100µM).

Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) est le plus actif et ce quelque soit la souche testée. Outre le fait qu'il soit le seul à inhiber *P. aeruginosa*, il est en moyenne 16 fois plus actif contre SARM, 8 fois plus actif contre *S. aureus*, 4 fois plus actif contre les deux souches de *B. subtilis* et 2 fois plus actif contre *E. coli*. Toutefois c'est également le plus toxique (IT = 0,1 et 3,2 - **Tableau 24**). Par ailleurs, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) avec lequel il partage le plus d'homologie (83%) est celui qui possède l'activité antibactérienne la plus proche.

Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) a globalement la même activité antibactérienne que les peptides sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). Leurs CMI contre les différentes souches sont comparables, bien que celles de sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) aient une tendance à être plus faibles.

sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) semble être moins actif contre *S. aureus*. Sa CMI est deux à quatre fois plus importante que celle de sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). D'après l'ensemble de nos résultats, la présence de (I) à l'extrémité N- ou C-terminale semble être déterminante pour l'activité anti-Gram négatif de ces peptides. Bien que la phénylalanine (F) et l'isoleucine (I) soit des A.A. de nature hydrophobe, le peptide sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) qui présente une mutation IF en position 1, n'inhibe aucune des souches Gram négatives testées y compris *E. coli* (à 100µM) alors que sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) possède une CMI de 50-100µM. Deux fois plus de peptide sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) sont nécessaires que sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) pour inhiber la croissance de *B. subtilis* résistant à la nisine. L'étude de relation structure/activité à l'aide de ces analogues synthétiques montre que l'isoleucine (I) en N-terminale est essentielle à l'activité anti-Gram négatif.

Ces peptides ont la même taille, charge et proportion d'A.A. hydrophobes. La différence d'activité, aussi faible soit-elle, réside donc dans l'enchaînement et la nature des acides aminés de leur séquence. Ainsi, les peptides sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) qui présentent le plus homologie avec sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sont les plus proches en activité antibactérienne avec ce peptide. Ils ont globalement la même CMI contre les différentes souches testées. Bien que les CMI obtenues avec le peptide sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) diffèrent légèrement, elles restent comparables.

Une étude comparative de l'activité hémolytique de chaque peptide sur des érythrocytes de sang humain a été également réalisée. Chaque peptide a été testé en triplicat. Les CMH<sub>50</sub> et CMH<sub>100</sub> obtenues pour chacun des peptides et les indices thérapeutiques correspondants sont présentés dans le **Tableau 24**.

**Tableau 24 : Activité hémolytique de sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) en comparaison à sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) sur des érythrocytes humains, ainsi que leur indice thérapeutique pour les différentes souches bactériennes testées. CHM<sub>50</sub> et CHM<sub>100</sub> = Concentration minimale induisant 50% et 100% d'hémolyse respectivement.**

Chaque peptide a été testé en triplicat au moins une fois (n=1).

Peptides	CMH <sub>50</sub>	CMH <sub>100</sub>	Indice Thérapeutique (CMH <sub>50</sub> /CMI)						
			<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa FQR</i>	<i>S. aureus</i>	<i>SARM</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis Nisine R</i>
sGal1(I <sub>1</sub> L <sub>12</sub> )	10µM	25µM	0,1	/	1,6	1,6	0,2	3,2	3,2
sGal1(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	135µM	250-500µM	/	/	2,7-5,4	1,35	1,3-2,7	5,4-10,8	10,8
sP-Protonectine(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	140µM	250µM	/	/	1,4	1,4	1,4	5,6	11,2
sP/Polybia-CP(I <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	150µM	250µM	/	/	3	1,5	1,5	12	12
sPMM3(F <sub>1</sub> K <sub>10</sub> )	90µM	250µM	/	/	1,8	0,9	0,9	7,2	3,6

L'hémotoxicité des peptides est dose-dépendante. Le peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) qui présente la plus forte activité antibactérienne est également le plus hémotoxique (CMH<sub>50</sub> = 10µM). Plus courts les peptides(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) sont 9 à 15 fois moins hémolytiques suggérant que la taille et/ou l'extrémité C-terminale est également déterminante pour leur effet hémolytique. Avec une CMH<sub>50</sub> de 135µM, sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) est 13 fois moins hémolytique que son peptide parent. Par ailleurs, la Protonectine et Polybia-CP lysent 50% des globules rouges humains à environ 50µM<sup>422,472</sup>. Ils sont 3 fois plus hémolytiques que leur analogue sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>).

Les peptides sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>), sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ont un effet hémolytique comparable contre les érythrocytes humains. Leurs CMH<sub>50</sub> sont comprises entre 90 et 150µM. La lyse complète des cellules est induite dès 250µM (CMH<sub>100</sub>). sP-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) a l'activité hémolytique la plus proche de sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) et c'est celui avec lequel il présente le plus d'homologie (90%). Ils ont donc des indices thérapeutiques comparables, sauf pour *S. aureus*, où Polistes-Protonectine(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) est moins actif. sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) diffère en partie de sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) par une mutation S<sub>3</sub>A<sub>4</sub>-G<sub>3</sub>T<sub>4</sub>. A et G sont deux acides aminés hydrophobes mais ils n'ont pas la même position au sein de chaque séquence, pouvant influencer sur la structure secondaire et donc sur le caractère hémolytique des peptides. sP/Polybia-CP(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) induit 50% de lyse érythrocytaire dès 150µM contre 135µM pour sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>). Leurs indices thérapeutiques sont également comparables. Enfin, sPMM3(F<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) qui est identique à 70% a une activité hémolytique plus éloignée. C'est également le plus hémolytique. Ses indices thérapeutiques sont plus faibles.

Ces peptides ont la même taille, charge et proportion d'A.A. hydrophobes. La différence d'activité hémolytique, aussi faible soit-elle, réside donc dans l'enchaînement et la nature des acides aminés au sein de leur séquence.

D'après cette étude, sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>K<sub>10</sub>) ont des activités antibactérienne et hémolytique comparables à leurs homologues décrits dans la littérature et plus particulièrement à Polistes-Protonectine, Polybia-CP et à la Protonectine. Ces molécules au large spectre antibactérien présentent néanmoins une toxicité importante limitant leur utilisation thérapeutique. Ils peuvent néanmoins servir de modèle pour la conception de nouveaux peptides plus efficaces et surtout moins hémotoxiques. Des études de structures/activité au moyen de peptides synthétiques, comparable à celle que nous avons initié à partir du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) sont ainsi nécessaires.

## V. Autres fractions bioactives isolées à partir de venins en cours d'identification et caractérisation

Parmi les 200 venins criblés plus de la moitié présentaient une activité antibactérienne dont un certain nombre sont décrits dans la littérature. Parmi les venins non décrits, une identification des molécules bactérienne a été initiée à partir des venins suivants : V234, V53, V81, V261 et V139.

### V.1. Etude de V234

Le venin V234 correspond au venin de *Salamandra salamandra* (*S. salamandra*). La salamandre tachetée est un amphibien de la famille des *Salamandridae* qui se rencontre en Europe y compris en France. C'est une espèce de salamandre toxique. Elle synthétise et libère des sécrétions riches en alcaloïdes stéroïdiens qui auraient une activité neurotoxique au contact des muqueuses. Ces sécrétions nocives et adhésives recouvrent sa peau. Elles constituent ainsi une protection contre les prédateurs potentiels et prévient également les infections cutanées <sup>473,474</sup>.

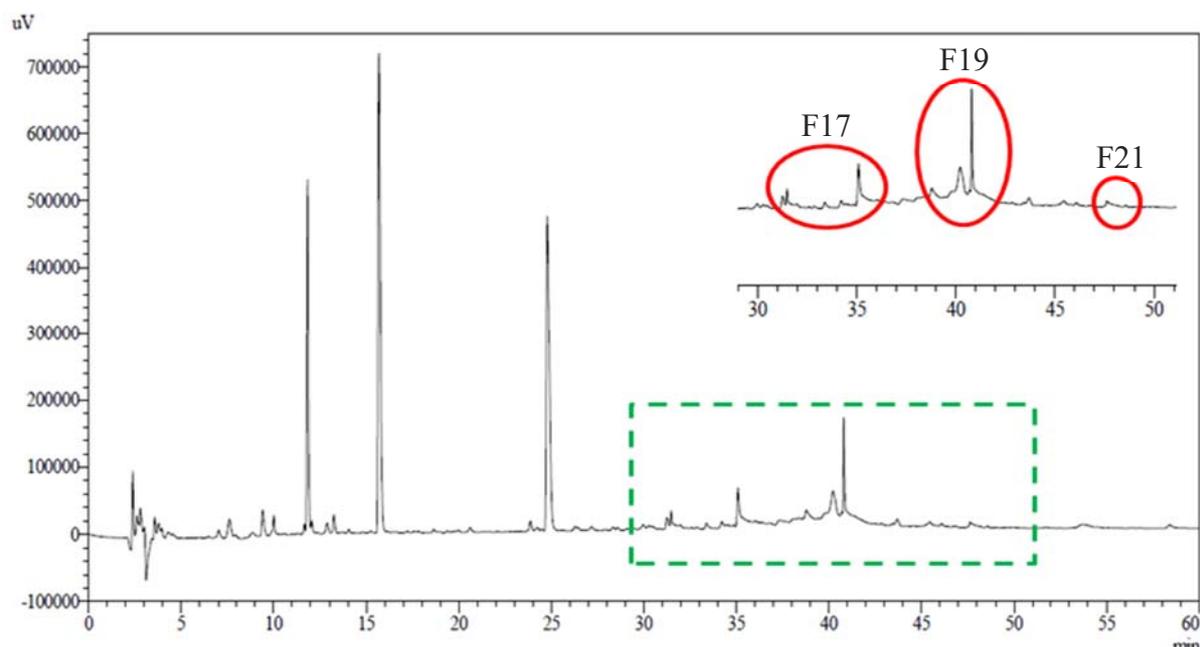
Les venins d'amphibiens sont riches en petites molécules et de nombreux peptides antimicrobiens ont déjà été identifiés à partir de leur venin tels que ceux de la famille des magainines <sup>194</sup>. Habermehl et Preusser ont été les premiers à accorder une attention particulière à l'effet fongicide et bactéricide du venin de Salamandre. Ils ont montré que les salamandres privées de leur venin meurent des suites d'une infection microbienne, sauf si elles étaient maintenues dans un environnement stérile jusqu'à ce que leur venin soit resynthétisé dans la glande granulaire <sup>475,476</sup>. Ainsi, le venin de la salamandre *Tylototriton verrucosus* contiendrait de nombreux peptides antimicrobiens <sup>474,477</sup>. Un PAM cationique de la famille des défensines nommé CFBD a été identifié à partir des sécrétions de salamandre *Cynops fudingensis* <sup>478</sup>. Les PAMs présents sur la peau des salamandres pourraient agir comme une partie de leur système immunitaire inné. Le système immunitaire inné leur permet de survivre dans un environnement riche en organismes pathogènes <sup>478</sup>.

A 10 mg/mL, le venin de *S. salamandra* présente une activité contre des souches Gram + non pathogènes et pathogènes (*B. subtilis* et *S. aureus*) et Gram – (*E. coli*) (**Figure 31**). En revanche, *P. aeruginosa* n'est pas sensible à son action. Il existe des bactéries qui colonisent la peau des

salamandres et ne sont pas sensibles à leur venin <sup>476</sup>. Elkan et Cooper ont déclaré, en 1980, que de nombreuses espèces de bactéries peuvent être isolées de la peau des reptiles et des amphibiens. La grande majorité sont des bacilles Gram négatifs tels que *E. coli*, *Aeromonas* spp. et *pseudomonas* spp. qui proviendraient des selles ou de l'environnement de l'animal. Greven et Bettin, ont en 1986, isolé trois espèces de bactéries Gram-négatives de la peau de *S. salamandra* dont *Pseudomonas fluorescent*. Ces souches appartiendraient à la flore bactérienne indigène et auraient la capacité d'inhiber la colonisation de la peau par des micro-organismes pathogènes, soutenant ainsi l'activité antimicrobienne du venin des salamandres <sup>476</sup>.

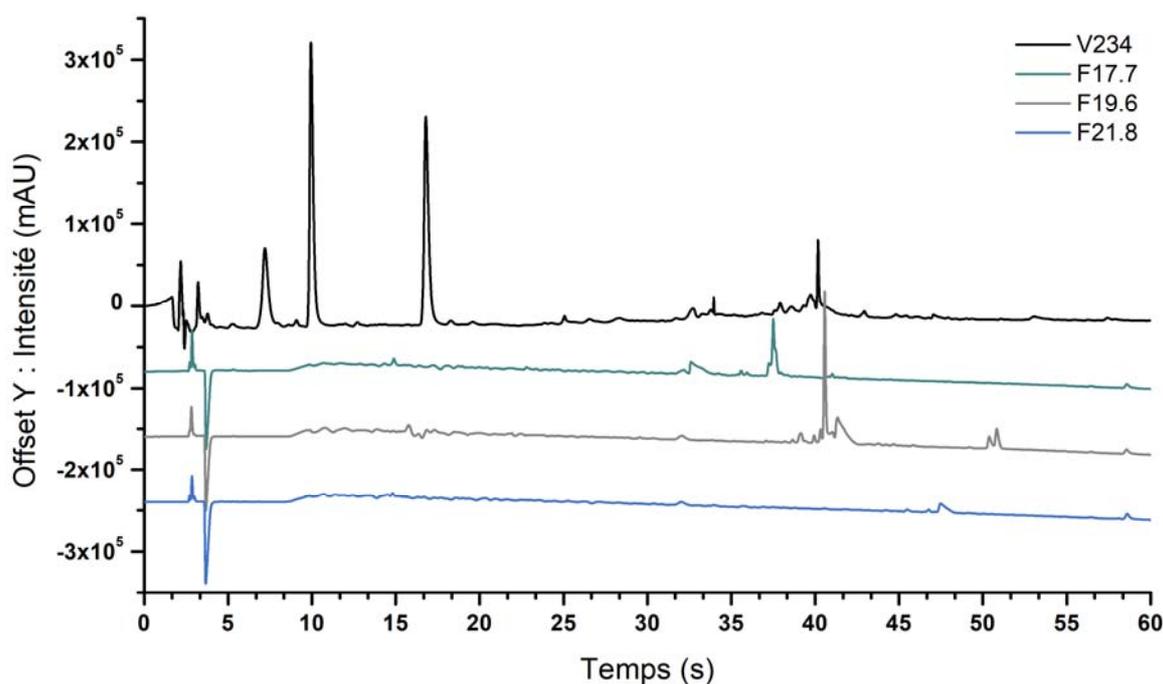
Comme pour le venin de *Polistes gallicus*, le venin de *S. salamandra* a été fractionné afin d'en isoler les molécules d'intérêts antibactériennes.

Trois fractions actives ont été identifiées, F17, F19 et F21, pour lesquelles une sous-fraction a été retenue, F17.7, F19.6 et F21.8 respectivement (**Figures 50 et 51**).



**Figure 50 : Chromatogramme du venin V234 obtenu par HPLC analytique à 214nm.**

Injection de 20  $\mu$ L d'une solution à 50 mg/mL sur une colonne analytique C18 (Nucléodur, Macherey, Nagel, 100-5, 250 x 4,6 mm). Elution selon un gradient allant de 0 à 60% d'ACN (+10% H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) pendant 60 minutes, après 3 minutes à 100% H<sub>2</sub>O (+0,1% TFA) selon un gradient à 1 mL/min. Rectangle vert en pointillé = Zoom sur les fractions actives : F17, F19 et F21.



**Figure 51 : Chromatogrammes du venin V234 et de ses sous-fractions, F17.7, F19.6, F21.8, actives obtenus par HPLC analytique à 214nm.**

Elution réalisée au moyen colonne analytique C18 (Nucléodur, Macherey, Nagel, 100-5, 250 x 4,6 mm) selon un gradient allant de 0 à 60% d'ACN (+10% H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) pendant 60 minutes, après 3 minutes à 100% H<sub>2</sub>O (+0,1% TFA) selon un gradient à 1 mL/min.

Afin de pallier aux difficultés de purifications rencontrées et d'identifier les produits au sein des sous-fractions non homogènes, une analyse en masse a été effectuée au moyen d'un Q-Exactive™, un spectromètre de masse de haute résolution (HRMS) de type ESI-Orbitrap couplé à une U-HPLC. Les molécules identifiées sont présentées dans le **Tableau 25** ci-dessous :

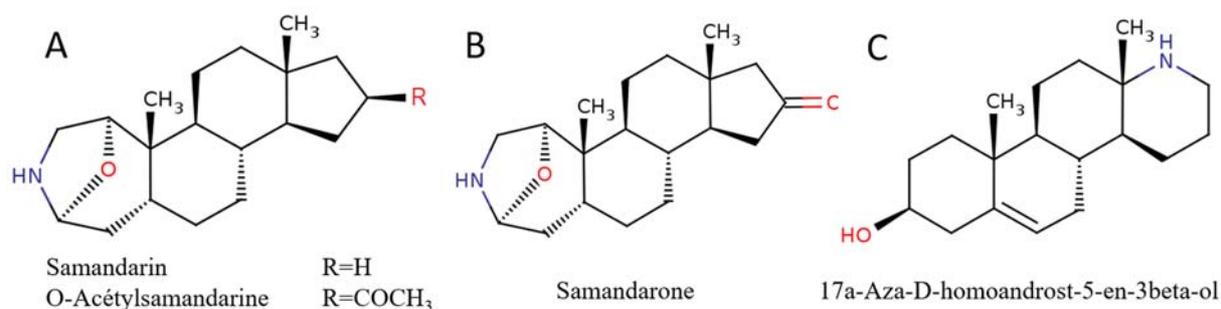
**Tableau 25 : Caractéristiques physicochimiques (masses, formules brutes) des molécules identifiées au sein des fractions F17.7, F19.6 et F21.8 du venin V234.**

«/» : absence d'identification de la molécule - \* molécules identifiées à partir de leurs masses et leurs formule brute sur la base de données METLIN.

Echantillon	[M <sup>H+</sup> ] <sub>exp</sub>	Formule brute	Molécule identifiées
F17.7	306,2424	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> N	Samandarin
	290,2474	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> ON	17a-Aza-D-homoandrost-5-en-3beta-ol*
	304,2267	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> N	Epoxy-3-aza-A-homoandrostan-16-one = samandarone
F19.6	306,2424	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> N	Samandarin
	348,2533	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> N	O-Acetylsamandarine*
	392,2791	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> O <sub>4</sub> N	/
	422,3257	C <sub>25</sub> H <sub>43</sub> O <sub>4</sub> N	/
	663,5088	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	/
F21.8	306,2424	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> N	Samandarin
	348,2533	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> N	O-Acetylsamandarine*

Le samandarin est une toxine stéroïde alcaloïde présent dans les 3 sous-fractions. Il est déjà connu pour son activité antibactérienne sur *B. subtilis* et *E. coli*<sup>475</sup>. La samandarone, présente dans la fraction F19.6 en plus du samandarin, a également été décrite pour les mêmes activités<sup>475</sup>.

La base de données METLIN permet d'identifier des molécules à partir de leurs masses et de leurs formules brutes. Le produit de masse  $[M+H]^+$  348,2533 Da et de formule brute  $C_{21}H_{33}O_3N$ , présent dans F19.6 et dans F21.8, pourrait être de l'O-Acétysamandarine ( $\Delta$ ppm = 1). L'O-acétysamandarine est un dérivé du samandarin qui ne semble pas être décrit comme ayant une activité antibactérienne. Il serait nécessaire de tester cette molécule seule, afin d'évaluer son pouvoir antibactérien.



**Figure 52 : Structure du Samandarin et de l'O-Acétysamandarine (A), de la Samandarone (B) et du 17a-Aza-D-homoandrost-5-en-3beta-ol (C).**

Quant au produit de masse  $[M+H]^+$  290,2474 Da et de formule brute  $C_{19}H_{31}ON$ , présent dans F19.6, ce pourrait être du 17a-Aza-D-homoandrost-5-en-3beta-ol ( $\Delta$ ppm = 1). Cette molécule possède une structure proche du samandarin et de ses dérivés : la samandarone et l'O-acétysamandarine (**Figure 52**). Par ailleurs, il aurait une activité antibactérienne, notamment contre *Streptococcus pneumoniae*, bactérie Gram + qui est un important agent pathogène chez l'homme (méningites, otites)<sup>479</sup>. Certaines masses et formules brutes obtenues n'ont pas pu être identifiées. L'utilisation d'autres bases de données est nécessaire.

Néanmoins, le produit de masse  $[M+H]^+$  422,3257 Da et de formule brute  $C_{25}H_{43}O_4N$  pourrait correspondre à un dérivé de l'Agelasine ( $\Delta$ ppm = 4). La formule brute de l'Agelasine est  $C_{26}H_{39}N_5$  et sa m/z de 422,3278. Elle appartient à la famille des Agelasines qui sont des dérivés de la purine isolées des éponges marines (*Agelas sp.*). Aujourd'hui plus d'une dizaine de ses molécules ont été identifiées. Ces molécules cytotoxiques et antimicrobiennes à large spectre, contribueraient à la protection des éponges marines contre les micro-organismes<sup>480,481</sup>.

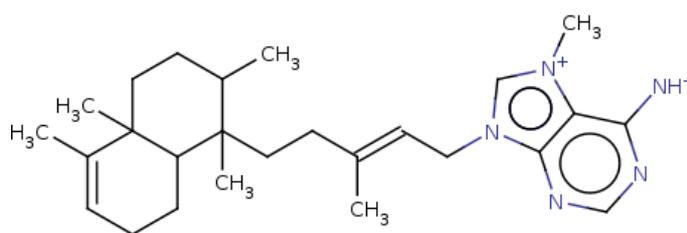


Figure 53 : Structure de l'Agelasin.

L'activité antibactérienne du venin de *S. salamandra* est probablement due au samandarin (présent dans l'ensemble des sous-fractions actives). Par ailleurs, certaines fractions contiennent plusieurs molécules ayant une activité antibactérienne.

## V.2. Etude de V81

Le venin V81 est un venin de scorpion. Les venins de scorpions sont riches en petites molécules neurotoxiques et antibactériennes. Une soixantaine de peptides antimicrobiens ont été isolés de ces venins tels que ceux de la famille des Opiscorpins, Pandinines ou Meucines<sup>362,482</sup>.

A 10 mg/mL, V81 est seulement actif contre *B. subtilis*. Les tests d'identification des molécules actives au sein de ce venin n'ont été effectués que sur cette souche bactérienne, selon la méthode en milieu liquide.

L'activité antibactérienne a été identifiée au sein de la fraction F2, éluée en début de gradient, à partir de laquelle deux sous-fractions ont été isolées : F2.0.3 et F2.3.

La sous-fraction F2.0.3 a été analysée au moyen d'un Synapt G2-S, une HRMS couplée à une UPLC. Les profils obtenus à 280 et 214 nm sont présentés dans la **Figure 54**:

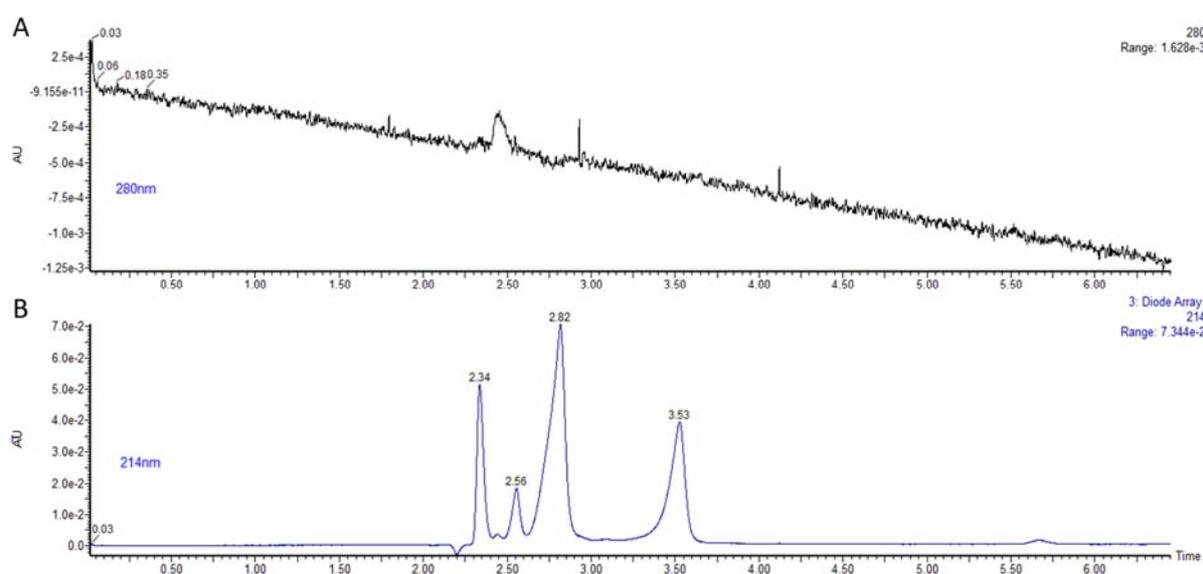
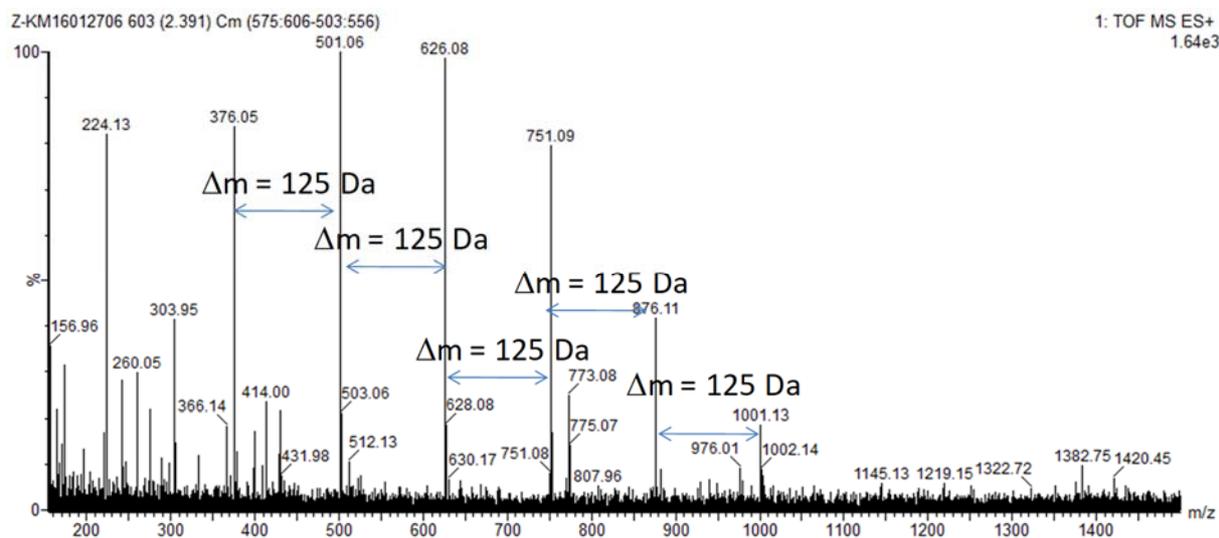


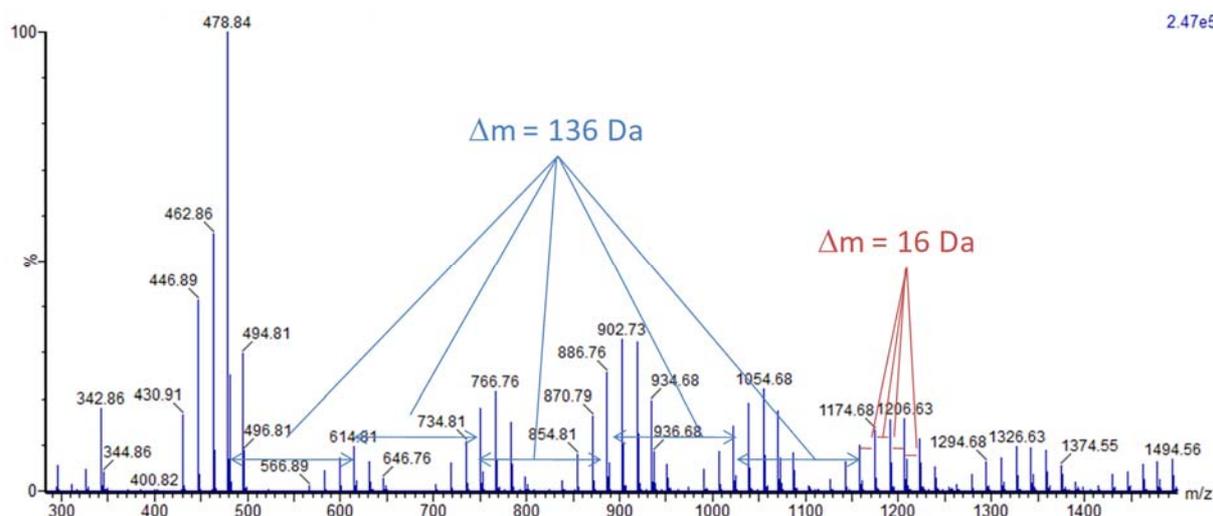
Figure 54 : Chromatogrammes de la fraction F2.0.3 à 280nm (A) et 214nm (B) obtenu par UPLC.

La sous-fraction F2.0.3 contiendrait quatre produits différents qui n'absorbent pas à 280nm.

Pour le pic élué à 2,34 minutes le spectre de masse obtenu permet d'observer une répétition de motifs de 125 Da (**Figure 55**). De même pour le produit élué à 2,56 minutes pour lequel des motifs de 136 et 16 Da sont répétés (**Figure 56**). Ces produits pourraient correspondre à des polymères d'origine naturelle.



**Figure 55 : Spectre de masse du produit élué à 2,34min. Spectre obtenu en mode positif (MS+).**



**Figure 56 : Spectre de masses MS+ du pic à 2,56min de la fraction F2.0.3 du venin V81.**

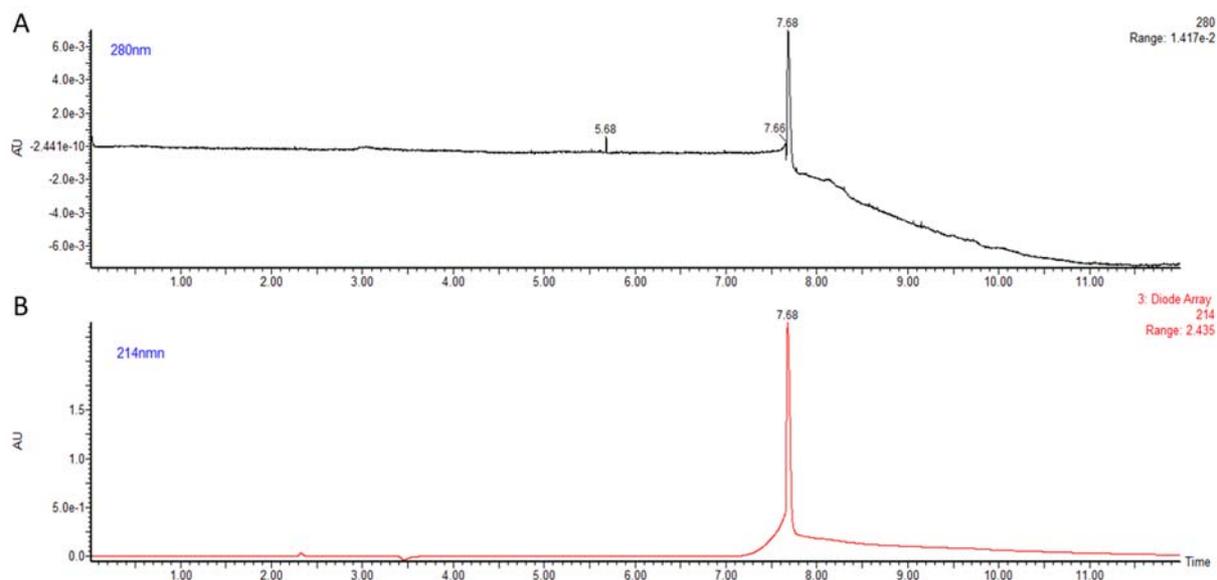
Concernant les deux pics suivants, Tr=2,82 et 3,53 minutes, les spectres obtenus sont très denses et difficiles à interpréter. Aucun ion moléculaire ne se distingue.

## PARTIE A :

### CHAPITRE II : RÉSULTATS & DISCUSSION

La deuxième sous-fraction identifiée et nommée F2.3. a également été analysée par UPLC/HRMS.

Le spectre de F2.3 montre que le produit est pur et qu'il absorbe à 214 et 280 nm (**Figure 57**).



**Figure 57 : Chromatogrammes de la fraction F2.3 à 280nm (A) et 214nm (B) obtenu par UPLC.**

Les ions 615 Da en MS<sup>+</sup> et 613 Da en MS<sup>-</sup> confirment qu'il s'agit bien du pic moléculaire (Cercles rouges - **Figure 58**). Le produit F2.3 aurait donc une masse molaire de 614 Da.

L'ion à 423,01 Da en MS<sup>+</sup> correspond à une perte de 192 Da par rapport à l'ion moléculaire. Cet ion 191 Da est retrouvé dans le spectre MS<sup>-</sup> (Cercle vert).

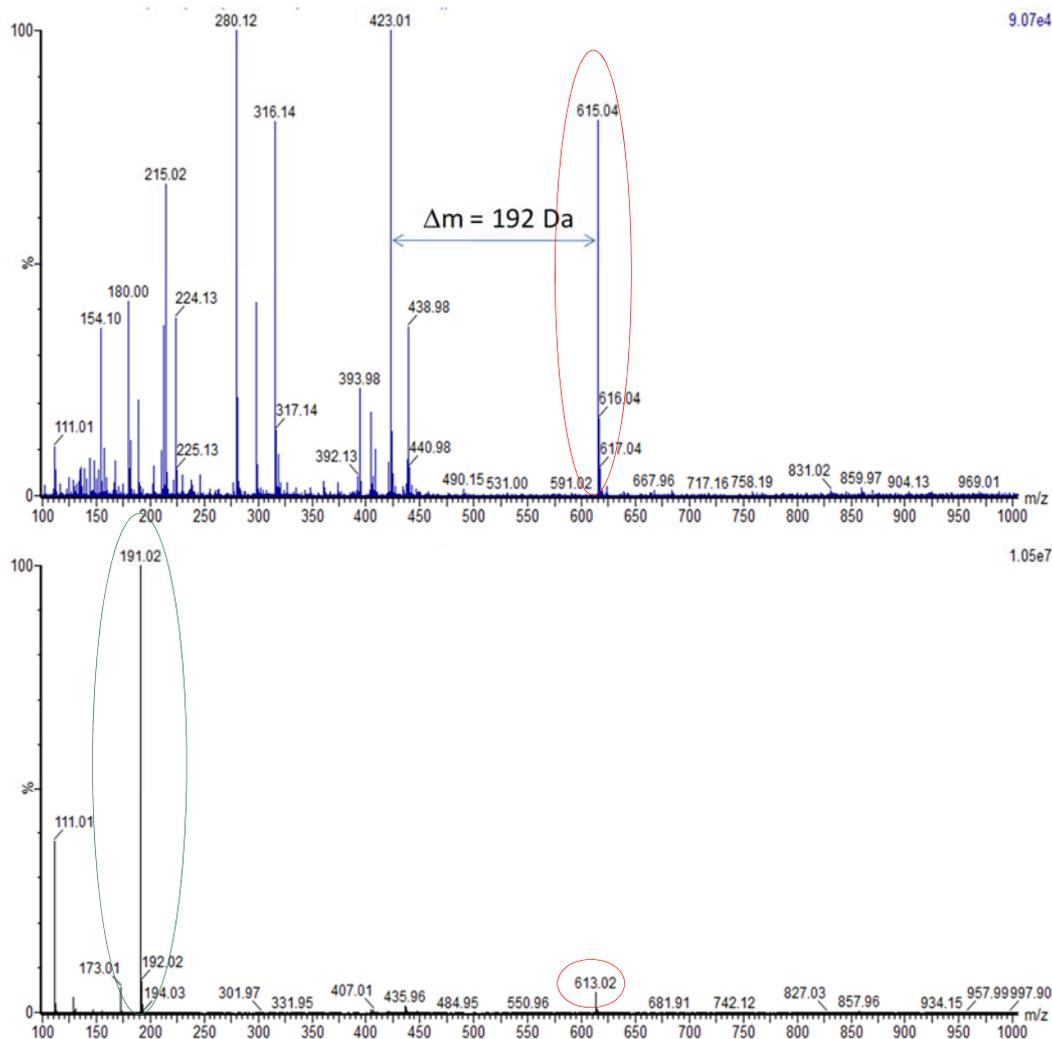


Figure 58 : Spectres MS+ (en haut) et MS- (en bas) de la fraction F2.3.

L'analyse par HRMS de l'ion 191 Da obtenu en MS- donne la masse exacte de 191,0195 Da et la formule brute  $C_6H_8O_7$  qui correspond à l'acide citrique.

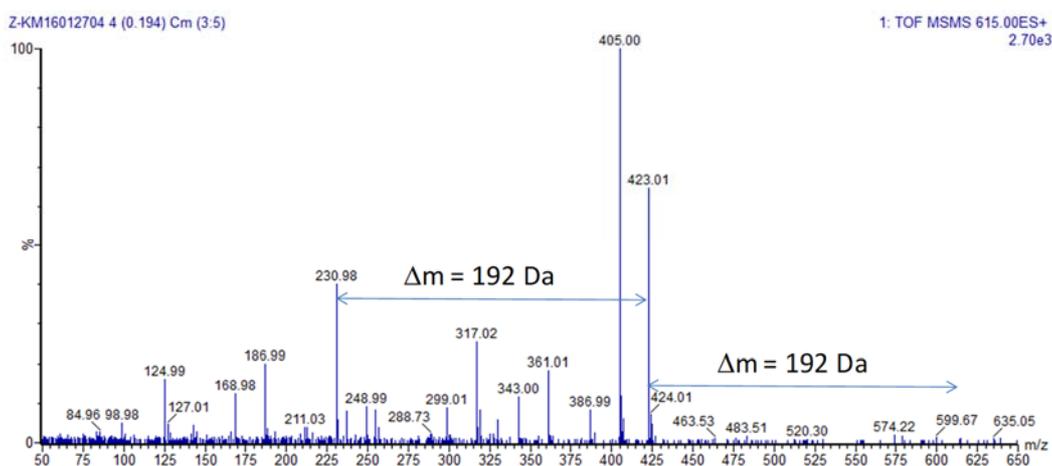


Figure 59 : Spectre de masse MS/MS de l'ion 615 Da.  
(Pic de 615Da obtenu en MS+ précédemment – cf. Figure 58).

L'analyse MS/MS de l'ion 615 Da obtenu en MS<sup>+</sup> montre deux pertes successives de 192 Da pour donner l'ion 231 (**Figure 59**). Le produit F2.3 de masse globale de 614 Da serait constitué de deux adduits citrate et d'une partie de 230 Da dont la structure est à déterminer.

Le citrate a été identifié comme étant l'acide organique libre majeur de nombreux venins de serpents et d'arthropodes. Présent entre 2% et 10% dans le venin de certains serpents, il représente entre 8 et 10% de certains venins d'*Apis mellifera*, 10% chez ceux de tarentules et 2% du venin de scorpion *Heloderma horridum*<sup>483,484</sup>. D'après Francis et al., le citrate présent dans les venins de serpents chélaterait les ions métalliques divalents, tels que Ca<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, requis par les toxines enzymatiques. Il pourrait ainsi représenter un mécanisme de protection important pour les serpents contre leur propre venin<sup>485,486</sup>. Il peut jouer le même rôle dans les venins d'arthropodes. Par ailleurs, l'acide citrique est connu pour son pouvoir antimicrobien, bien qu'il agisse selon un spectre étroit<sup>487-489</sup>. Cet acide organique traverserait la membrane bactérienne et libérerait des protons (H<sup>+</sup>) dans les bactéries entraînant leur mort. De plus, l'acide citrique est un agent acidifiant (pH 3,2 à 1mM). La croissance de nombreux organismes pathogènes est inhibée lorsque le pH du milieu est inférieur à 4,6<sup>489,490</sup>. La présence d'acide citrique dans le milieu extracellulaire pourrait ainsi limiter la croissance de *B. subtilis* suite à l'acidification du milieu de croissance. L'acide citrique présente également la capacité d'améliorer le pouvoir antimicrobien d'une large gamme d'antibiotiques (telle que la nisine). Un peu moins de 1% de citrate augmente considérablement la capacité des antibiotiques à tuer ou à inhiber une large gamme d'espèces bactériennes, y compris des souches résistantes aux antibiotiques<sup>488,491</sup>.

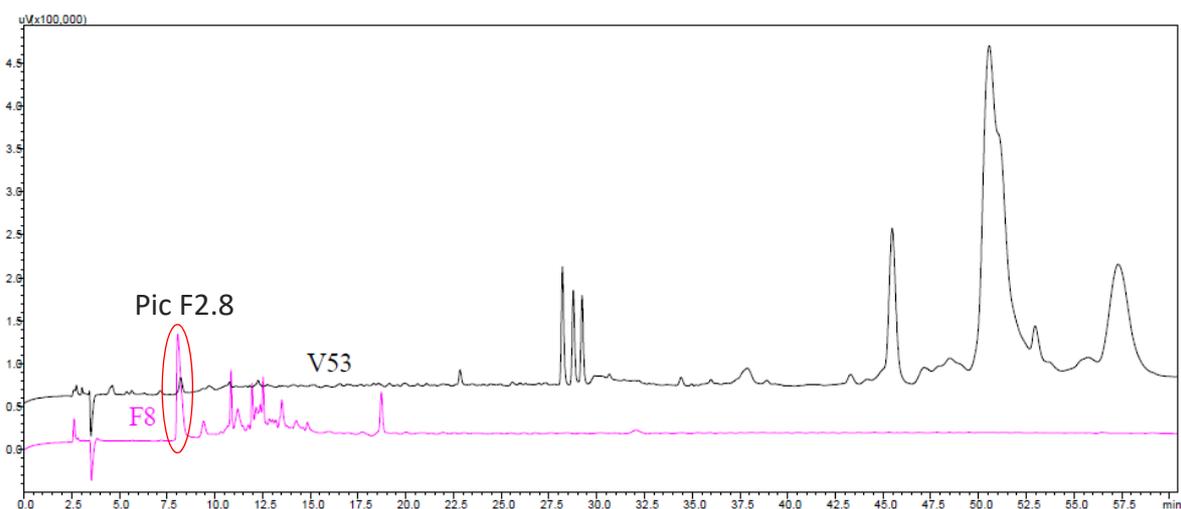
En général, les bactéries à Gram négatif tels que *P. aeruginosa* et *E. coli* sont plus sensibles à l'acide citrique que les bactéries à Gram positif. Les parois cellulaires très réticulées des bactéries à Gram positif réduiraient sa diffusion dans la cellule et limiteraient ainsi leur action antimicrobienne<sup>489,490,492</sup>. Cependant, V81 est seulement actif contre *B. subtilis*. Soit l'activité antibactérienne du produit F2.3 est portée par les adduits d'acide acétiques qui le composent, mais leur concentration est trop faible pour induire l'inhibition de souches Gram négatives, soit le produit de 231Da est inactif contre ces souches. Toutefois, cette activité est relative au venin entier. Un criblage du produit pur sur les souches Gram négatives et positives pourrait donner des résultats différents. Par ailleurs, il est nécessaire d'identifier la structure de la molécule de 230Da afin de le tester seul et de comparer son activité en présence d'un et deux adduits citrate.

Les perspectives pour ce venin sont de purifier de nouveau le pic F2.3, l'enrichir et séquencer la molécule pure isolée pour voir si elle est composée d'un ou plusieurs acides aminés (GGP/PGG/GPG ou NP = 229,095Da).

### V.3. Etude de V53

Concernant le venin V53, qui est un venin de serpent, il n'est actif que contre la croissance des souches pathogènes *S. aureus* et *P. aeruginosa* (à 1mg/mL). Les venins de serpents sont principalement composés de molécules de haut poids moléculaire. Environ 12% des PAMs isolés à partir d'animaux sont d'origines ophidienne.

La fraction F8 a été purifiée successivement jusqu'à l'identification du produit F8.2 (Figure 60).



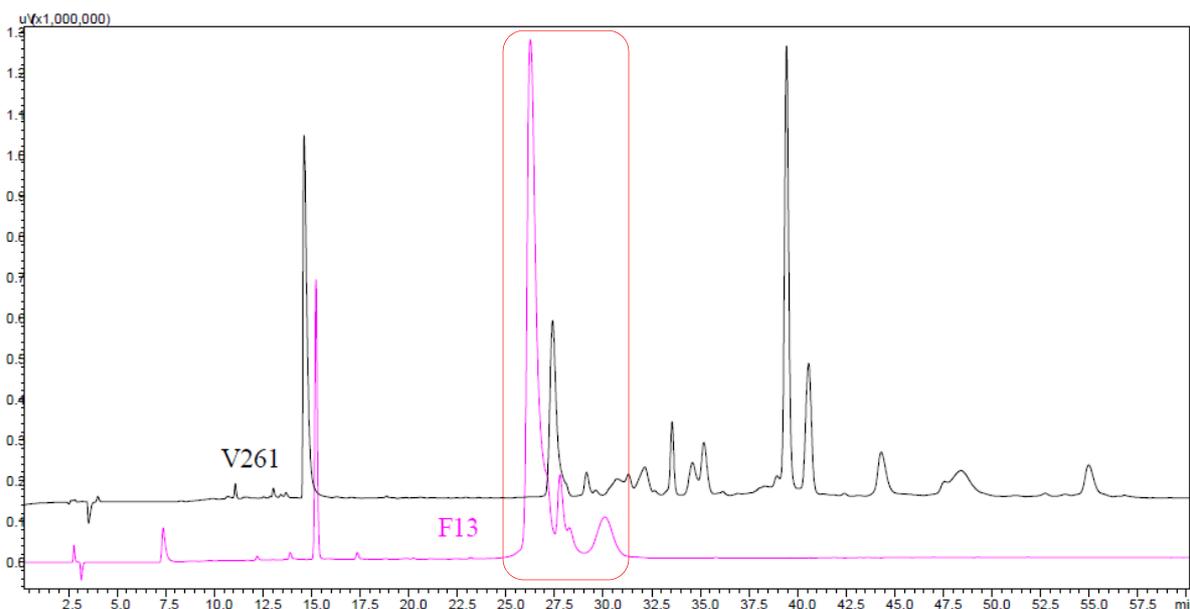
**Figure 60 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique C18 du venin V53 (en noir) et de sa fraction active, F8 (en rose).**

Le pic F2.8 (cercle rouge) correspondrait à la molécule support de l'activité antibactérienne de ce venin.

Il est nécessaire d'enrichir le produit F2.8, de vérifier sa pureté (en le passant sur d'autres phases chromatographiques) et de le caractériser physico-chimiquement.

#### V.4. Etude de V261

Le venin V261 est également un venin de serpent qui n'inhibe que la croissance des pathogènes (à 1 mg/mL). Pour ce venin, c'est la fraction F13 qui porte l'activité antibactérienne. D'après une analyse HPLC des fractions F12 et F14 inactives, la molécule active serait localisée entre 25 et 32 minutes d'éluion (rectangle rouge - **Figure 61**).



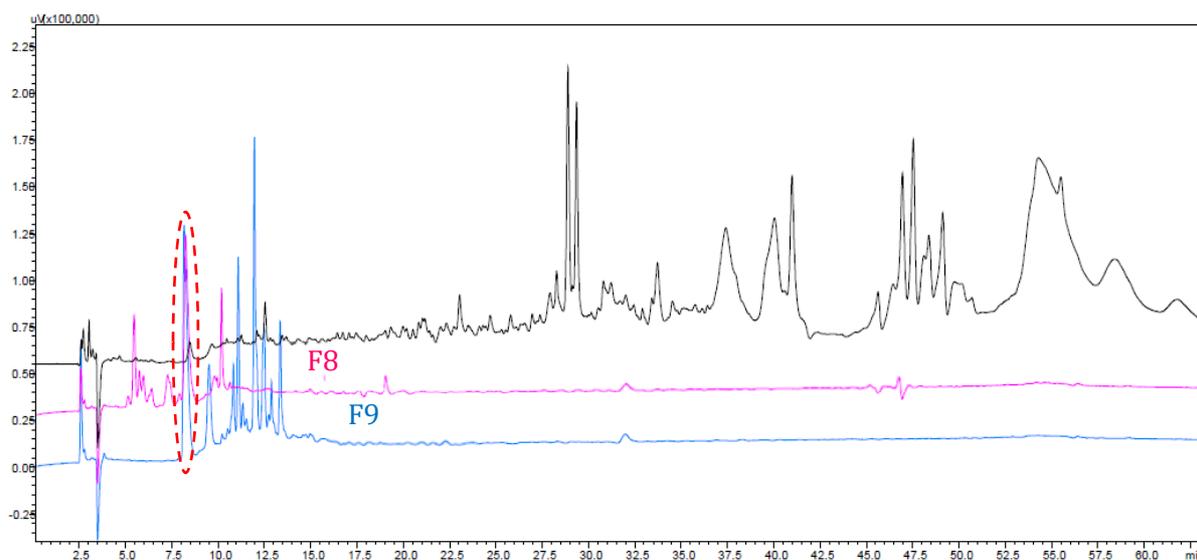
**Figure 61 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique C18 du venin V261 (en noir) et de sa fraction active, F13 (en rose).**

La zone d'intérêt à fractionner est encadrées en rouge.

**Les perspectives** pour ce venin sont de sous-fractionner la zone active d'intérêt afin d'isoler la ou les molécules antibactériennes.

### V.5. Etude de V139

Enfin, le venin de serpent V139 possède un large spectre d'activité antibactérien. Il inhibe la croissance de *B. subtilis*, *S. aureus* et *P.aeruginosa* à 1 mg/mL. Deux fractions antibactériennes ont été identifiées à partir de ce venin : F8 et F9. La fraction F9 est plus active que F8. La molécule active est probablement un pic commun aux deux fractions et présent en plus grande quantité dans F9 (cercle rouge pointillé).



**Figure 62 : Chromatogrammes obtenus par HPLC analytique C18 du venin V139 (en noir) et de ses fractions actives, F8 et F9 (en rose et bleu respectivement).**

La molécule potentiellement antibactérienne serait contenue dans le pic encerclé en rouge pointillé.

**Les perspectives** concernant ce venin sont de sous-fractionner ces fractions actives et en particulier isoler le pic commun à ses fractions pour vérifier ou non son effet antibactérien.



## CHAPITRE III : CONCLUSION & PERSPECTIVES

---

La résistance naturelle des bactéries et l'utilisation massive et excessive des antibiotiques dans les thérapies humaines et animales ainsi que dans différents domaines industriels ont entraîné la sélection de bactéries pathogènes résistantes à de multiples médicaments. Depuis les dernières décennies, la résistance aux antibiotiques conventionnels a limité les options thérapeutiques, entraînant une augmentation significative de la mortalité et de la morbidité dans les hôpitaux. Cette situation est particulièrement dramatique pour les bacilles à Gram négatif. En outre, depuis 1970, seules deux nouvelles classes d'antibiotiques, d'oxazolidinones (Linezolid, Pfizer) et de lipopeptides cycliques (Daptomycin, Cubiste) ont été mises sur le marché. Avec un large spectre d'activité et un mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les peptides antimicrobiens (PAMs), isolés à partir de sources naturelles, représentent une alternative originale pour remédier à ce problème de santé publique. Les venins constituent une source riche de substances pharmacologiquement actives uniques et novatrices, y compris les PAMs. L'objectif de notre sujet de recherche est ainsi d'identifier et de caractériser des molécules antibactériennes innovantes à partir de venins d'animaux. Les PAMs peuvent être synthétisés par voie chimique en quantité non limitante ce qui facilite leurs caractérisations physicochimiques et pharmacologiques. De plus ils peuvent être modifiés et améliorés afin d'obtenir une activité thérapeutique optimisée.

Pour ce faire, des venins d'animaux ont été criblés. Suite à l'identification des venins porteurs d'une activité antibactérienne, l'objectif était de localiser puis de caractériser la ou les molécules supports, capable(nt) de conférer au venin l'activité escomptée. Ceci a pu être réalisé grâce à des tests d'inhibition de croissance bactérienne en milieu liquide et solide, ainsi que des analyses HPLC alternées suivies par des méthodes de caractérisations physico-chimiques. Les molécules caractérisées ont ensuite été synthétisées et caractérisées pharmacologiquement.

Ainsi, l'activité antibactérienne d'environ 200 venins a été évaluée contre plusieurs souches bactériennes de références, non pathogènes et pathogènes. Ce criblage a été effectué selon deux techniques complémentaires : un test d'inhibition en milieu liquide et un autre en milieu solide. Les tests en milieu solide nous ont permis d'évaluer l'activité des échantillons trouvés inactifs en milieu liquide. Pour la majorité des venins le résultat obtenu en milieu liquide et solide est

le même, en revanche certains venins se sont avérés actifs dans un système et pas dans l'autre. La plupart des venins d'animaux contiennent des agents antibactériens à large spectre puisque plus de 60% des venins testés présentent une activité antibactérienne, la plupart contre les souches Gram + et Gram -. En outre, 40% sont aussi efficaces contre les souches pathogènes que non pathogènes.

Parmi l'ensemble des venins identifiés, celui de la guêpe sociale *Polistes gallicus* a été sélectionné pour son originalité et son activité antimicrobienne et antifongique à large spectre y compris contre des souches multirésistantes. Ce venin contient plusieurs molécules antibactériennes dont six PAMs purs ont été isolés et séquencés. Quatre de ses peptides appartiennent à la famille des mastoparans, la classe de peptide la plus abondante dans la famille des *Vespidae* dont fait partie *P. gallicus*. Deux d'entre eux, la Dominulin A et B, ont déjà été isolés à partir du venin de *Polistes dominula*, une espèce de guêpe sociale apparentée à *P. gallicus*. Ce sont des peptides antimicrobiens cationiques à large spectre de structure  $\alpha$ -hélicoïdale qui agissent par perforation de la membrane plasmique.

Les séquences des peptides nommés Gal1 et Gal3 correspondent à celles de la Dominulin A et B respectivement avec des modifications au niveau des lysines. Par ailleurs, des analyses par HRMS pourraient nous permettre d'identifier la structure de ces modifications.

Les peptides nommés Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) sont originaux. Ce sont également des peptides cationiques. Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>) appartiendrait également à la classe des mastoparans. Ce peptide cationique possède 93% d'identité avec la Dominulin B, il ne diffère que par une mutation GK en position 4. Quant à Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), il appartiendrait à la famille des peptides chimiotactiques, second groupe peptidique majeur de cette famille de guêpe. Ce peptide original présente néanmoins de fortes homologies (entre 75 et 83%) avec d'autres PAMs chimiotactiques présents dans le venin d'autres guêpes sociales tels que *Polistes-Protonectine*, *Polybia-CP*, *Protonectine* et *PPM3*.

Le peptide Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) a été synthétisé en phase solide (SPPS) et nommé sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>).

Le peptide **sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>)** présente un large spectre d'activité antibactérienne avec une efficacité plus importante pour les souches Gram positives. Il inhibe également des souches multirésistantes. Contrairement au venin de *P. gallicus*, il ne semble pas avoir d'activité

antifongique. Par ailleurs, il présente une forte hémotoxicité et donc de faibles indices thérapeutiques (IT compris entre 0,1 et 3,2).

Une étude de relation structure-activité a été initiée par synthèse chimique en phase solide afin d'obtenir un agent antimicrobien moins toxique tout en conservant ou améliorant son activité antibactérienne. Quatorze analogues de sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) ont ainsi été obtenus. Cette étude montre que l'isoleucine (I) et la lysine (K) sont des acides aminés essentiels à l'activité antibactérienne du peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Seuls les peptides possédant à la fois I et K à chacune de leur extrémité ont un effet antibactérien significatif, et ce contre plusieurs souches.

Deux analogues, sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), se sont montrés particulièrement intéressants. sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), plus court que le peptide parent, a été obtenu suite à la substitution de l'isoleucine à l'extrémité C-terminale par du tryptophane, plus hydrophobe, et celle de la lysine par l'arginine, plus polaire. La séquence de sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) est semblable en taille au peptide parent. En revanche, comparé à ce dernier et à ses analogues, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) n'est constitué que de 50% d'acides aminés hydrophobes et possède quatre charges positives contre 80-90% d'A.A. hydrophobes et une seule charge positive en moyenne pour les autres peptides respectivement.

Contrairement au peptide parent, **sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>)** semble avoir une activité spécifique contre les bactéries Gram positives. Il présente un large spectre d'action contre ces bactéries y compris des souches multirésistantes, mais agit selon une CMI deux à quatre fois plus élevée que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). Toutefois, 20 fois moins hémotoxique son indice thérapeutique est ainsi plus élevé (IT = 18 vs. IT<sub>sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>)</sub> = 1,6-3,2).

Le peptide **sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>)** présente un large spectre antibactérien. Il inhibe fortement la croissance des souches Gram – avec des CMI deux à trente fois plus faibles que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>). C'est l'analogue le plus actif contre les différentes souches Gram - testées avec des CMI comprises entre 3 et 50µM. Toutefois, c'est le seul analogue ayant une activité Gram +/Gram - qui n'inhibe pas la croissance de *S. aureus*. De plus, contrairement aux peptides sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) et sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>), le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) possède également une activité antifongique. Par ailleurs, il n'est pas hémotoxique contre les érythrocytes humains et présente donc des indices thérapeutiques élevés (IT > 800) même contre des souches Gram négatives multirésistantes (*P. aeruginosa* FQR : IT =200). Il présente donc un potentiel thérapeutique fort en particulier pour la lutte contre les souches Gram négatives multirésistantes pour lesquelles la situation est particulièrement dramatique.

En outre, ces peptides ne sont pas cytotoxiques aux doses actives ( $IC_{50} R_1W_8 = 1mM$  et  $IC_{50} I_1N_{11} =$  compris entre 1-2,5mM). L'ensemble de ses résultats montrent qu'ils sont sélectifs des membranes procaryotes. Contrairement au peptide sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), ils n'ont pas ou peu d'affinité pour les phospholipides des membranes eucaryotes. En revanche, ils s'insèrent fortement dans ceux des membranes procaryotes.

Ces peptides sont bactéricides ( $CMB \leq 2 \times CMI$ ). Les résultats préliminaires de l'étude du mécanisme d'action suggèrent qu'ils agissent contre les bactéries par perméabilisation de leur membrane cytoplasmique et ce, en quelques minutes. En outre, sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) semble avoir un autre mode d'action. Moins perméabilisant que sGal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>) contre les bactéries Gram négatives, il est pourtant plus actif.

Les venins constituent donc une source riche de molécules antibactérienne, tels que les PAMs. L'étude du venin de guêpe *P. gallicus* nous a permis d'identifier et d'isoler des PAMs naturels. Présentant un large spectre d'activité mais une forte hémotoxicité, ils ont été utilisés comme support pour la conception de PAMs innovants plus sûrs. Les analogues synthétiques de Gal1(I<sub>1</sub>L<sub>12</sub>), sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), pourront être utilisés comme molécules antibactériennes ou servir de modèles pour l'élaboration de nouveaux agents antimicrobiens. Avec un large spectre d'activité antimicrobienne et une absence de toxicité contre les érythrocytes humains, le peptide sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) possède en particulier un excellent potentiel thérapeutique. Non cytotoxiques contre les kératinocytes humains, ils peuvent également être utilisés en application topique. Ainsi, ces peptides peuvent avoir un impact dans le domaine de l'antibiothérapie, ainsi que dans ceux de la cosmétique et de la dermatologie (savon, crème,...). Ils pourraient également être utilisés dans le domaine de l'hygiène comme agent de surface, détergent ou agent antibactérien dans les lessives basses températures, ou même comme conservateurs.

Toutefois le champ de recherche et de caractérisation de ces peptides reste vaste. L'OMS a récemment publié une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. L'activité de sGal1(R<sub>1</sub>W<sub>8</sub>) et sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>) pourrait être évaluée contre ces souches. Les biofilms étant liés à la résistance aux antibiotiques, l'évaluation de leur effet anti-biofilm pourrait également être envisagée.

Par ailleurs, bien que ces peptides semblent agir par perméabilisation des membranes cytoplasmique bactériennes, leur mode d'action est mal connu. L'évaluation de la

perméabilisation membranaire au moyen d'IP nous a permis de déterminer l'effet de nos PAMs sur l'intégrité des membranes de manière indirecte. Pour déterminer leur influence sur la membrane directement, la microscopie électronique à balayage (SEM) ou confocale pourrait nous permettre d'examiner les changements morphologiques induits par nos PAMs sur les bactéries et les cellules. Par ailleurs, l'utilisation de N-phenyl-1-naphthylamine permettrait de visualiser leur effet sur la membrane externe des bactéries Gram -. Pour connaître leur effet au niveau cytoplasmique, un test de liaison à l'ADN (DNA-binding) pourrait être réalisé afin d'évaluer leur interaction avec les génomes procaryotes et eucaryotes étudiés.

Malgré leur caractère bactéricide et perméabilisant des membranes, il sera important de voir si les bactéries peuvent développer une résistance contre ces peptides. En outre, l'évaluation de leur affinité pour les protéines sériques sera nécessaire.

Ayant des IT intéressants, surtout sGal1(I<sub>1</sub>N<sub>11</sub>), ces peptides pourraient être administrés par voie parentérale. Des expérimentations *in vivo* devront être réalisées avec des études de pharmacocinétique-pharmacodynamique. L'efficacité des peptides, leur stabilité, leur biodisponibilité pourront être évaluées dans ces conditions et des optimisations pourront être réalisées pour améliorer ces paramètres (*e.g.* encapsulation).

Utilisés seuls ou en synergie avec d'autres PAMs, antibiotiques ou peptido-mimétiques, ces peptides pourront être améliorés et optimisés tout au long du processus de R&D

Enfin, les possibilités de découverte d'autres molécules innovantes sont nombreuses. En effet, les mêmes études et perspectives de recherches peuvent être réalisées avec le peptide Gal2(I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>). Appartenant à la famille des mastoparans, ce peptide pourrait également agir par perméabilisation des membranes. Des dérivés efficaces et non toxiques sont à concevoir. En outre, le venin de *P. gallicus* semble contenir d'autres molécules antibactériennes qui sont à isoler et à caractériser. De nombreux autres venins sont également en cours d'étude témoignant de la richesse et de l'ampleur de ce sujet de recherche. De nouvelles méthodes de purification pourraient être envisagées pour identifier ces molécules telles que la FPLC (chromatographie d'exclusion ou d'affinité) ou des colonnes en phase normale pour isoler des agents antibactériens plus hydrophiles couplées à des techniques hautes résolutions pour leur caractérisation physico-chimique.



---

## - PARTIE B -

# Les venins : de nouvelles sources de ligands des canaux sodium dépendants

---

<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>177</b>
I. LES CANAUX SODIQUES VOLTAGE DEPENDANTS.....	<b>177</b>
II. STRUCTURE DES CANAUX $Na_v$ .....	<b>178</b>
III. ROLE PHYSIOLOGIQUE.....	<b>179</b>
IV. TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX $Na_v$ .....	<b>180</b>
V. MEDICAMENTS INTERAGISSANT AVEC LES CANAUX $Na_v$ .....	<b>181</b>
VI. ETUDE DE LA REPONSE FONCTIONNELLE DES CANAUX $Na_v$ .....	<b>182</b>
<b>CHAPITRE II : RESULTATS &amp; DISCUSSION</b> .....	<b>183</b>
I. UTILISATION DE LIGNEES CELLULAIRES EXPRIMANT LES CANAUX $Na_v$ POUR LA RECHERCHE DE NOUVEAUX LIGANDS. .....	<b>183</b>
I.1. CARACTERISATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE GH3B6.....	<b>183</b>
I.2. METHODE D'ETUDE DE LA REPONSE FONCTIONNELLE DES CANAUX $Na_v$ .....	<b>185</b>
II. CRIBLAGE DES VENINS INHIBITEURS DES CANAUX $Na_v$ A L'AIDE DE LA SONDE FURA-2 SUR LES CELLULES GH3B6.... .....	<b>186</b>
II.1. CONTROLES INTERNES DE LA MANIPE .....	<b>186</b>
II.2. TESTS DES VENINS ENTIERS.....	<b>187</b>
II.3. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V114 .....	<b>190</b>
II.4. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V16.....	<b>194</b>
II.5. IDENTIFICATION DE LA MOLECULE INHIBITRICE DES CANAUX $Na_v$ SUR LES CELLULES GH3B6 A PARTIR DU VENIN V118 .....	<b>198</b>
III. CRIBLAGE DES VENINS ACTIVATEURS DES CANAUX $Na_v$ A L'AIDE DE LA SONDE FURA-2 SUR LES CELLULES GH3B6 .. .....	<b>201</b>

<b>CHAPITRE III : CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>205</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>241</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>289</b>

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

---

Les venins sont des sources naturelles de peptides antimicrobiens et autres molécules anti-infectieuses. L'étude des molécules responsables de la toxicité des venins a conduit à la caractérisation de ligands de canaux ioniques et de récepteurs membranaires tels que l'alphabungarotoxine de venin de serpent active sur les récepteurs nicotiniques et les toxines d'araignées ou de scorpion actives sur des canaux ioniques<sup>493-495</sup>. La richesse des venins et l'importance physiologique des canaux ioniques sont des promesses de développement d'autres molécules d'intérêt thérapeutiques pour traiter des maladies non-infectieuses, telles que les maladies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques membranaires, encore appelées canalopathies ou maladies des canaux<sup>27,31,56</sup>. Certains venins peuvent contenir des molécules capables de se lier avec une haute affinité aux canaux sodium dépendants du potentiel (canaux  $\text{Na}_v$ ). En perturbant le fonctionnement de ces canaux, elles altèrent la genèse du message nerveux et par conséquent, elles peuvent affecter les fonctions de locomotion, respiratoires, cardiaques et neurophysiologiques.

### I. Les canaux sodiques voltage dépendants

Les canaux  $\text{Na}_v$  appartiennent à la grande famille de protéines membranaires formant des canaux ioniques dépendants du potentiel ou canaux ioniques dépendant du potentiel<sup>496</sup>. Les canaux  $\text{Na}_v$  sont des déterminants moléculaires de l'excitabilité cellulaire qui permettent de modifier le potentiel de la membrane cellulaire en contrôlant le flux de  $\text{Na}^+$  entre les milieux intra- et extracellulaire. Ils sont essentiels à l'initiation et à la propagation de signaux électriques (potentiels d'action ou PA) dans des cellules excitables<sup>497</sup>. Les canaux  $\text{Na}_v$  sont des acteurs moléculaires importants dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'excitabilité neuronale, la contractilité musculaire et la rythmicité cardiaque. Ils représentent ainsi des cibles thérapeutiques validées pour la recherche de nouveaux ligands pouvant être développés comme médicaments innovants contre de nombreuses pathologies telles que les épilepsies, les cardiopathies ou les pathologies de la douleur. Ceci a conduit au développement de médicaments inhibiteurs des canaux de  $\text{Na}_v$  comme les antiépileptiques (*e.g.* carbamazépine), antiarythmiques (rinulazole) et anesthésiques locaux (lidocaïne, xylocaïne)<sup>498-501</sup>.

## II. Structure des canaux $\text{Na}_v$

Les canaux  $\text{Na}_v$  sont des glycoprotéines membranaires hétéromultimériques composés d'une grande sous-unité  $\alpha$  formant le pore associée à une ou deux sous-unités auxiliaires  $\beta$ <sup>502,503</sup>. La famille des canaux  $\text{Na}_v$  compte neuf isoformes de sous-unités  $\alpha$  ( $\text{Na}_v1.1$  à  $\text{Na}_v1.9$ ) qui sont caractérisés pharmacologiquement par leur niveau de sensibilité à la tétrodotoxine (TTX). La TTX, toxine alcaloïde naturelle trouvée dans la chair de certains poissons mais également dans la peau de *Dendrobates*, est le ligand de référence des canaux  $\text{Na}_v$ <sup>501,504,505</sup>. Cette toxine bloque ou inhibe de façon très sélective tous les canaux  $\text{Na}_v$  en interagissant de façon réversible avec le pore extracellulaire des canaux  $\text{Na}_v$ . D'un point de vue physiologique, les conséquences de cette inhibition sont un arrêt de la propagation des influx nerveux et une paralysie mortelle, car cela peut affecter le fonctionnement du cœur et du diaphragme<sup>506</sup>.

Le degré de sensibilité à la TTX des sous-types de canaux  $\text{Na}_v$  a été utilisé pour les diviser en deux classes : six isoformes sensibles ou TTX-S ( $\text{CI}_{50} \sim 1-10$  nM) et trois isoformes résistants ou TTX-R ( $\text{CI}_{50} \sim 5-50$   $\mu\text{M}$ ) (**Tableau 26**).

**Tableau 26 : Distribution et classification des différents isoformes des canaux  $\text{Na}_v$  en fonction de leur sensibilité à la TTX.**

SNC et SNP = Système Nerveux Central et Périphérique

Sous-unités $\alpha$	Gène	Expression dans les tissus	Sensibilité à la TTX
$\text{Na}_v1.1$	SCN1a		
$\text{Na}_v1.2$	SCN2a	SNC, SNP	TTX-S
$\text{Na}_v1.3$	SCN3a		
$\text{Na}_v1.4$	SCN4a	Muscle squelettique	
$\text{Na}_v1.5$	SCN5a	Muscle cardiaque	TTX-R
$\text{Na}_v1.6$	SCN8a	SNC, SNP	
$\text{Na}_v1.7$	SCN9a	SNP	TTX-S
$\text{Na}_v1.8$	SCN10a		
$\text{Na}_v1.9$	SCN11a	SNP	TTX-R

### III. Rôle physiologique

Les canaux  $Na_v$  sont responsables de l'initiation et de la propagation des PA, caractéristique physiologique importante des cellules excitables<sup>507,508</sup>.

Dans le cœur, l'activation des canaux  $Na_v$  permet la genèse de PA cardiaques essentiels à l'activation des canaux calciques. Le flux calcique intracellulaire généré permet la contraction cardiaque. Il en est de même au niveau des muscles striés squelettiques. Les canaux  $Na_v$  sont des éléments essentiels aux phénomènes ioniques liés à la contraction du muscle cardiaque et la rythmicité de celle-ci.

Par ailleurs, au niveau des neurones, il n'y a pas de propagation des PA si les canaux  $Na_v$  sont inactifs<sup>501,508</sup>. Or, les PA sont essentiels à l'excitation des cellules nerveuses et à la libération des neurotransmetteurs impliqués dans la communication neuronale<sup>509</sup>. Le PA constitue l'unité de base du message nerveux. L'activation des canaux  $Na_v$  permet de déclencher des successions de PA ou train de PA dont la fréquence code le message nerveux. Leurs propriétés biophysiques (activation, inactivation) influencent la forme et la fréquence des PA.

Les troubles neurologiques les plus fréquents, tels que l'épilepsie, la migraine, les maladies neurodégénératives et les douleurs neuropathiques, sont associés à des anomalies de l'excitabilité neuronale<sup>510</sup>. Celles-ci sont principalement déterminées par l'expression ou la fonction anormale des canaux  $Na_v$ . En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de ces canaux permet de traiter les épilepsies, les arythmies cardiaques ou les troubles de la nociception<sup>497</sup>.

L'étude de canalopathies liées aux canaux  $Na_v$  a permis de mieux comprendre et d'identifier les rôles physiologiques des différentes sous-unités  $\alpha$ .

Les sous-types  $Na_v1.1$  et  $Na_v1.2$  ont un lien génétique avec l'épilepsie et les troubles liés au SNC, tandis que  $Na_v1.5$  a une relation avec les arythmies cardiaques.  $Na_v1.4$  est essentiel à la contraction musculaire, sa mutation entraînant des paralysies périodiques. Quant au canal  $Na_v1.6$ , il a été associé à une atrophie cérébelleuse, des déficits comportementaux et une ataxie<sup>497,511</sup>. En raison de leur expression différente et de leur présence dans les neurones sensoriels chez les humains et les animaux  $Na_v1.3$ , 1.7, 1.8 et 1.9 sont intéressants pour leur rôle potentiel dans la transmission de la douleur<sup>512,513</sup>. Le canal  $Na_v1.7$  a notamment été décrit pour son rôle comme facteur clé de la perception de la douleur chez l'homme. La perte de fonction de  $Na_v1.7$

entraîne une indifférence congénitale à la douleur<sup>514,515</sup>. Ces canaux constituent ainsi une cible pour la recherche d'antidouleur, en particulier les canaux Nav1.7, 1.8 et 1.9 exprimés uniquement au niveau du SNP<sup>516,517</sup>. Cependant, des études récentes ont montré que ce ne sont pas les seules isoformes impliqués dans la nociception. Par exemple, celles réalisées au moyen d'une toxines d'araignées ont montré que les canaux Nav1.1 jouent un rôle dans la régulation de l'excitabilité des fibres nerveuses sensorielles qui transmettent la douleur mécanique<sup>518</sup>.

La douleur joue une fonction physiologique cruciale en prévenant le corps des dommages aux tissus imminents ou réels, empêchant tout dégât supplémentaire et aidant le processus de guérison. En revanche, la douleur neuropathique, résultant d'une blessure ou d'un dysfonctionnement du système nerveux, peut constituer un problème médical grave et particulièrement difficile à traiter. Les douleurs neuropathiques sont liées à une hyperexcitabilité anormale dans les voies nociceptives<sup>510,519,520</sup>. Les neurones nocicepteurs des racines dorsales expriment au moins cinq isoformes (Nav1.1, et Nav1.6 à Nav1.9)<sup>521</sup>. Ainsi pour traiter la douleur de manière spécifique, il faudrait des molécules capables de cibler ces canaux et non les canaux Nav1.5, présents au niveau du cœur, et Nav1.4, présents au niveau des muscles.

#### IV. Toxines actives sur les canaux Nav

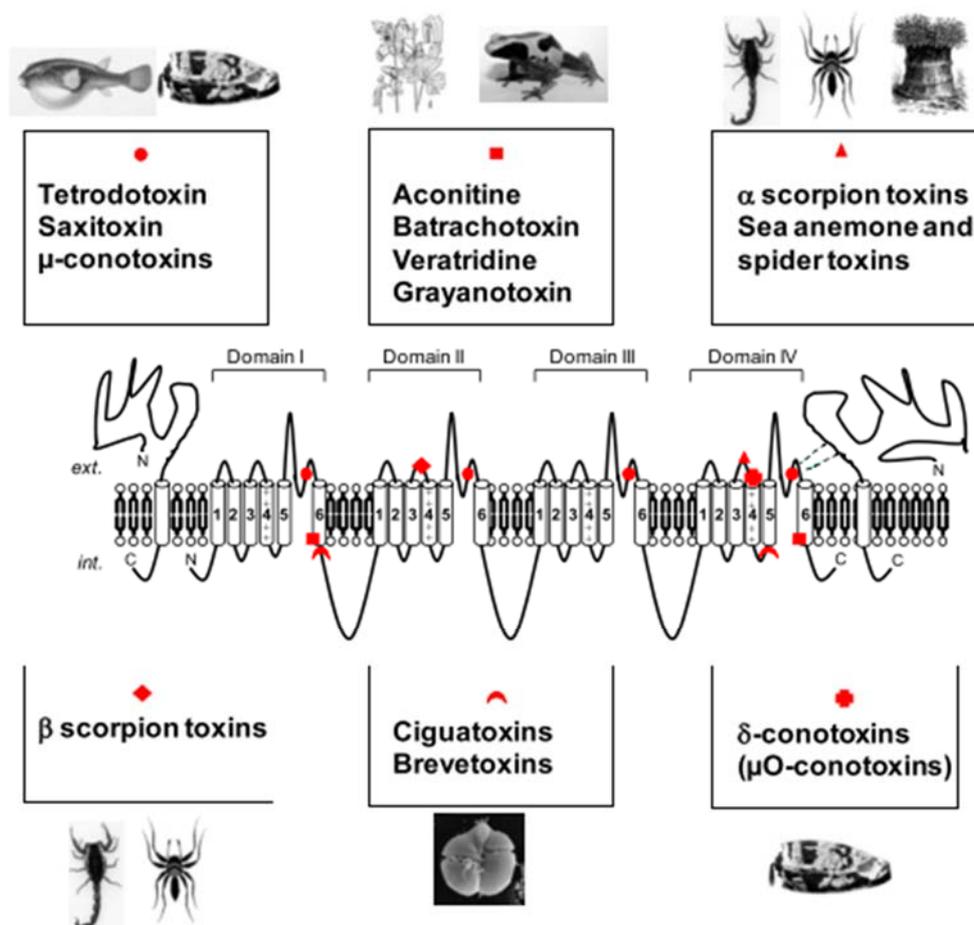
Il existe de nombreuses toxines, agents pharmacologiques et médicaments qui interagissent avec les canaux Nav et altèrent leur fonctionnement.

Un certain nombre de toxines naturelles du monde végétal et animal sont connues pour exercer leurs effets sur les canaux Nav (**Figure 63**).

La TTX, par exemple, est une neurotoxine qui obstrue physiquement le pore extracellulaire du canal et bloque ainsi le courant ionique<sup>522</sup>. Au contraire, d'autres toxines telles que la vératridine<sup>36</sup> (VTD) inhibe l'inactivation du canal, le bloquant en conformation ouverte<sup>508</sup>. Ces molécules pourraient être considérées comme des agonistes partiels des canaux Nav. Ces toxines sont très utilisées pour étudier la fonction des canaux Nav dans des fonctions physiologiques.

---

<sup>36</sup> Alcaloïde polycyclique extrait de la famille *Liliaceae* qui fonctionne comme une neurotoxine en entraînant une activation persistante des canaux Nav.



**Figure 63 : Topologie moléculaire des sites de liaison de différentes toxines d'origine naturelle sur la sous-unité du canal  $Na_v$ .**

Six sites différents qui présentent une grande affinité pour les neurotoxines d'origine animale, végétale ou microbienne sont représentés (symboles rouges) <sup>506</sup>.

Les venins constituent des sources riches de toxines qui modulent l'activité de ces canaux. Une variété de toxines de nature peptidique a été isolée à partir de venins d'araignée, de cônes marins, de scorpions et de centipèdes (**Figure 63**) <sup>522</sup>.

## V. Médicaments interagissant avec les canaux $Na_v$

Les canaux  $Na_v$  ont été impliqués comme cibles biologiques pour certains médicaments antiarythmiques (mexilétine, flécainide, lidocaïne), anticonvulsifs (carbamazépine, phénytoïne, lamotrigine, topiramate) et anesthésiques locaux (lidocaïne, xylocaïne, procaïne, antidépresseurs tricycliques, fluoxétine), ainsi que pour la recherche de pesticides <sup>501,508,510,523</sup>.

Ces médicaments, dits de première génération, agissent préférentiellement sur des cellules surstimulées réduisant ainsi les effets secondaires indésirables. Cependant, ils bloquent les canaux sodium de manière peu sélective et modulent également l'activité d'autres canaux ioniques. Par ailleurs, les indices thérapeutiques limités observés avec ces médicaments ont exigé une nouvelle génération d'inhibiteurs des canaux  $\text{Na}_v$ <sup>497</sup>. Pour ces raisons, la recherche de nouveaux ligands plus sélectifs et spécifiques est très active et représente des enjeux importants dans le domaine pharmacologique<sup>521</sup>.

## VI. Etude de la réponse fonctionnelle des canaux $\text{Na}_v$

Les techniques biochimiques, de biologie moléculaire et d'immunohistochimie ont permis de réaliser des caractérisations moléculaires et de distribution tissulaire des canaux  $\text{Na}_v$ . Pour des études fonctionnelles, la méthode la plus utilisée est l'électrophysiologie. Cette technique basée sur le principe du potentiel imposé (« Voltage-clamp », en anglais) permet d'analyser les courants qui se développent au cours de l'activation des canaux ioniques, de déterminer leur sélectivité ionique, leur conductance (capacité à faire passer des ions) et le changement de conformation. Pour des études pharmacologiques ou de relation structure-fonction, les canaux  $\text{Na}_v$  peuvent être exprimés spécifiquement dans un système hétérologue (cellules de mammifères ou ovocyte de xénope) et se prêter à des caractérisations électrophysiologiques. Toutefois, ces technologies sont relativement lourdes à mettre en place et requièrent un savoir-faire qui les rend inadaptables au criblage à haut débit de nouveaux ligands<sup>524,525</sup>.

L'utilisation de lignées cellulaires exprimant naturellement des isoformes de canaux  $\text{Na}_v$  permet la mise en place rapidement de tests *in vitro* à plus ou moins haut débit pour le criblage de banques de composés ou de mélanges complexes tels que des extraits de venin. Ceci est associé à un test cellulaire qui permet le suivi de la réponse fonctionnelle des canaux  $\text{Na}_v$  après contact avec ces banques de composés.

## CHAPITRE II : RESULTATS & DISCUSSION

---

### I. Utilisation de lignées cellulaires exprimant les canaux Nav pour la recherche de nouveaux ligands

Afin d'identifier et d'isoler de nouveaux ligands des canaux Nav à visée thérapeutiques, un test de criblage a été mis au point par le Pr. Legros et son équipe au sein du laboratoire BNMI à Angers.

Bien que l'étude des modes d'actions des molécules agissant sur les canaux Nav est principalement réalisée grâce aux techniques électrophysiologiques, ces dernières ne sont cependant pas adaptées au criblage à haut débit de nouvelles molécules thérapeutiques.

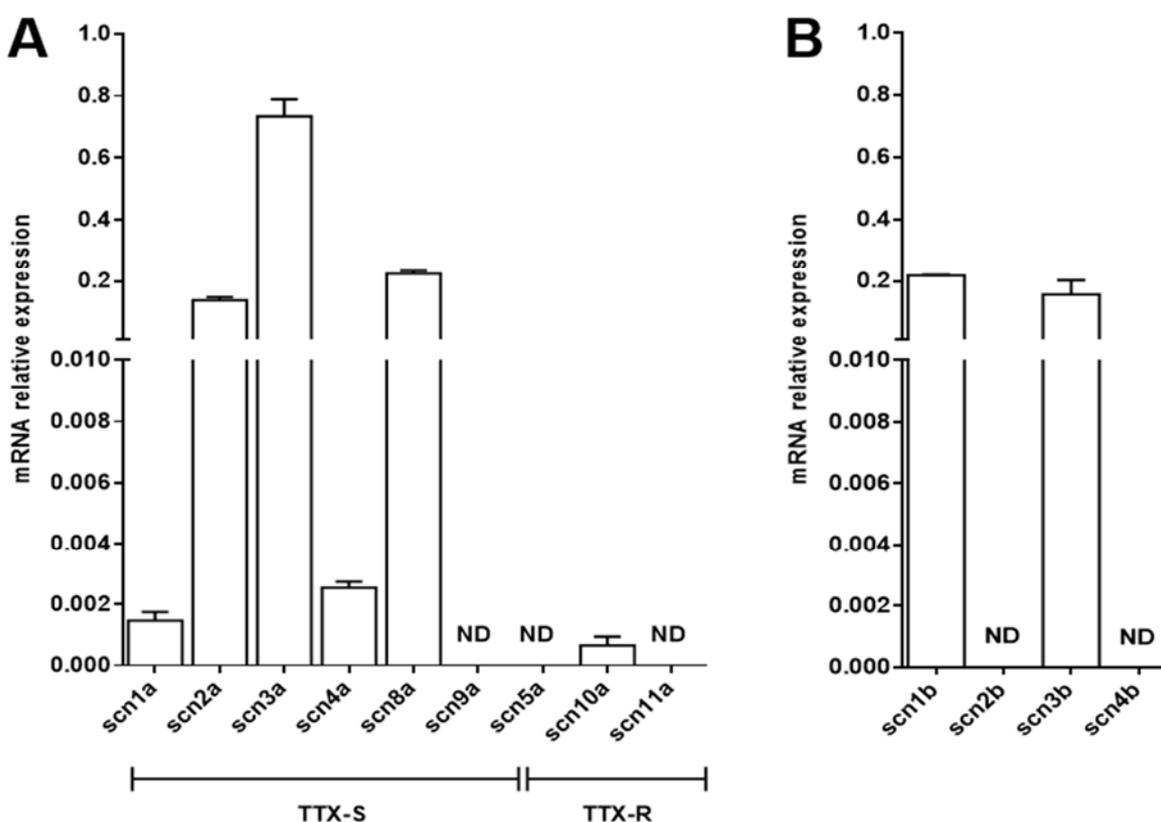
L'utilisation de lignées cellulaires exprimant des isoformes de canaux Nav permet la mise en place de tests à plus ou moins haut débit pour le criblage de banques de composés ou de mélange complexes tels que les venins. Les canaux Nav s'expriment bien dans les lignées cellulaires telles que les HEK293, mais la construction de lignées stabilisées est longue, coûteuse et difficile<sup>526-528</sup>. De plus, la surexpression des canaux dans ces cellules peut induire un biais lors des criblages et conduire à l'identification de toxines peu actives. Pour pallier ces inconvénients, il est possible d'utiliser des lignées immortalisées exprimant naturellement des isoformes de canaux Nav. Un des avantages de ces lignées est qu'elles expriment les canaux Nav accompagnés de leurs sous-unités auxiliaires et qu'elles sont souvent faciles à cultiver. Parmi ces lignées, il existe les cellules tumorales hypophysaire de rat GH3. Ce sont des cellules de mammifères excitables, traditionnellement utilisées comme systèmes modèles pour des études sur la biophysique et la pharmacologie des canaux Nav. En effet, cette lignée cellulaire dérivée de l'hypophyse du rat, présente une excitabilité électrique similaire à celle des cellules neuronales<sup>529-531</sup>.

#### I.1. Caractérisation de la lignée cellulaire GH3b6

C'est avec le sous-clone GH3b6 que nos expériences ont été réalisées. Une étude de caractérisation de ces cellules a été effectuée par qrt-PCR afin d'identifier les isoformes de

canaux  $Na_v$  exprimées dans les conditions de culture utilisées et de s'assurer qu'elles conviennent pour la réalisation de l'étude.

Les résultats de la qrt-PCR (**Figure 64**), indiquent que les cellules GH3b6 expriment majoritairement le gène *snc3a* qui code pour l'isoforme  $Na_v1.3$  ainsi que d'autres gènes, *snc8a* et *snc2a*, codant pour  $Na_v1.6$  et  $Na_v1.2$  respectivement. Ce sont des isoformes exprimées dans le Système Nerveux central et Périphérique (SNC et SNP) qui sont sensibles à l'action de la tétrodotoxine (TTX-S). En revanche, ces cellules n'expriment pas ou à de très faibles niveaux les isoformes  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$ . En ce qui concerne les sous-unités auxiliaires, seules les sous-unités SNC1b ( $\beta_1$ ) et SNC3b ( $\beta_3$ ) sont détectées.



**Figure 64 : Profil d'expression des isoformes de canaux  $Na_v$  des cellules GH3b6.**

Il a été établi par qrt-PCR. Les données sont significatives de l'expression relative de l'ARNm  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) ( $n=2$ ) par rapport à l'expression de 3 gènes de ménage transcrits (HPRT, GUS et GAPDH). A) Profil d'expression des sous-unités  $\alpha$ . B) Profil d'expression des sous-unités auxiliaires  $\beta$ . TTX-S: canaux  $Na_v$  sensibles à la TTX. TTX-R: canaux résistants à la TTX. scn: « sodium channel gene ». ND: Non détecté.

Les cellules GH3b6 expriment principalement des canaux  $Na_v1.3$  qui sont intéressants pour leur rôle potentiel dans la transmission de la douleur<sup>512,513</sup>. Ils constituent ainsi une cible pour la recherche d'antidouleurs.

**I.2. Méthode d'étude de la réponse fonctionnelle des canaux  $\text{Na}_v$** 

Les cellules GH3b6 expriment de manière endogène certains isoformes de canaux  $\text{Na}_v$ , en particulier les canaux  $\text{Na}_v1.3$ . Le suivi de la réponse fonctionnelle de ces canaux, avant et après contact avec les composés d'intérêts, a été effectué grâce à une sonde fluorescente FURA-2. Cette technologie repose sur l'étude des flux calciques. Cette sonde permet de mesurer la mobilisation et/ou les variations de la concentration en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaires.

C'est un dosage indirect, non spécifique des canaux  $\text{Na}_v$ . En effet, cette méthode repose sur le fait que l'activation des canaux  $\text{Na}_v$  entraîne une augmentation transitoire des concentrations intracellulaires de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>532,533</sup>. Les canaux  $\text{Na}_v$  participent à la régulation du potentiel de membrane. En fonction du gradient électrochimique à travers la membrane plasmique, l'échangeur sodium-calcium (NCX) peut extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en mode normal ou absorber le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire en mode inverse <sup>534</sup>. L'activation des canaux  $\text{Na}_v$  et l'influx subséquent de  $\text{Na}^+$  activent l'échangeur NCX en mode inverse entraînant un afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>535</sup>. Plusieurs études réalisées sur des cellules excitables telles que des cardiomyocytes, à l'aide de la sonde calcique FURA-2 ont permis de vérifier cette hypothèse <sup>532,536</sup>. Dans les cellules cardiomyocytes murines, l'inactivation des courants  $\text{Na}^+$  diminue l'afflux  $\text{Ca}^{2+}$ . Par ailleurs, l'exposition de ces cellules à  $10\mu\text{M}$  de tétrodotoxine pour bloquer les canaux  $\text{Na}_v$  a également réduit les flux transitoires de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>536</sup>.

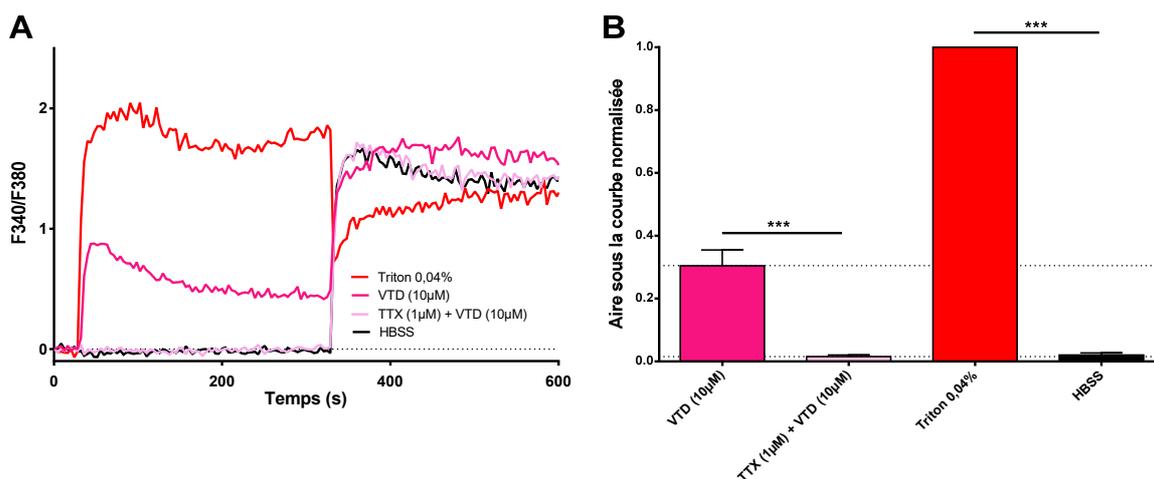
Par ailleurs, c'est une méthode simple à mettre en œuvre, robuste et reproductible qui permet le criblage à moyen/haut débit de nouvelles molécules avec une haute sensibilité. En effet, les concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire varient selon un ratio plus important que celles du  $\text{Na}^+$ , permettant une meilleure détection des flux. Cela explique l'utilisation de sondes calciques, plus sensibles que les sondes sodiques.

## II. Criblage des venins inhibiteurs des canaux $\text{Na}_v$ à l'aide de la sonde FURA-2 sur les cellules GH3b6

### II.1. Contrôles internes de la manipe

Pour la recherche de venins inhibiteurs des canaux  $\text{Na}_v$ , les venins testés ont été pré-incubés avec les cellules pendant les 20 dernières minutes de l'étape de désestérification. L'agoniste, la vératridine (VTD)  $10\mu\text{M}$ , a ensuite été injecté, 30s après le début des mesures.

Dans chaque série de tests, la vératridine  $10\mu\text{M}$  seule ainsi que du triton à 0,04% ont été utilisés comme contrôles positifs et l'injection de tampon HBSS comme contrôle négatif. La tétródotoxine (TTX)  $1\mu\text{M}$  a également été utilisée comme contrôle interne d'inhibition dans chacune des expériences. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 65**.



**Figure 65 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence de VTD  $\pm$  TTX, Triton et HBSS.**

A) F340nm/F380nm en cinétique. B) Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisés en fonction de l'effet du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). \*\*\*  $p < 0,001$  test ANOVA.

Le triton lyse les cellules. Le FURA-2 contenu dans le cytosol cellulaire peut se lier au calcium libre présent dans le tampon HBSS (extracellulaire) et induire un maximum de fluorescence (F340nm), correspondant au maximum de l'effet (100%). Au contraire, le tampon d'expérience HBSS seul, n'induit pas d'entrée de calcium dans les cellules.

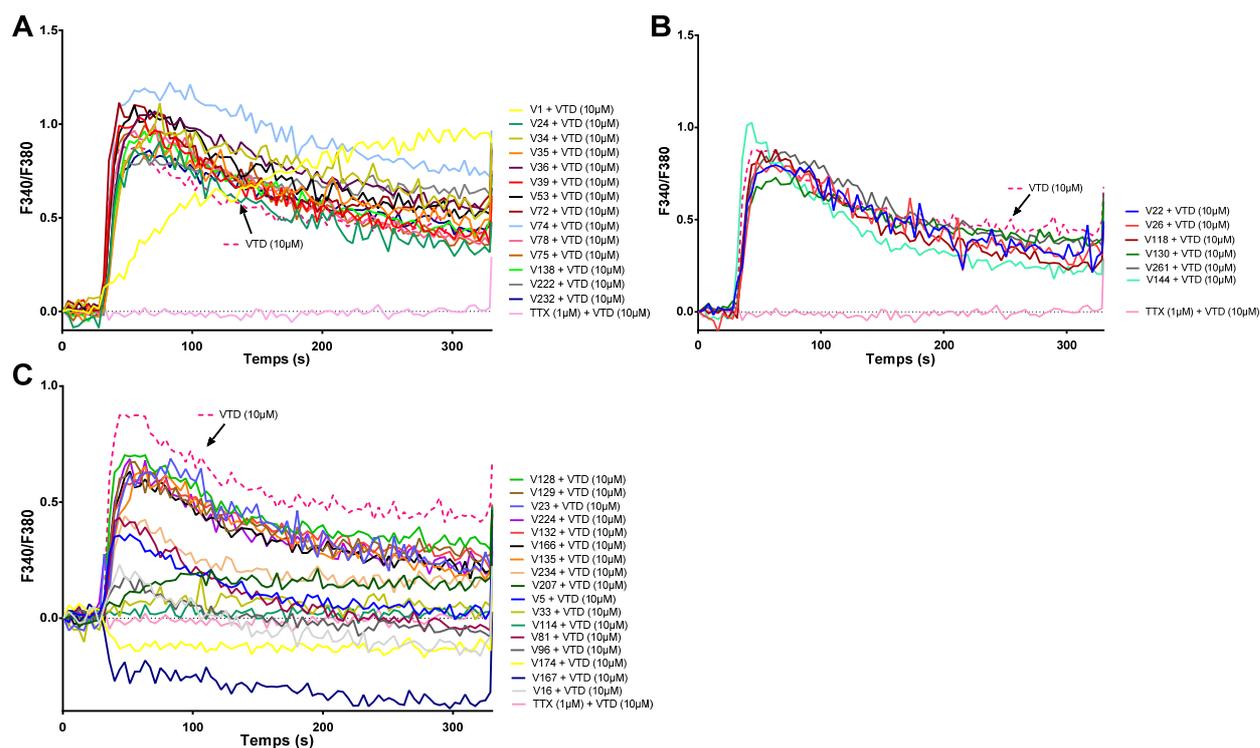
La vératridine à  $10\mu\text{M}$  induit une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules suite à l'ouverture des canaux  $\text{Na}_v$ . La vératridine est un agoniste des canaux  $\text{Na}_v$ . Elle inhibe l'inactivation du canal,

le bloquant en conformation ouverte, permettant ainsi au calcium présent dans le milieu extracellulaire d'entrer dans la cellule et, dans notre cas, de se lier à la sonde FURA-2.

La pré-incubation des cellules en présence de TTX empêche l'action de la vétratridine. Les canaux  $\text{Na}_v$  sont bloqués, la concentration en calcium intracellulaire reste à son niveau basal. La TTX est l'inhibiteur de référence des canaux  $\text{Na}_v$ <sup>501,504</sup>. Par ailleurs, après 330s de mesure de la mobilité calcique intracellulaire, du triton est ajouté dans les puits, permettant ainsi d'obtenir le signal calcique maximal. L'ensemble de ces résultats valide l'expérimentation.

## II.2. Tests des venins entiers

Un premier criblage d'une quarantaine de venins de différentes espèces animales a permis d'évaluer leur activité inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v$ . Ce sont des venins non décrits dans la littérature pour cette fonction.

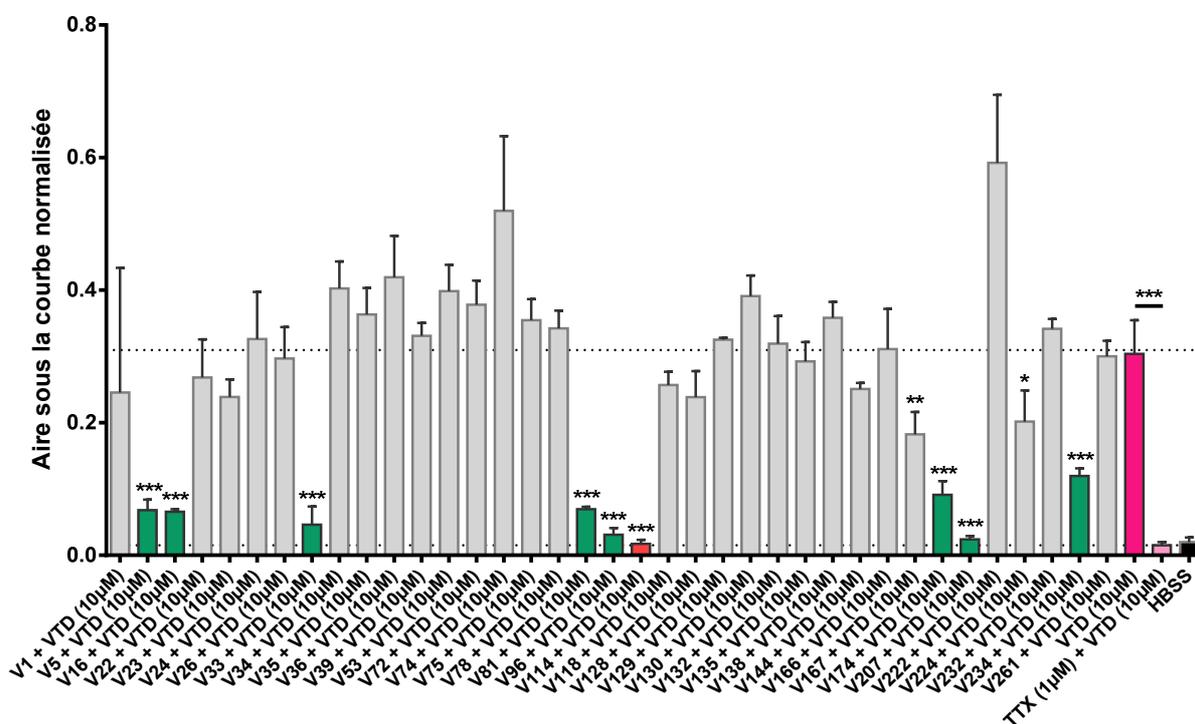


**Figure 66 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence de venin + VTD.**

A) F340nm/F380nm en cinétique des venins induisant une activation des canaux  $\text{Na}_v$  (de 0 à 330s). B) F340nm/F380nm en cinétique des venins n'ayant pas d'effet sur les canaux  $\text{Na}_v$  : signal comparable à la VTD (de 0 à 330s). C) F340nm/F380nm en cinétique des venins induisant une inhibition des canaux  $\text{Na}_v$  (de 0 à 330s). Moyenne des triplicats.

La **Figure 66** présente la cinétique de mobilisation du calcium intracellulaire au cours du temps. La **Figure 67** présente l'aire sous la courbe induite par chacun des venins et de la TTX en présence de VTD à 10 $\mu$ M par rapport à l'aire sous la courbe induite par le triton (100% de l'effet). Plus ce rapport est proche de 1, plus le produit a induit une entrée de calcium dans les cellules. En revanche, si ce rapport est proche du niveau basal, aire sous la courbe comparable à celle obtenue avec l'HBSS seule, le venin inhibe l'action de la VTD et est donc a priori un inhibiteur des canaux Nav.

Les GH3B6 sont des cellules qui expriment les canaux Nav1.2, 1.6 et principalement 1.3. A 10 $\mu$ M, la VTD n'est pas très active sur Nav1.2 et son action sur Nav1.6 n'est pas connue. En revanche, elle active les canaux Nav1.3. Ainsi, à cette concentration, la VTD cible principalement les canaux Nav1.3 des GH3b6. Si un venin (ou un produit pur) inhibe l'effet de la VTD à 10 $\mu$ M sur ces cellules, ceci suggère qu'il contient des molécules capables de se lier aux canaux Nav1.3 et de les inhiber. Ces venins présenteront donc un intérêt pour la recherche de nouveaux ligands inhibiteurs des canaux Nav.



**Figure 67 : Mesures de mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des cellules GH3b6 en présence de venin + VTD.**

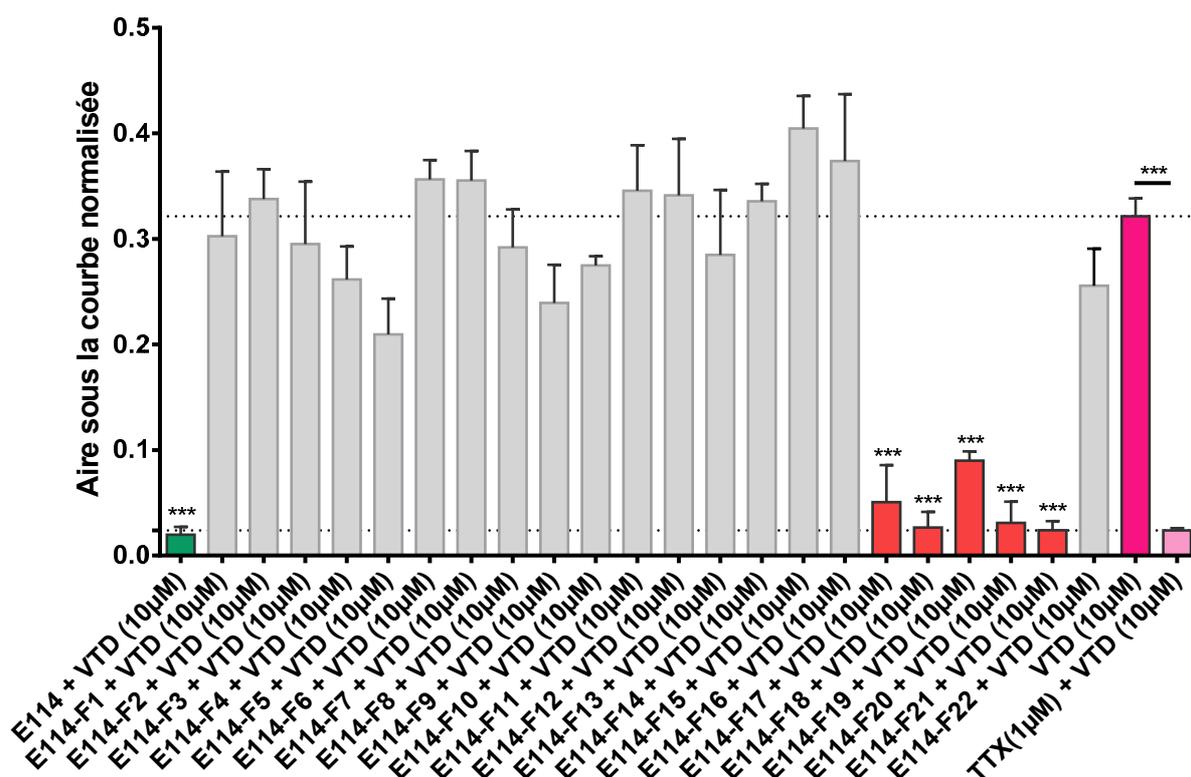
Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisés en fonction de l'effet du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). Test ANOVA : \* p<0,05, \*\* p<0,01 et \*\*\* p<0,001.

Parmi les venins testés, 14 induisent une mobilisation calcique intracellulaire (**Figure 66A** : V1,24, 34, 35, 36, 39, 53, 72, 74, 78, 75, 138, 222 et 232) supérieur à la VTD. Ces venins induisent une entrée de calcium. Soit, ils agissent en synergie avec la VTD potentialisant son effet, soit ce sont eux-mêmes des activateurs des canaux  $Na_v$ . Pour vérifier leur effet sur les canaux  $Na_v$ , il faudrait les tester seuls comme activateurs et voir si dans ces conditions ils induisent une entrée intracellulaire de calcium. Six venins (V22, 25, 118, 130, 144 et 261) induisent une mobilité calcique comparable à la VTD (**Figure 66B**). Ces venins n'auraient pas d'actions sur les canaux  $Na_v$ . Enfin, 17 venins inhibent l'effet de la VTD dont la moitié, V5, 16, 33, 81, 96, 114, 174, 207 et 234, sont des inhibiteurs forts de la VTD (**Figure 66C** et **Figure 67**).

Les venins V114, V16 et V118 ont été fractionnés et étudiés plus précisément afin d'isoler la molécule active.

### II.3. Identification de la molécule inhibitrice des canaux $Na_v$ sur les cellules GH3b6 à partir du venin V114

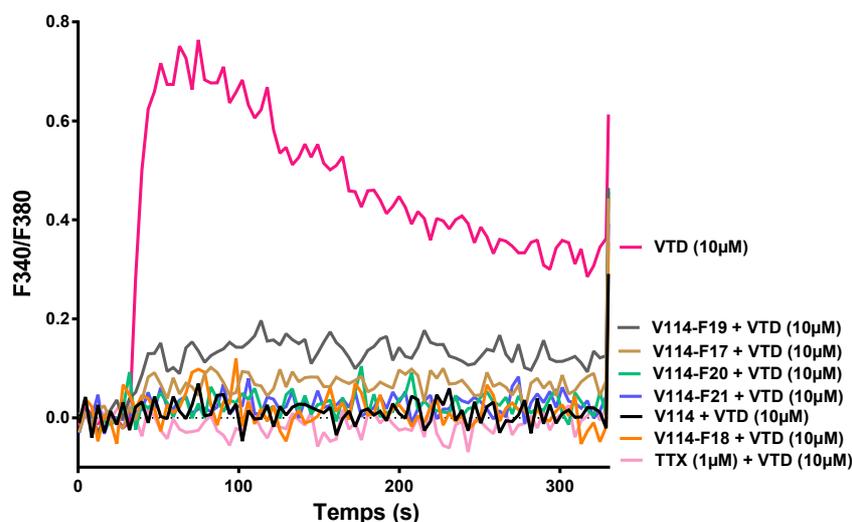
Le venin V114 est un venin de serpent. Afin de localiser l'activité inhibitrice des canaux  $Na_v$ , il a été fractionné par HPLC préparative en 22 fractions, toutes les 3 minutes, nommées F1 à F22. Chacune de ses fractions a été testée comme inhibiteur des canaux  $Na_v$ , en présence de VTD (Figure 68).



**Figure 68 : Mesures de mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence du venin V114 et de ses fractions + VTD 10µM.**

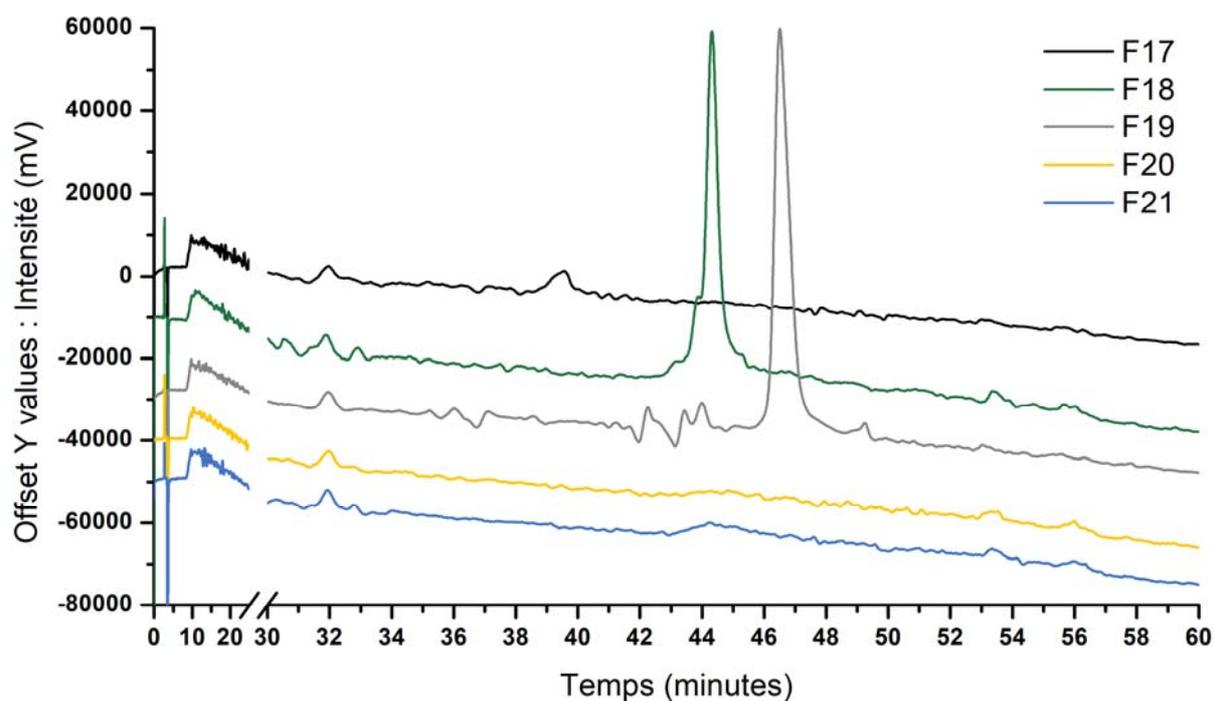
Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisées par rapport à l'effet du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). Test ANOVA : \*\*\*  $p < 0,001$ .

Plusieurs molécules semblent avoir une activité inhibitrice des canaux  $Na_v$ . Cinq fractions inhibent l'effet de la VTD, limitant les influx calciques. Les fractions F18, F20 et F21 ont un effet comparable à la TTX (Figure 68). Elles miment parfaitement la cinétique du venin entier, même F17 et F19, bien qu'elles soient un peu moins actives.



D'après ces résultats, le venin V114 contiendrait soit deux molécules inhibitrices des canaux  $\text{Na}_v$  : une commune à F17/F18 et une autre commune à F20/21, soit une molécule commune aux 5 fractions, F19 inclus.

L'analyse de la quantité active de ces fractions par HPLC analytique (**Figure 70**), montre que les molécules inhibitrices des canaux  $\text{Na}_v$  qui constituent ce venin sont très efficaces. De faibles quantités suffisent. Parmi les cinq fractions capables d'inhiber les canaux  $\text{Na}_v$ , seules les fractions F18 et F19 présentent des pics visualisables (par HPLC à 214nm). Le pic majoritaire contenu dans la fraction F18 ( $\text{Tr}=44,5$  minutes) est plus petit que celui contenu dans la fraction F19 ( $\text{Tr}= 47$  minutes) cependant F18 étant plus efficace, nous nous sommes focalisés sur la purification des produits de cette fraction. Par ailleurs, le pic élué à  $\text{Tr}=44,5$  minutes dans F18 est également présent en quantité plus faible dans F19.



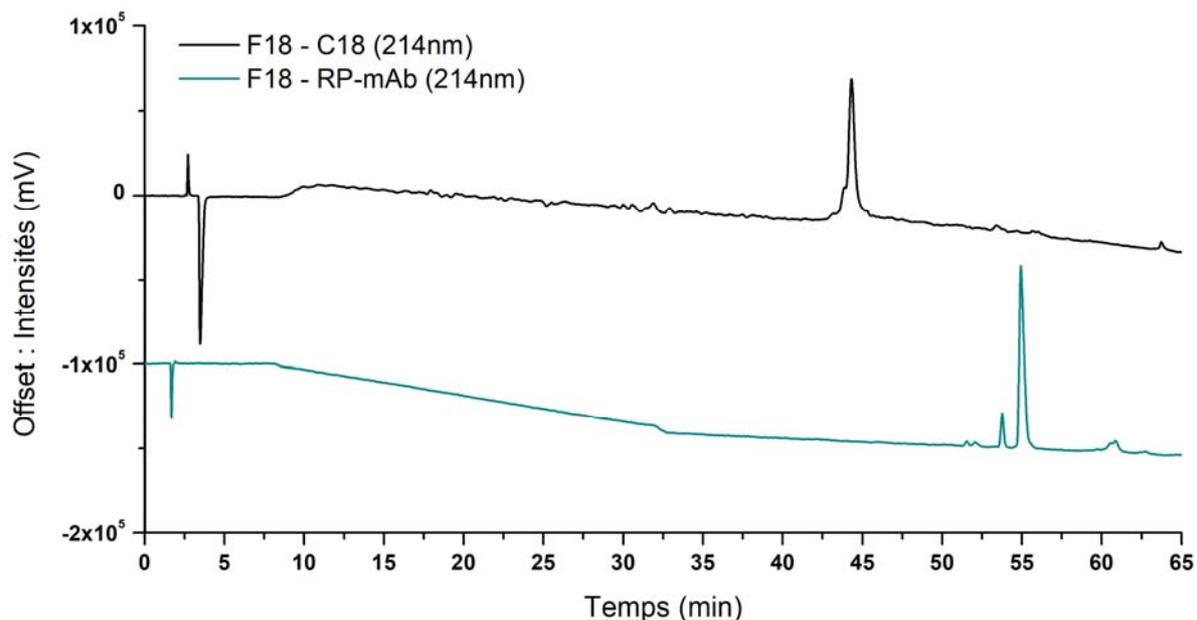
**Figure 70 : Chromatogrammes des fractions F17 à F21 (quantité active) obtenues par HPLC analytiques à 214nm.**

Elution sur une colonne Nucléodur C18 selon un gradient linéaire allant de 0 à 60% d'ACN (+10% $H_2O$ /0,1%TFA) en 60 minutes après 0-3 minutes à 100%  $H_2O$  (+0,1% TFA) à un débit de 1 mL/min.

D'après le profil HPLC sur colonne Nucléodur C18, la fraction F18 semble quasiment pure, seul un épaulement est visible devant le pic majoritaire. V114 étant un venin de serpent, il est riche en protéines. Par ailleurs, les produits contenus dans cette fraction absorbent à 214nm, et 280nm et le temps d'élution laisse à penser qu'il s'agit de produit hydrophobe de haut poids moléculaire. D'après le temps d'élution de ce produit et une recherche bibliographique sur les molécules décrites dans ce venin, plusieurs protéines de 13kDa éluées vers 40% d'ACN pourraient correspondre. Pour la plupart ce sont des PLA<sub>2</sub>.

L'analyse de la même quantité active de fraction F18 sur une colonne RPmAb montre qu'en réalité, il n'y a pas que deux produits qui composent la fraction F18 (**Figure 71**).

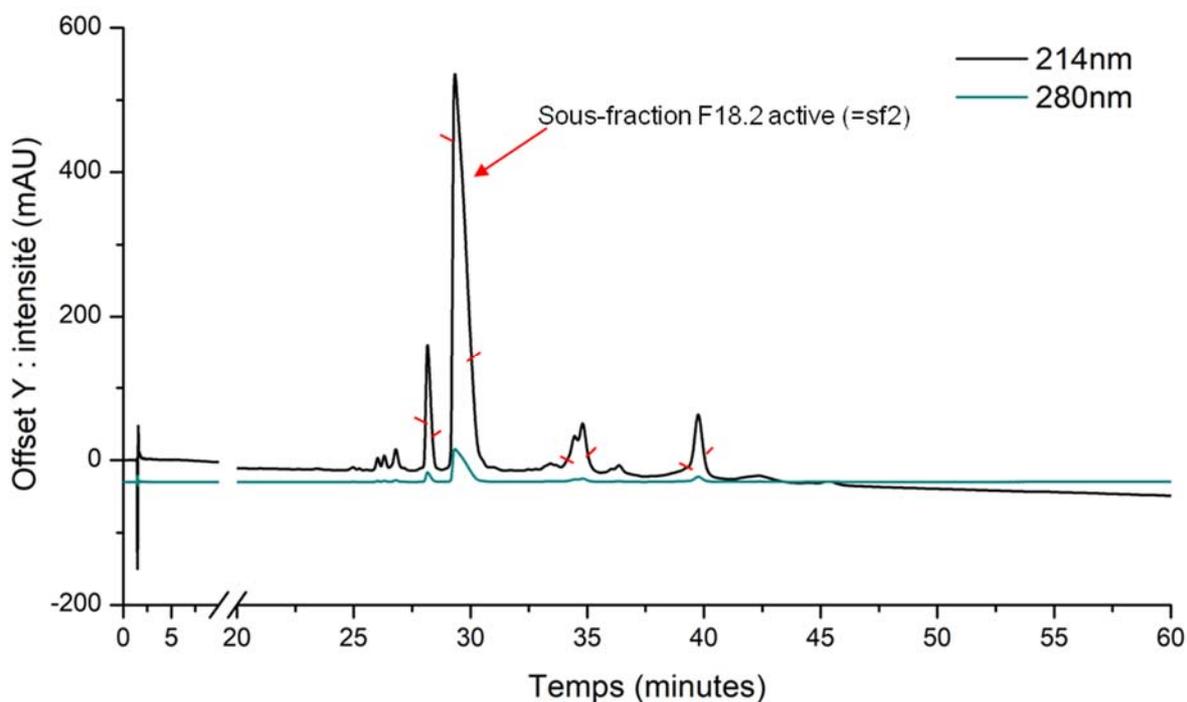
Ce sont toutes les deux des phases inverses. Cependant, contrairement à la C18 qui est totalement poreuse, la colonne RP-mAb est partiellement poreuse permettant une séparation plus efficace et résolutive des grosses biomolécules telles que les protéines. Par ailleurs, la porosité des particules est beaucoup plus importante (450Å vs. 100Å pour la C18), permettant aux analytes d'avoir un accès complet à la phase greffée<sup>537</sup>.



**Figure 71 : Comparaison des chromatogrammes de la fraction F18 analysée au moyen d'une colonne C18 (profil noir) et d'une colonne RP-mAb (profil vert).**

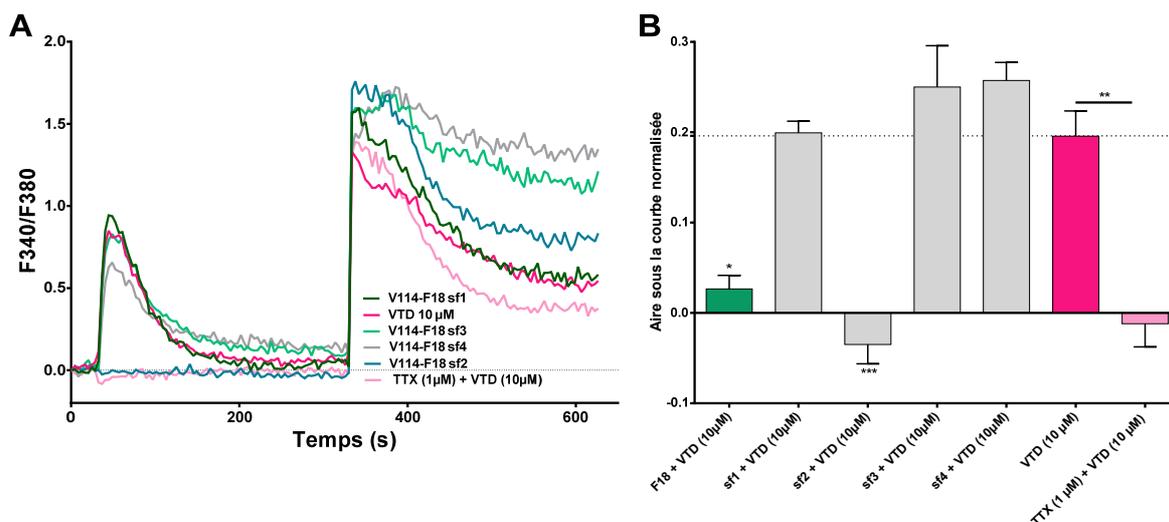
Elution sur une colonne Nucléodur C18 selon un gradient linéaire allant de 0 à 60% d'ACN (+10% $H_2O$ /0,1%TFA) en 60 minutes après 0-3 minutes à 100%  $H_2O$  (+0,1% TFA) à un débit de 1 mL/min. Elution sur une colonne RP-mAb après 0-5 minutes à 100%  $H_2O$  (+0,1% TFA) selon un gradient allant de 0 à 25% d'ACN en 25 minutes, puis de 25 à 40% d'ACN en 60 minutes à un débit de 1 mL/min.

La purification de la fraction F18 a ainsi été réalisée comme indiqué dans la **Figure 72** ci-dessous :



**Figure 72 : Profil de fractionnement de la fraction V114-F18 à 214nm.**

Elution sur une colonne RP-mAb selon un gradient linéaire allant de 25 à 40% d'ACN en 60 minutes après 0-3 minutes à 25%  $H_2O$  (+0,1% TFA) à un débit de 1 mL/min.



**Figure 73 : Mesures de mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence de la fraction F18 du venin V114 et de ses sous-fractions + VTD 10µM.**

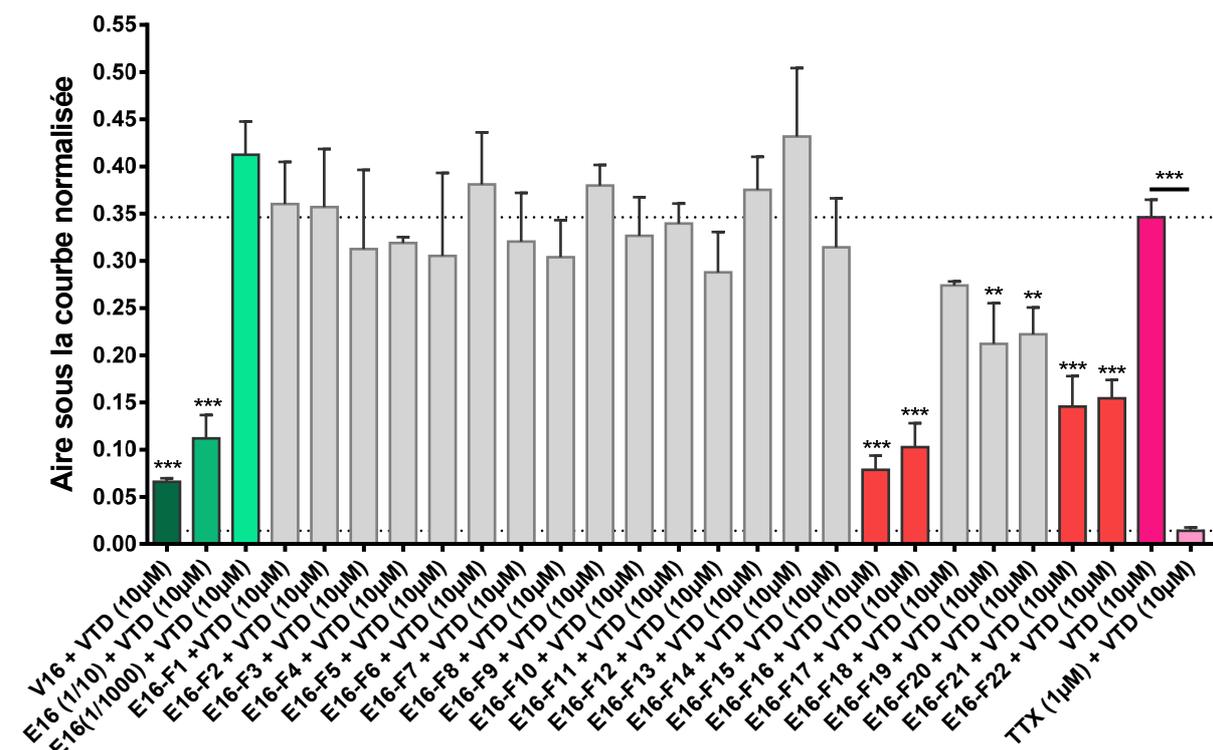
A) F340nm/F380nm en cinétique des sous-fractions F18 du venin V114. Moyenne des triplicats (n=1). B) Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisés en fonction de l'effet du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). Test ANOVA : \* p<0,05, \*\* p<0,01 et \*\*\* p<0,001.

La **Figure 73** montre que les sous-fractions sf1, sf3 et sf4 n'ont pas d'effet sur les canaux  $\text{Na}_v$ . Leur cinétique est comparable à celle de la VTD seule. La totalité de l'activité de F18 est comprise dans la sous-fraction n°2. Sa cinétique (**Figure 73.A**) est comparable à celle de la VTD (10µM) inhibée par la TTX (1µM). Par ailleurs, des dilutions de ce produit indiquent qu'il est actif jusqu'à de très faibles quantités (Inhibiteur fort encore à une dilution  $10^{-12}$  – Résultats non montrés).

#### II.4. Identification de la molécule inhibitrice des canaux $\text{Na}_v$ sur les cellules GH3b6 à partir du venin V16

En parallèle, nous avons travaillé sur un second venin, V16, qui est un venin de scorpion. Contrairement aux venins de serpents, ceux de scorpions sont connus pour leur richesse en neurotoxines dont celles modulant l'activité des canaux  $\text{Na}_v$ . Toutefois, les toxines décrites agissent principalement comme des inhibiteurs de l'inactivation de ces canaux ( $\alpha$ - et  $\beta$ -scorpion toxines) <sup>499,506,538</sup>.

Afin de localiser l'activité inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v$ , le venin V16 a été fractionné par HPLC préparative en 22 fractions, toutes les 3 minutes, nommées F1 à F22. Chacune de ses fractions a été testée comme inhibiteur des canaux  $\text{Na}_v$ , en présence de VTD à 10µM (**Figure 74**).



**Figure 74 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence du venin V16 non dilué, dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  et au  $1/1000^{\text{ème}}$  ainsi que de ses fractions +VTD ( $10\mu\text{M}$ ).**

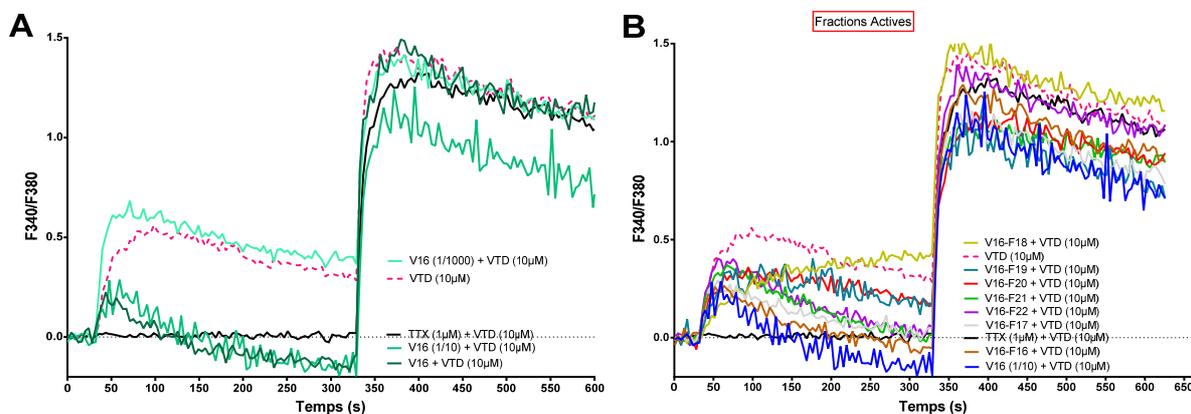
Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisées par rapport au triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). Test ANOVA : \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

D'après la **Figure 74**, le venin V16 inhibe les canaux  $\text{Na}_v$  de manière dose-dépendante. L'activité inhibitrice du venin dilué dix fois est plus faible que lorsqu'il n'est pas dilué, cependant son effet reste significatif. En revanche, une dilution au  $1/1000^{\text{ème}}$  entraîne une perte d'activité inhibitrice.

L'activité inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v$  est localisée dans deux parties du venin. Quatre fractions induisent une inhibition majeure de ces canaux : tout d'abord les fractions F16 et F17, puis les fractions F21 et F22. Les fractions intermédiaires F18, F19 et F20 sont peu actives. Elles contiennent probablement des traces de molécules d'intérêts.

D'après la **Figure 75.B)**, les fractions F16 et F17 ont un effet inhibiteur fort qui mime intégralement la cinétique de V16. F21 et F22 induisent également une cinétique semblable à celle de V16 mais plus faiblement. L'effet inhibiteur de F19 et F20 évolue selon une cinétique comparable mais plus faiblement encore. En revanche, F18 induit une inhibition des canaux  $\text{Na}_v$  selon une cinétique différente. L'effet activateur de la VTD est retardé.

D'après ces résultats, le venin V16 contiendrait soit deux molécules inhibitrices des canaux  $N_{av}$  : une commune à F16/F17 et une autre commune à F12/F13, soit une molécule commune à ces quatre fractions.



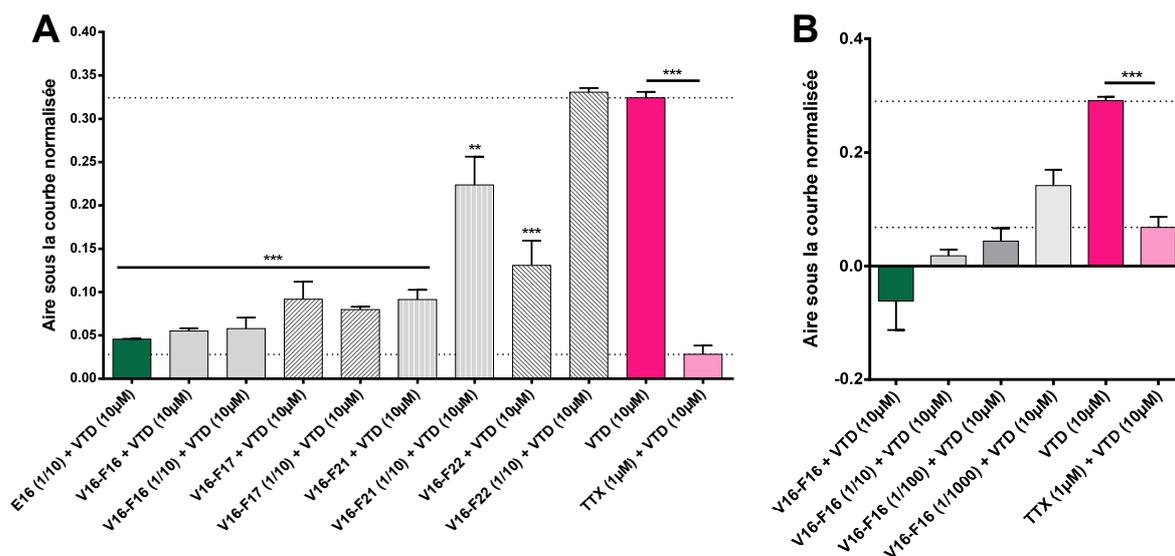
**Figure 75 : Mesures de mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence du venin V16 dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  et au  $1/1000^{\text{ème}}$  et de ses fractions actives non diluées +VTD.**

A) F340nm/F380nm en cinétique du venin V16 non dilué, dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  et au  $1/1000^{\text{ème}}$ . B) F340nm/F380nm en cinétique du venin V16 au  $1/10^{\text{ème}}$  et de ses fractions actives. Moyenne des triplicat.

Une dose-réponse a ensuite été réalisée sur ces fractions (**Figure 76.A**).

La **Figure 76.A** montre que F21 et F22 agissent de manière similaire. Elles inhibent les canaux  $N_{av}$  selon un effet dose-dépendant. En effet, diluées aux  $1/10^{\text{ème}}$ , leur effet inhibiteur diminue et est comparable à celui de la VTD seule. Ces résultats suggèrent que la molécule active est présente dans F21 et F22 mais qu'elle est principalement contenue dans F21. En revanche l'activité de F17 n'est pas dose-dépendante. F17 dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  est plus actif que lorsqu'il n'est pas dilué. Les molécules actives ne sont peut-être pas suffisamment solubilisées à la première concentration, limitant leur effet.

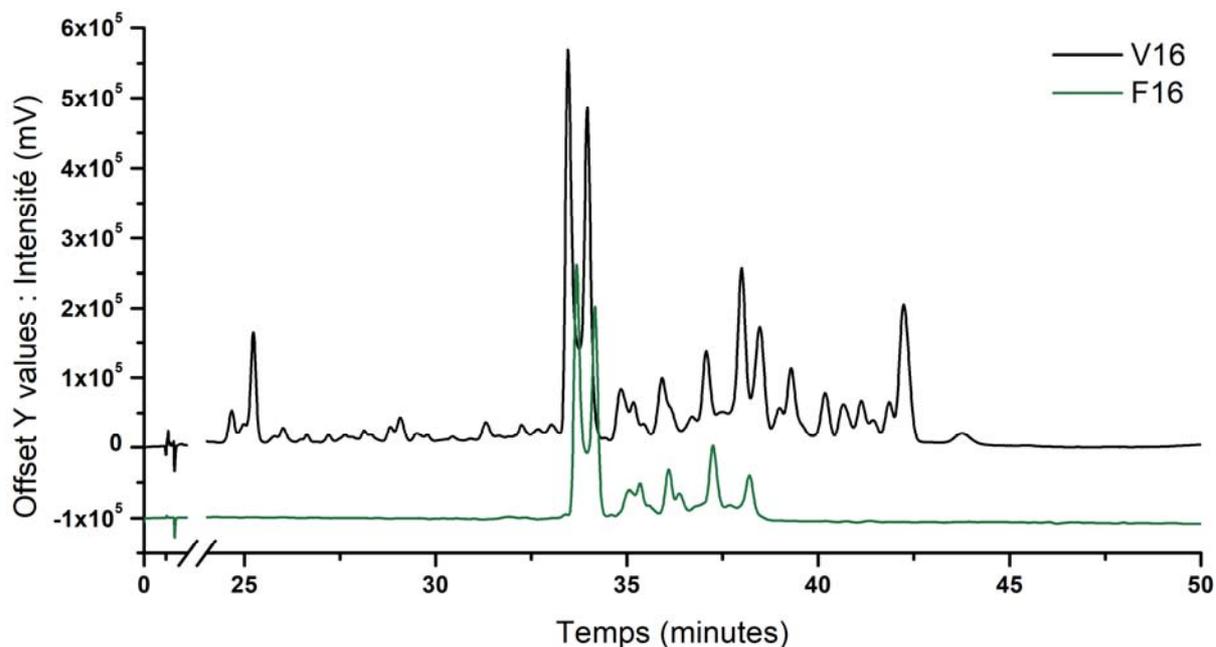
La fraction F16 étant la plus active, nous nous sommes dans un premier temps concentrés sur cette partie du venin V16. D'après les **Figures 76.A et B**), F16 agit sur les canaux  $N_{av}$  selon un effet dose-dépendant : activité inhibitrice de  $F16 > F16 (1/10^{\text{ème}}) > F16 (1/100^{\text{ème}}) > F16 (1/1000^{\text{ème}})$ . Par ailleurs, le composé d'intérêt est fortement actif. L'inhibition induite après une dilution au  $1/1000^{\text{ème}}$  reste importante ( $p < 0,01$ ).



**Figure 76 : Mesures de mobilisation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des cellules GH3b6 en fonction de la concentration des fractions F16, F17, F21 et F22 +VTD (10µM)**

(A) et en fonction de la concentration de F16 +VTD (10µM) (B). Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisées par rapport au triton (=1). Moyenne de chaque triplicat ± SEM (n=1). Test ANOVA : \*\*\* p<0,001.

D'après la **Figure 77**, l'empreinte spectrale de la fraction F16 est composée de nombreux pics. La molécule d'intérêt est éluée entre 33 et 38 minutes.

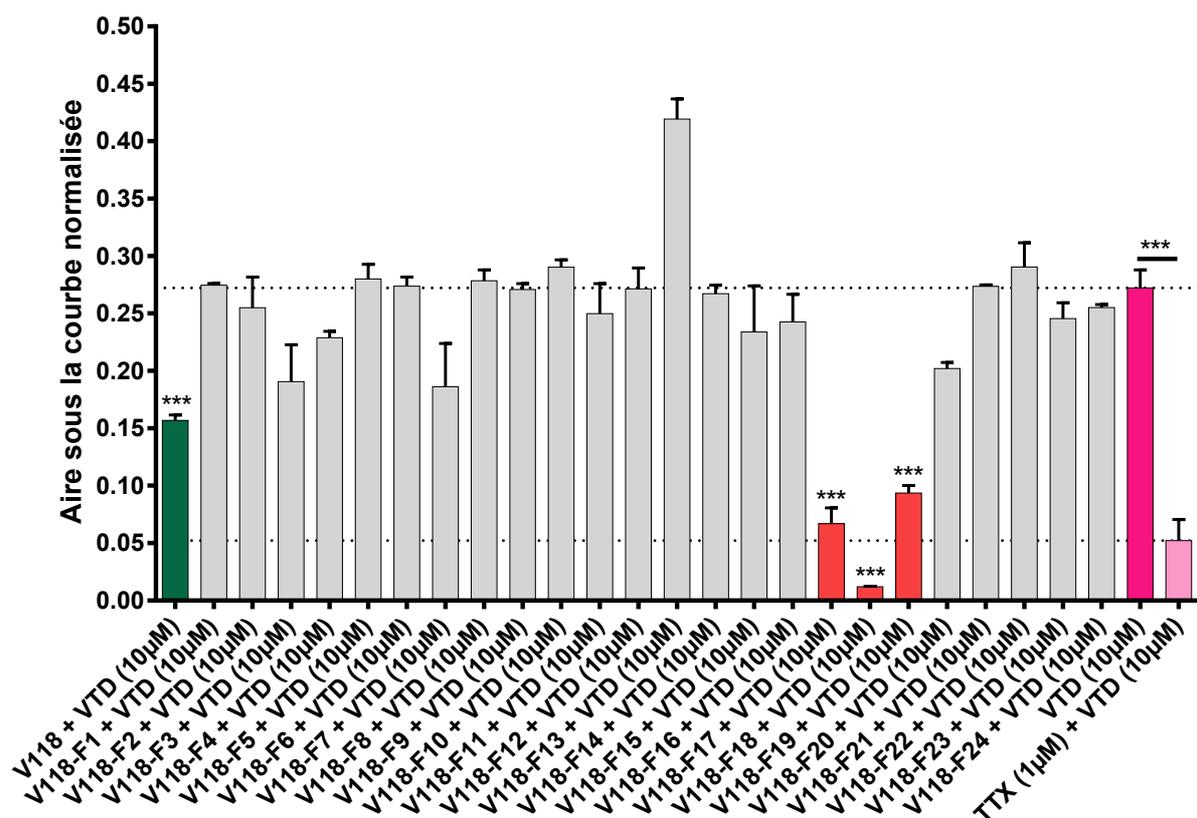


**Figure 77 : Chromatogrammes du venin V16 (200µg – en noir) et de la fraction active F16 (quantité active – en vert) obtenues par HPLC analytiques à 214nm.**

Elution sur une colonne Nucléodur C18 selon un gradient linéaire allant de 0 à 60% d'ACN (+10% $H_2O$ /0,1%TFA) en 60 minutes après 0-3 minutes à 100%  $H_2O$  (+0,1% TFA) à un débit de 1 mL/min

## II.5. Identification de la molécule inhibitrice des canaux $\text{Na}_v$ sur les cellules GH3b6 à partir du venin V118

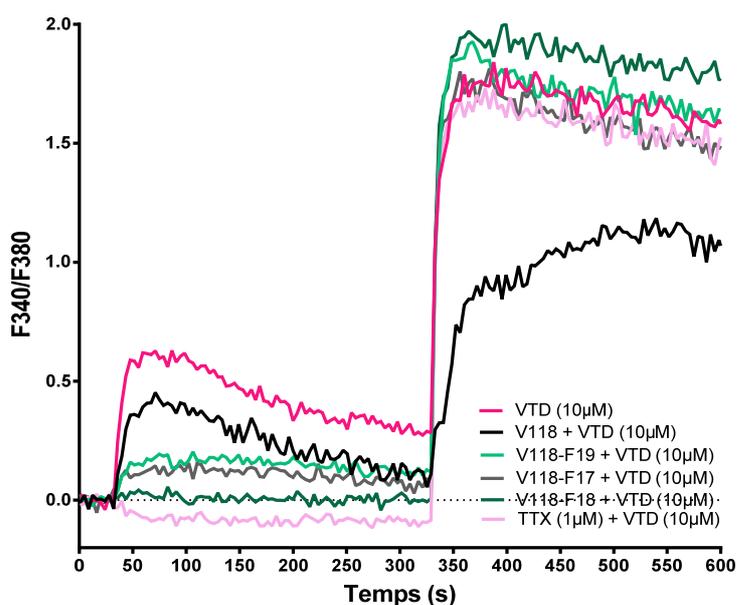
Enfin, une recherche d'identification des molécules inhibitrices des canaux  $\text{Na}_v$  a également été initiée à partir du venin V118. Ce venin de serpent a été fractionné par HPLC préparative en 24 fractions, toutes les 3 minutes, nommées F1 à F24. Chacune de ses fractions a été testée comme inhibiteur des canaux  $\text{Na}_v$ , en présence de VTD à  $10\mu\text{M}$  (**Figure 78**).



**Figure 78 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence du venin V118 et de ses fractions +VTD ( $10\mu\text{M}$ ).**

Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisées en fonction de l'effet du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). Test ANOVA : \*\*\*  $p < 0,001$ .

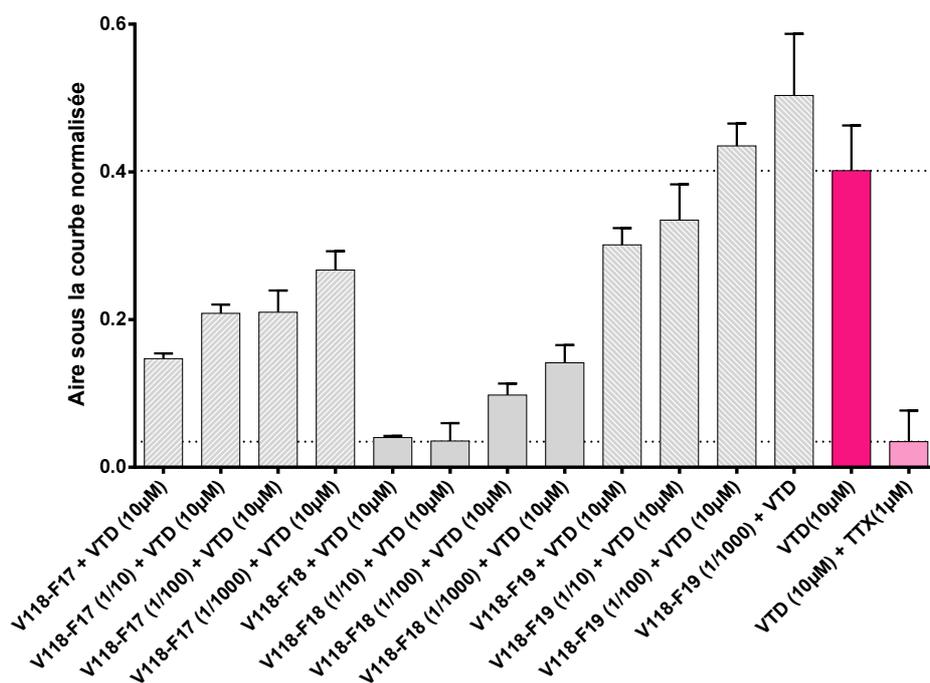
D'après la **Figure 78**, trois fractions de V118 inhibent les canaux  $\text{Na}_v$  : F17, F18 et F19. La fraction F18 est la plus active. Elle induit une inhibition totale des canaux  $\text{Na}_v$  (cinétique comparable à celle de la VTD+TTX - **Figure 79**). Les fractions F17 et F19 moins actives ont une cinétique semblable à celle de F18 (**Figure 79**). Ces résultats suggèrent que la molécule d'intérêt est contenue dans les trois fractions et qu'elle est principalement présente dans la fraction F18.



**Figure 79 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence du venin V118 et de ses fractions actives F17, F18 et F19 +VTD (10µM).**

F340nm/F380nm en cinétique du venin V118 et de ses fractions actives. Moyenne des triplicats.

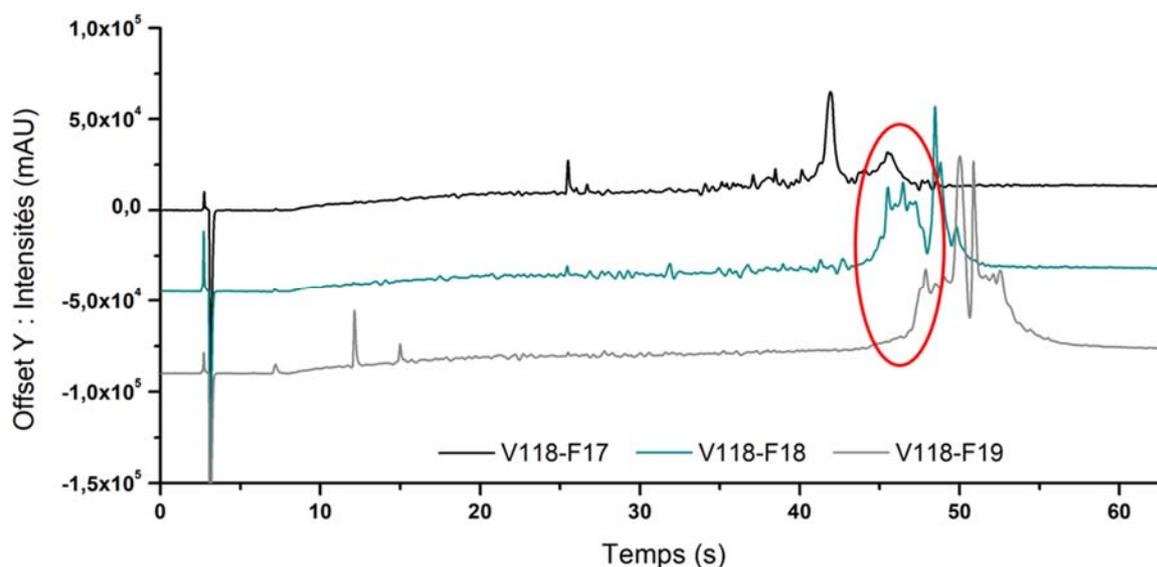
La **Figure 80** montrent que ces fractions inhibent les canaux de manière dose-dépendante. Après une dilution au 1/1000<sup>ème</sup>, F18 reste la fraction la plus active suivit de F17 et enfin F19.



**Figure 80 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence des fractions V118-F17, F18 et F19 non diluées et diluées au 1/10<sup>ème</sup>, 1/100<sup>ème</sup> et 1/1000<sup>ème</sup> +VTD (10µM).**

Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisées par rapport au triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1).

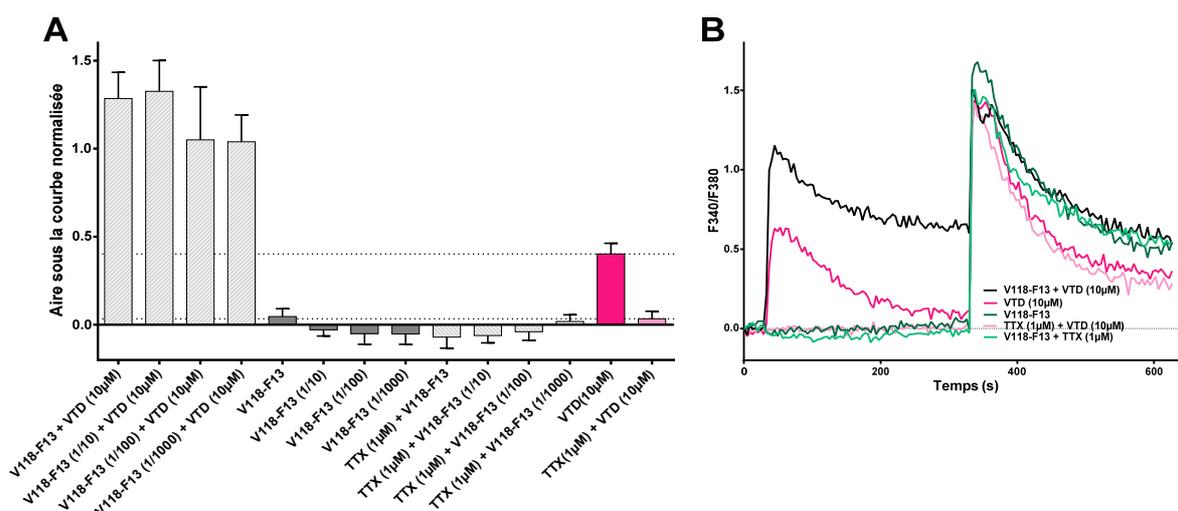
Une analyse HPLC permet d'identifier la zone à purifier. La molécule d'intérêt est probablement contenue dans l'ensemble de pics élués vers  $T_r=45$  minutes (**Figure 81** – cercle rouge).



**Figure 81 : Chromatogrammes des fractions V118-F17, F18 et F19 obtenus par HPLC analytique en phase inverse (colonne C18).**

Analyse de 10 $\mu$ L/fractions, soit 5 fois la quantité active. Elution selon un gradient allant de 0 à 60% d'ACN (+10% H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) en 60 minutes, après 3 minutes à 100% d'H<sub>2</sub>O (+0,1% TFA). Cercle rouge : zone d'intérêt pour la purification des molécules cibles.

Par ailleurs, d'après les résultats présentés **Figure 78**, la fraction F13 semble au contraire avoir un effet activateur. En effet, F13 en présence de VTD 10 $\mu$ M induit une mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire supérieure à celle de la VTD seule. Afin d'évaluer si cette fraction contient des molécules activatrices des canaux Na<sub>v</sub>, elle a été testée selon une dose-réponse comme agoniste de ces canaux, avec et sans TTX 1 $\mu$ M, et comme antagoniste en présence de VTD 10 $\mu$ M (**Figure 82**). D'après la **Figure 78**, V118-F13 ne semble pas avoir d'effet sur les canaux Na<sub>v</sub>. Testée comme agoniste, cette fraction n'induit pas d'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire aux concentrations testées. Son effet et sa cinétique sont comparables à ceux en présence de TTX (1 $\mu$ M) et de la VTD+TTX (1 $\mu$ M). En revanche, lorsqu'elle est en présence de VTD (10 $\mu$ M), elle induit une forte activation des canaux Na<sub>v</sub>, deux fois supérieure à celle de la VTD seule, et ce même après une dilution au 1/1000<sup>ème</sup> de F13. F13 aurait donc un effet potentialisateur de la VTD (10 $\mu$ M). D'après la **Figure 82.A**, l'effet potentialisateur de F13 est dépendant de sa concentration. Plus F13 est dilué, plus la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire diminue. Les canaux Na<sub>v</sub> sont moins stimulés. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'effet synergique positif de F13 avec la VTD à 10 $\mu$ M sur les canaux Na<sub>v</sub>.



**Figure 82 : Mesures de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des cellules GH3b6 en présence de la fraction V118-F13 testée comme antagoniste +VTD (10 $\mu\text{M}$ ) et antagoniste  $\pm$  TTX(1 $\mu\text{M}$ ).**

A) Evaluation de l'effet de V118-F13 comme agoniste et antagoniste des canaux  $\text{Na}_v$  en fonction de sa concentration. Histogrammes illustrant les rapports des aires sous les courbes de cinétiques des intervalles 30-300s sur 330-660s (mobilité calcique maximale) normalisés en fonction du triton (=1). Moyenne de chaque triplicat  $\pm$  SEM (n=1). B) F340nm/F380nm en cinétique de la fraction V118-F13 non diluée testée comme agoniste et antagoniste des canaux  $\text{Na}_v$ . Moyenne des triplicats.

### III. Criblage des venins activateurs des canaux $\text{Na}_v$ à l'aide de la sonde FURA-2 sur les cellules GH3b6

Du fait de leur risque élevé de toxicité et d'effets secondaires, les activateurs des canaux  $\text{Na}_v$  n'ont pas été considérés comme ayant une incidence dans le milieu thérapeutique. Toutefois, bien qu'ils soient moins recherchés que les inhibiteurs, les activateurs des canaux  $\text{Na}_v$  sont également d'intérêts. Ils peuvent notamment être utilisés comme outil de criblage pour de nouveaux ligands inhibiteurs des canaux sodium, en particulier pour le traitement des maladies neuropathologiques (épilepsie, arythmie, douleur). Par ailleurs, ils peuvent au contraire permettre de lutter contre les maladies où l'inactivation des canaux n'est pas bénéfique<sup>539</sup>.

Yan et Antzelevitch ont ainsi montré que des mutations induisant des pertes de fonction des canaux  $\text{Na}_v1.5$  provoquaient le syndrome de Brugada, un trouble du rythme cardiaque potentiellement mortel qui peut se transformer en fibrillation ventriculaire et entraîner un arrêt cardiaque soudain<sup>539,540</sup>. La perte de fonction des canaux  $\text{Na}_v1.7$  engendre une indifférence congénitale à la douleur ce qui peut avoir de lourdes conséquences sur le malade. En effet, en absence de douleur, celui-ci n'est pas alarmé par son organisme des éventuels traumatismes ou

maladies dont il est victime <sup>514,539</sup>. Quant à la perte de fonction des canaux Nav1.1, elle est associée à diverses maladies, telles que la migraine hémiplésique familiale<sup>a</sup>, l'autisme familial et l'autisme sporadique <sup>539</sup>.

Par ailleurs, les canaux Nav sont la cible principale de plusieurs classes d'insecticides, dont la plupart sont des agonistes des canaux Nav. Ils agissent en se liant aux canaux Nav ouverts et les stabilisent dans cette conformation, provoquant des courants prolongés néfastes <sup>541</sup>. C'est le cas par exemple du Dichlorodiphényltrichloroéthane<sup>b</sup> (DDT) et des pyréthroïdes<sup>c</sup>, insecticides puissants les plus utilisés. Cependant, l'utilisation excessive de ces produits au cours des dernières décennies, a entraîné le développement de la résistance dans de nombreuses populations d'insectes <sup>541</sup>. La résistance croissante des moustiques aux pyréthroïdes constituent un problème majeur de santé publique pour la lutte contre le paludisme en Afrique <sup>542</sup>.

Les venins constituent une source de nouvelles molécules bioactives pouvant pallier ces problèmes de santé ou de résistance. Attention néanmoins, les canaux sodium étant différents chez les humains et les insectes, il est important de définir la cible afin de travailler avec un modèle cellulaire de criblage adapté.

Les venins, ceux de scorpions, d'araignées et de cônes marins notamment sont riches en neurotoxines activatrices des canaux Nav <sup>44</sup>. Leur capacité à activer les canaux Nav a donc également été évaluée.

Ces tests ont également été réalisés au moyen du modèle cellulaires GH3b6. Dans ce cas, les venins ont été criblés comme agonistes des canaux sodium. Afin d'identifier si les molécules activatrices présentes dans les venins sont sensibles ou non à la TTX 1µM, ils ont été testés en absence et en présence de TTX 1µM. Pour les venins sensibles à la TTX (TTX-S), leur effet activateur est inhibé en présence de quelques micromolaires de TTX. Une quantité plus importante (quelques nM) sera nécessaire pour inhiber l'action des venins résistants à la TTX (TTX-R). Attention toutefois, ces tests de sensibilité à la TTX ne sont qu'indicatifs de l'activité. Les venins étant des mixtures complexes de molécules pouvant avoir des effets antagonistes

---

<sup>a</sup> Variété héréditaire de migraine avec aura motrice.

<sup>b</sup> Produit chimique (organochloré) synthétisé en 1874 mais dont les propriétés insecticides et acaricides n'ont été découvertes qu'à la fin des années 1930.

<sup>c</sup> Composés organochlorés, organofluorés ou organobromés halogénés utilisés comme insecticides ou comme répulsifs pour moustiques.

et/ou synergiques, seuls les tests de sensibilité effectués sur la molécule agoniste pure seront significatifs.

Ainsi, parmi les 43 venins criblés, 3 sont à retester, 29 ont été trouvés inactifs et 11 sont actifs (**Tableau 27**).

**Tableau 27 : Tableau récapitulatif des venins capables d'activer les canaux Nav.**

Test en triplicat (n=1).

Venin activateur des canaux Na <sub>v</sub>	Commentaires
V39	TTX-S : identification des fractions en cours
V56	effet TTX-S à confirmer
V72	TTX-S - Identification de la fraction F20.
V78	TTX-S : Identification des fractions en cours
V113	TTX-R
V114	TTX-R
V115	TTX-R
V117	TTX-R
V118	TTX-R + Identification des fractions F17 et F18 qui auraient une activité TTX-R
V119	TTX-S
V167	TTX-S

Le venin V96 a été testé comme agoniste et antagoniste des canaux Nav. Testé comme antagoniste, il inhibe l'activité de ces canaux. Testé comme agoniste, il n'induit pas non plus leur activation confirmant son effet inhibiteur. De même, les venins V39, V72 et V78, n'avaient pas induit d'inhibition des canaux Na<sub>v</sub> en tant qu'antagonistes. En revanche, testés comme agonistes, ils les ont stimulés confirmant leur activité activatrice (**Figure 66 et 65**).

Toutefois, les venins V114, V118 et V167 agissent comme inhibiteurs lorsqu'ils sont testés comme antagonistes, mais ils induisent également l'activation des canaux Na<sub>v</sub> lorsqu'ils sont utilisés comme agonistes. Ce paradoxe peut s'expliquer du fait de la richesse et de la complexité des venins, ainsi ils peuvent contenir des molécules qui auront des effets contraires/antagonistes. Ce qui est le plus paradoxal, c'est que pour le venin V118 ces molécules semblent être dans la même zone du venin. En effet, les fractions F17 et F18 ont également un effet inhibiteur des canaux (**Figure 78**). Ces résultats illustrent parfaitement la richesse et la complexité que sont les venins. Par ailleurs, les fractions testées étant un mélange de molécules, ces effets observés peuvent résulter de la synergie de plusieurs molécules qui les composent, suggérant une possible perte d'activité au cours de la purification.



## CHAPITRE III : CONCLUSION & PERSPECTIVES

---

Les canaux ioniques dépendant du potentiel sont une famille de protéines membranaires impliquée dans une variété de processus physiologiques fondamentaux parmi lesquels les canaux  $\text{Na}_v$  suscitent un intérêt particulier pour leur énorme potentiel thérapeutique.

Les canaux sodium dépendant du potentiel sont des déterminants moléculaires de l'excitabilité cellulaire. Essentiels à l'initiation et à la propagation des potentiels d'action dans des cellules excitables, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'excitabilité neuronale, la contractilité musculaire et la rythmicité cardiaque. Leur dysfonctionnement peut ainsi affecter les fonctions de locomotion, respiratoires, cardiaques et neurophysiologiques et sont responsables de nombreuses canalopathies. La recherche de ligands spécifiques capables de moduler l'action des canaux  $\text{Na}_v$  pouvant pallier leur dysfonction représente un enjeu majeur de la médecine moderne.

Traditionnellement, l'électrophysiologie de type « Patch clamp » est la méthode de référence pour les études sur les canaux ioniques. Cependant, cette technologie est lourde à mettre en place et nécessite un savoir-faire qui la rend inadaptable au criblage à haut débit de nouveaux ligands. Une méthode simple à mettre en œuvre, robuste et reproductible a été mise au point au sein du laboratoire BNMI à Angers. Elle permet le criblage à moyen débit de nouvelles molécules modulatrices des canaux  $\text{Na}_v$  selon une haute sensibilité tout en consommant très peu de produit. Cette méthode consiste en l'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant naturellement les canaux  $\text{Na}_v$  d'intérêts, accompagnés de leurs sous-unité auxiliaires, associée à l'utilisation d'une sonde fluorescente FURA-2 à double-excitation et mono-émission. Le suivi de la réponse fonctionnelle est ainsi réalisé selon un dosage indirect de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire suite à l'activation ou l'inactivation des canaux  $\text{Na}_v$ .

L'activité des venins sur les canaux  $\text{Na}_v$  a été évaluée sur un modèle cellulaire murin, les GH3b6. Cette lignée cellulaire dérivée de tumeur hypophysaire de rat présente une excitabilité électrique similaire à celle des cellules neuronales. En outre, elle exprime naturellement les canaux  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.6$  et principalement  $\text{Na}_v1.3$ . Cette isoforme, impliquée dans la transmission de la douleur, constitue ainsi une cible pour la recherche d'antidouleurs.

De nombreuses canalopathies sont associées à une hyperexcitabilité des canaux  $\text{Na}_v$ . Les troubles neurologiques associés les plus fréquents sont l'épilepsie, les migraines, les maladies neurodégénératives et la douleur. De nombreux inhibiteurs des canaux  $\text{Na}_v$  ont été développés comme médicaments anti-arythmiques, anti-épileptiques ou anesthésiques locaux et sont largement utilisés dans les applications cliniques. Ils sont toutefois peu sélectifs et induisent de nombreux effets secondaires indésirables. Il est donc aujourd'hui nécessaire d'identifier de nouveaux antagonistes des canaux  $\text{Na}_v$  plus puissants et plus sélectifs permettant une augmentation de leur efficacité et de leur indice de sécurité.

Non seulement les toxines issues des venins d'animaux servent d'outils chimiques importants pour comprendre la structure, la pharmacologie et la physiologie des canaux  $\text{Na}_v$ , mais ils fournissent également des pistes extraordinaires pour le développement de nouveaux agents sélectifs de sous-types qui ont un potentiel thérapeutique. Une étude a ainsi été initiée à partir d'une quarantaine de venins pour lesquels leur activité inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v$  a été évaluée. Neufs venins ont été identifiés pour cette activité. L'objectif est de localiser puis de caractériser la ou les molécules support(s), capable(nt) de leur conférer l'activité escomptée. Cela a pu être réalisé grâce à des analyses HPLC et des tests de mobilisations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire alternés.

Le venin de serpent, V114, s'est révélé être le plus actif. Après, purification par HPLC et vérification de l'activité inhibitrice, la sous-fraction nommée F18.2 a été identifiée. D'après une analyse par MALDI-TOF, ce produit aurait une masse d'environ 13kDa. Son activité inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v1.3$  sera confirmée par électrophysiologie « Voltage-clamp ». En effet, l'électrophysiologie est l'approche la plus directe pour mesurer l'activité des canaux  $\text{Na}_v$ . Plus spécifique, elle permet l'étude d'un seul type de canaux  $\text{Na}_v$  exprimé spécifiquement dans un système hétérologue. La caractérisation physico-chimique de cette molécule supposée de nature protéique permettra ensuite de l'identifier.

De même, une étude d'identification a été initiée à partir du venin V16, un venin de scorpion également très actif qui semble contenir deux molécules antagonistes des canaux  $\text{Na}_v1.3$ . Une molécule serait commune aux fractions F16/F17 et une autre, au moins, serait commune aux fractions F21/F22. Enfin, le venin de serpent V118, serait constitué d'une molécule inhibitrice des canaux  $\text{Na}_v$  majoritairement présente dans la fraction F18 et commune aux fractions successives F17/F18/F19. Après avoir été purifiées et enrichies, ces molécules d'intérêt seront

également analysées en électrophysiologie. Elles pourront ensuite être caractérisées et identifiées.

Bien qu'il soit généralement admis que l'hyperactivité des canaux  $Na_v$  soit associée aux principales neuropathologies, il existe également des maladies neurologiques associées à une inhibition excessive de la fonction de ces canaux. Ainsi, la recherche d'activateurs présente une double importance thérapeutique : à la fois comme outil pour la recherche d'inhibiteurs de ces canaux  $Na_v$ , et comme agoniste pour rétablir les fonctions des canaux défectueux. Parmi la quarantaine de venins criblés pour cette activité, onze ont induit une mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. L'activité stimulante de ces venins n'a à ce jour pas été localisée. En revanche, il est à noter que les venins V114, V118 et V167 identifiés en premier lieu comme inhibiteurs des canaux  $Na_v$ , semblent également avoir une activité activatrice. Ce qui est le plus paradoxal, c'est que pour le venin V118 ces molécules semblent être dans la même zone du venin. En effet, les fractions F17 et F18 ont également été identifiées pour leur effet stimulant.

L'ensemble de ces résultats témoignent de la richesse et du fort potentiel thérapeutique des venins comme sources de nouveaux ligands des canaux  $Na_v$ . La combinaison de méthodes non électrophysiologiques permettant le criblage de ligands à moyen débit et électrophysiologiques fournit une approche intégrée, peu coûteuse et robuste pour la découverte de médicaments ciblant les canaux ioniques. Suivant leur activité, ces molécules pourront servir de modèle ou être utilisées comme activateurs ou bloqueurs des canaux  $Na_v$  en tant que médicaments pour le traitement de canalopathies, comme insecticides voir même comme inhibiteur de la douleur lors des processus d'abattage des animaux.

Enfin, l'identification des produits issus de V114-F18.2 et V118-F18 pourrait permettre de reporter pour la première fois, des composés extraits de venin de serpent, capables d'inhiber les canaux  $Na_v$ .



---

## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

La recherche de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique est un enjeu majeur de santé publique en particulier dans le traitement de certaines maladies telles que les cancers, les infections, les maladies cardiovasculaire et neurologiques. Ces substances naturelles, riches et complexes que sont les venins d'animaux, sont précieuses pour la recherche de molécules innovantes.

L'identification et la caractérisation de molécules bioactives innovantes à partir de venins d'animaux est un sujet vaste. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse illustrent l'extraordinaire potentiel de recherche qu'offre les venins d'animaux. Ils sont une source inépuisable de molécules pouvant être exploitées dans de nombreux domaines thérapeutiques ainsi que dans de nombreux autres domaines industriels.

Ils nous ont ainsi permis d'identifier de nouvelles molécules potentiellement actives pour la lutte contre la résistance des bactéries aux antibiotiques mais également pour le traitement des maladies neurologiques. Ces molécules pourront servir de modèles pour l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques, et ce dans de multiples domaines d'application.



---

# - PARTIE C -

## Partie Expérimentale

---

I. VENINS.....	213
I.1.    RECOLTE / STOCKAGE / FOURNISSEUR .....	213
I.2.    PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	213
II. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES VENINS.....	213
II.1.    CULTURE DES BACTERIES .....	213
II.2.    EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE .....	216
III. EVALUATION DE L'ACTIVITE MODULATRICE DES CANAUX SODIQUES DES VENINS .....	218
III.1.    CULTURE DES GH3B6.....	218
IV. PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES MOLECULES ACTIVES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) .....	224
IV.1.    REACTIFS .....	224
IV.2.    FRACTIONNEMENT DES VENINS PAR HPLC PREPARATIVE .....	225
IV.3.    FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS PAR HPLC SEMI-PREPARATIVE.....	226
IV.4.    FRACTIONNEMENT ET ANALYSE PAR HPLC ANALYTIQUE .....	226
V. CARACTERISATIONS PHYSICOCHIMIQUES DES MOLECULES ACTIVES .....	226
V.1.    SPECTROMETRIE DE MASSE .....	226
V.2.    SEQUENÇAGE N-TERMINAL PAR DEGRADATION D'EDMAN .....	229
V.3.    ANALYSE EN ACIDES AMINÉS .....	231
VI. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE (SPPS).....	231
VI.1.    SYNTHÈSE PEPTIDIQUE .....	231
VI.2.    ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	233
VI.3.    PURIFICATION DES PEPTIDES NEO-SYNTHESES .....	233
VII. CARACTERISATIONS PHARMACOLOGIQUES .....	234
VII.1.    DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMUM INHIBITRICE (CMI) .....	234
VII.2.    DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE (CMB).....	235
VII.3.    EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE .....	235
VII.4.    DOSAGE DE LA PERMEABILISATION DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE .....	237
VII.5.    EVALUATION DE L'ACTIVITE DE SURFACE ET DE L'INTERACTION AVEC LES LIPIDES.....	238



## I. Venins

### I.1. Récolte / stockage / fournisseur

Les venins lyophilisés de serpents, scorpions, araignées et autres animaux venimeux ont été fournis par la société LATOXAN (Portes-lès-Valence, France) et ont été conservés à 4°C.

### I.2. Préparation des échantillons

Les solutions de venins sont préparées dans de l'eau HPLC ou milliQ à la concentration souhaitée. Après solubilisation, les solutions sont centrifugées 5min à 5000 rpm. Le surnageant est conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le processus est identique pour les fractions et sous-fractions de venins.

## II. Evaluation de l'activité antibactérienne des venins

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec de laboratoire BiosCiences de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (iSm2), UMR 7373, sous la direction du Dr. Marc Maresca.

### II.1. Culture des bactéries

#### II.1.1. Réactifs/Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture sont préparés à partir de poudres. Leur composition ainsi que leur origine sont listées dans le **Tableau 28**.

Les suppléments de culture sont présentés dans le **Tableau 29**.

**Tableau 28 : Désignation et références des milieux pour culture bactérienne.**

<u>Désignation</u>	<u>Références</u>	<u>Fournisseurs</u> <sup>(1)</sup>
Luria Bertani Broth, Miller (25g/L)	244620	DIFCO™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).
Mueller Hinton Broth (21g/L)	275710	
European Bacteriological Agar <sup>a</sup>	CAT. 1800	CondaLab (Madrid, Espagne)
PBS (Phosphate-Buffered Saline), pH 7,4	10010-023	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Les géloses Luria Bertani (LB) sont préparées en mélangeant stérilement du milieu LB à 50g/L avec une solution d'agar 2X autoclavées et liquéfiées au préalable par chauffage au micro-onde.

Les souches *Candida* sont cultivées sur milieu Sabouraud Dextrose.

**Tableau 29 : Suppléments pour culture bactérienne en milieu solide.**

<u>Désignation</u>	<u>N° CAS</u>	<u>Fournisseurs</u> <sup>(1)</sup>
Phosphate de sodium monobasique monohydrate NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10049-21-5	Fisher Scientific International, Inc. (Pittsburgh, PA, USA)
Phosphate de sodium dibasique Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7558-79-4	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA)

Le tampon phosphate est composé d'une solution de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 100mM dont le pH est ajusté à 7,4 avec une solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 100mM.

L'«Underlay gel» est composé de 1% de LB, 10% de tampon phosphate et 1% d'agar. L'«Overlay gel» correspond à du LB 2X auquel 1% d'agar est ajouté.

### II.1.2. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes et de levures utilisées lors des tests antibactériens de cette étude sont présentés dans les **Tableau 30 et Tableau 31**.

<sup>a</sup> Limite les interactions électrostatiques entre les peptides antimicrobiens chargés positivement et la partie sulfatée de l'agaropectine de l'agar standard.

**Tableau 30 : Désignation et références des souches bactériennes.**

G+ = Gram-positif ; G- = Gram-négatif

<u>Souches</u>	<u>Gram</u>	<u>Fournisseurs</u> <sup>(1)</sup>
<b>• Non pathogènes</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	G+	ATCC
<i>Bacillus thuringiensis</i> (pathogène facultatif) HD22	G+	USDA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	G-	ATCC
<i>Escherichia coli</i> DH5α	G-	LBVBGR
<b>• Pathogènes</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	G+	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	G-	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSMZ 347	G+	Leibniz Institute DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i> méthicilline résistant	G+	LBVBGR
<i>Staphylococcus aureus</i> méthicilline résistant USA300 ATCC BAA1717	G+	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant	G-	LBVBGR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> fluoroquinolone résistant CIP 107398	G-	CIP

<sup>(1)</sup> **ATCC** : American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)**USDA** (United States Department of Agriculture) : Département de l'Agriculture des Etats-Unis (Washington D.C., USA)**Leibniz Institute DSMZ** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) : Collection Allemande de Micro-organismes et de culture Cellulaires (Braunschweig, Allemagne)**LBVBGR** : Laboratoire Biotechnologie & Valorisation des Bio-GéoRessources (Sidi Thabet, Ariana, Tunisie).**CIP** : Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France)**Tableau 31 : Désignation et référence des levures.**

<u>Souches</u>	<u>Fournisseurs</u> <sup>(1)</sup>
<b>• Non pathogènes</b>	
<i>Candida sake</i>	LBVBGR
<b>• Pathogènes</b>	
<i>Candida parapsilosis</i>	LBVBGR
<i>Candida albicans</i>	LBVBGR

<sup>(1)</sup> **LBVBGR** : Laboratoire Biotechnologie & Valorisation des Bio-GéoRessources (Sidi Thabet, Ariana, Tunisie).

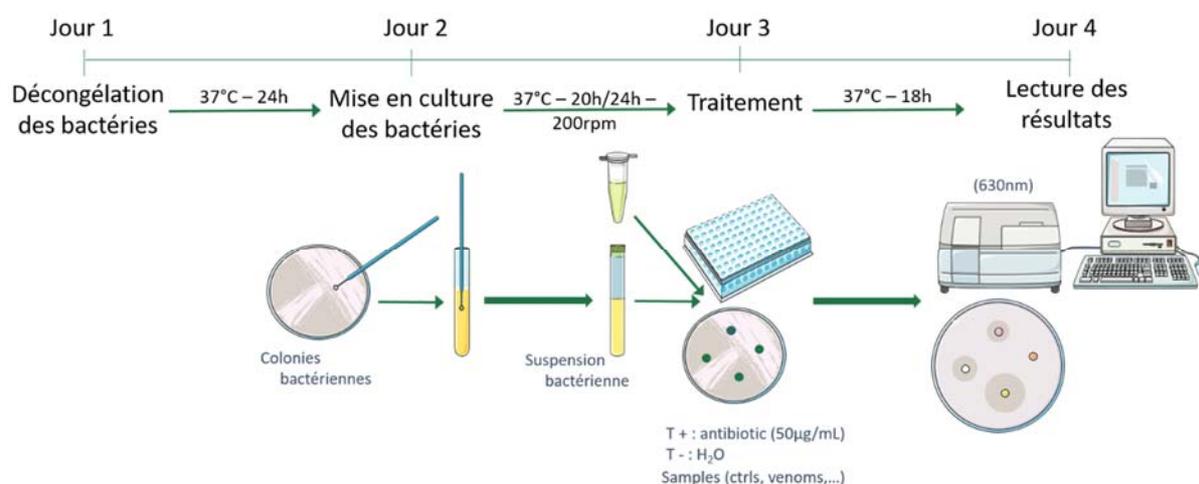
### II.1.3. Culture des bactéries

La manipulation des bactéries s'effectue sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Chaque souche est ensemencée à partir d'un cryotube sur milieu gélosé LB. Elles sont cultivées à 37°C (boîte retournée, gélose vers le haut) pendant 24 heures.

### II.1.4. Conservation des bactéries par cryogénie

Lors de la culture, des contaminations peuvent survenir. Un stock de chaque souche est ainsi conservé à -80°C, à partir duquel les bactéries seront préparées pour les expériences. Ce stock est produit à partir d'une colonie de bactérie cultivée dans 2 mL de milieu LB à 37°C sous agitation à 200 rpm. Après incubation 20 à 24 heures, un volume équivalent de glycérol à 80% est ajouté. La solution de bactéries dans 40% de glycérol est homogénéisée et répartie dans des cryotubes, congelés directement à -80°C.

## II.2. Évaluation de l'activité antibactérienne



**Figure 83: Plan d'expérience pour l'évaluation antibactérienne des venins, des fractions et des produits purs en milieu liquide et gélosé.**

Images : Servier Medical Art©.

### II.2.1. Criblage en milieu liquide

Le criblage des venins a été dans un premier temps, effectué grâce à un test d'inhibition de croissance bactérienne en milieu liquide en plaque 96 puits (10062-900 - VWR, Radnor, PA, USA). A jour 1, chaque souche à tester est ensemencée à partir d'un cryotube sur milieu gélosé LB. Elles sont cultivées à 37°C pendant 24 heures. A jour 2, une Unité Formant Colonie (UFC) de chaque souche à tester a été cultivée sur la nuit (entre 20 et 22h) dans 2 mL de milieu

Lysogény Broth (LB) à 37°C sous agitation à 200 rpm (Unitron HT Infors, Bottmingen, Suisse). A jour 3, chaque puits contenant 40 µL d'échantillon (venin entier, fractions, sous-fractions) a été supplémenté avec 160 µL de la souche bactérienne testée, préalablement diluée dans du milieu LB à une concentration finale comprise entre  $1.10^5$  to  $1.10^6$  UFC/mL. Les venins entiers ont été testés à 10 mg/mL à partir d'une solution à 50 mg/mL. Certains venins ont été testés selon une dose-réponse à 1 et 0,1 mg/mL à partir de solutions à 5 et 0,5 mg/mL respectivement. Comme contrôle positif, 40 µL d'antibiotique, amoxicilline (solution stock à 250 µg/mL ; A8523-25G - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pour *B. subtilis*, *E. coli* et *S. aureus* – ou gentamycine (à 250 µg/mL ; SV30080.01 – HyClone™, San Angelo, Texas, USA) pour *P. aeruginosa* ont été ajoutés à 160 µL de la suspension bactérienne. Selon le même procédé, de l'eau milliQ stérile a été utilisée comme témoin négatif. Chaque point a été réalisé en duplicat sur une même plaque. Chaque condition a été répétée au moins dans deux expériences différentes. A jour 4, l'inhibition de la croissance bactérienne a été évaluée par mesure d'absorbance (densité optique) à 360 nm avec un lecteur de microplaques (PowerWave X340, BioTek Instrument, Winooski, VT, USA) après 17-18h d'incubation à 37°C (Logiciel de lecture de DO Gen5 2.05, BioTek Instrument, Winooski, VT, USA) (**Figure 83**).

### II.2.2. Criblage en milieu solide

Pour compléter les résultats obtenus lors du criblage en milieu liquide, les venins trouvés inactifs ont été criblés en milieu solide par nos collaborateurs Tunisiens dans le laboratoire LBVBGR sous la direction du Dr. Amor Mosbah. Ce même protocole a ensuite été utilisé pour l'identification des fractions et des produits antibactériens purifiés.

A jour 1, chaque souche à tester a étéensemencée à partir d'un cryotube sur milieu gélosé LB. Elles ont été cultivées à 37°C pendant 24 heures. A jour 2, une UFC de chaque souche à tester a été cultivée sur la nuit dans 2 mL de milieu LB à 37°C sous agitation à 200 rpm (Unitron HT Infors, Bottmingen, Suisse). Après 17-18h d'incubation, 75 µL de la culture à saturation est transféré dans 15 mL de milieu LB et incubé 2 à 2,5h à 37°C sous agitation à 200 rpm. La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée 5 minutes à 2000 rpm. Le culot bactérien est lavé avec 10 mL de PBS 1X (10010-023 - Gibco®, Carlsbad, CA, USA) à 4°C par centrifugation 5 min à 2000 rpm à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 5 ou 10 mL de PBS pour une  $DO_{max}$  n'excédant pas 1. L'absorbance des solutions bactériennes est mesurée à 620 nm à partir d'un aliquot de 1mL. Le volume nécessaire pour avoir  $4.10^6$  UFC/mL peut ensuite être déterminé à

---

partir du calcul suivant :  $A_{620nm} \times 2,5 \cdot 10^8 \text{ UFC/mL} = \text{UFC/mL}$ . Dix millilitres d'Underlay gel (**voir II.1.1**) maintenu à 42°C est inoculé avec  $4 \cdot 10^6 \text{ UFC/mL}$  dans une boîte de pétri (120x120 ou  $\varnothing=90\text{mm}$ ) sur un espace de niveau et placé à 4°C pendant 10 min pour une parfaite gélification. Les puits sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce ( $\varnothing = 4 \text{ mm}$  ou  $6 \text{ mm}$ ). Les venins entiers ont été testés à  $100 \mu\text{g}$  (à partir d'une solution à  $10 \text{ mg/mL}$ ). Après avoir laissé diffuser 10 minutes sur la paillasse, la boîte est retournée et incubée 3h à 37°C. Chaque Underlay gel (**voir II.1.1**) est ensuite recouvert avec 10 mL d'Overlay gel (**voir II.1.1**). Après une gélification totale durant 15 minutes à 4°C, les boîtes de pétri sont retournées et incubées à 37°C pour la nuit. Après 17-18h d'incubation, l'inhibition de la croissance a été examinée en mesurant le diamètre des halos d'inhibition formés (en millimètre), comprenant le diamètre du puits de 4 ou 6 mm. Pour la présentation des résultats, le diamètre des puits a été soustrait des halos d'inhibitions obtenus (**Figure 83**).

### III. Evaluation de l'activité modulatrice des canaux sodiques des venins

L'évaluation de l'activité modulatrice des venins sur les canaux sodium voltage dépendant ( $\text{Nav}$ ) a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée (BNMI) à Angers sous la direction du Pr. Christian Legros.

#### III.1. Culture des GH3b6

L'activité modulatrice des venins sur les canaux  $\text{Nav}$  a été effectuée à partir du modèle cellulaire GH3b6 cellules de tumeur hypophysaire somatotrope de rat. Ces cellules sont un sous-clone des cellules GH3 (ATCC® CCL-82.1™) fourni par la directrice de recherche Nathalie Guérineau (BNMI, Angers).

##### III.1.1. Milieu de culture et réactifs

Les références du milieu de culture, des suppléments et des réactifs nécessaires à la culture et à l'entretien des cellules GH3b6 sont présentés dans le **Tableau 32**.

**Tableau 32 : Milieu de culture, suppléments et réactifs utilisés pour la culture des GH3b6.**

Désignations	Références	Fournisseurs
<b>Milieu de culture</b> Dulbecco's Modified Eagle Medium – Ham's F-12 (DMEM/F-12)	P04-41550	PAN-Biotech (Aidenbach, Allemagne)
<b>Suppléments</b> Sérum de Veau Fœtal (SVF)	S182H-500	Eurobio (Courtaboeuf, France)
L-Glutamine 200mM	P04-80100	
Penicilline/Streptomycine	P06-07100	PAN-Biotech (Aidenbach, Allemagne)
Trypsine 0,25% - Acide Ethylène Diamine Tétracétique 0,02% (EDTA)	P10-020100	
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	4190-094	Gibco® (Carlsbad, CA, USA)
Bleu trypan 0,4%	15250061	

### III.1.2. Entretien des cellules : repiquage

Les GH3b6, ont été mises en culture dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF, 2mM de L-glutamine et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Elles sont maintenues en entretien de passages 14 à 32 dans une atmosphère humide (>60%) avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un incubateur thermorégulé à 37°C.

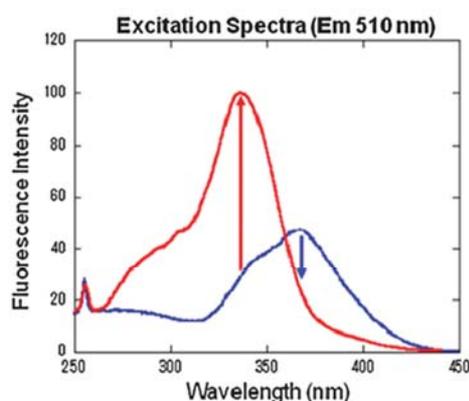
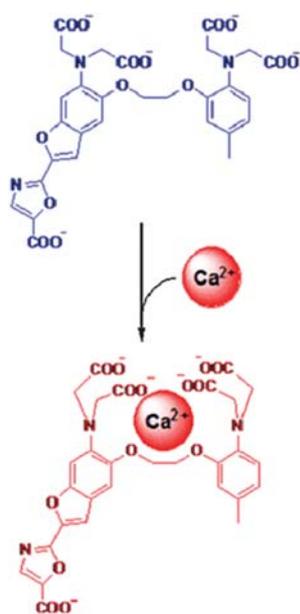
Ce sont des cellules adhérentes cultivées en flasque de 75cm<sup>2</sup> (T75) (658 170 - Greiner BioOne, Monroe, NC, USA) dans un volume final de 30 mL de milieu complet. Elles sont repiquées lorsqu'elles sont à pré-confluence (80%-90%). Lors des repiquages, le milieu de culture appauvri est retiré par aspiration. Le tapis cellulaire est ensuite lavé deux fois dans du PBS, puis incubé environ 5 minutes à 37°C avec 2 mL d'une solution de Trypsine-0,05% EDTA. La trypsine est ensuite neutralisée par dilution dans du milieu complet. Après 5 minutes de centrifugation à 300g, le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans 5 mL de milieu complet. La titration cellulaire est réalisée par un test d'exclusion au bleu trypan au moyen d'une cellule de Malassez.

### III.1.3. Réponse fonctionnelle : étude du flux calcique intracellulaire

Le flux calcique intracellulaire est mesuré par la méthode du Fluorescent Imaging Plate Reader (FLIPR®) au moyen d'une FlexStation® 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Ce lecteur de plaques fournit des mesures d'intensité de fluorescence à haut débit permettant de visualiser les variations de calcium intracellulaire suite à un traitement par des antagonistes et/ou des agonistes.

Les mesures de la concentration en calcium libre sont réalisées au moyen d'une sonde calcique Fura-2AM (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Sous sa forme AcétoxyMéthylester (AM), le Fura-2 très hydrophobe peu diffuser au travers des membranes plasmiques dans les cellules. Dans le cytosol, les estérases entraînent une déacétylation du Fura-2AM en Fura-2, très hydrosoluble qui reste ainsi piégé dans ce compartiment (l'espace intracellulaire). La sonde Fura-2, (1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester) est une sonde fluorescente ratiométrique double-excitation/mono-émission (**Figure 84**). Elle est constituée d'un fluorophore et d'une partie capable de fixer de manière spécifique un ion calcium libre.

La fixation du calcium sur la sonde induit un changement de propriétés de fluorescence de la sonde. Ceci se traduit par une émission maximale à 510 nm suite à une excitation à 340 nm. En revanche, la forme non liée émet de manière maximale à 510 nm suite à une excitation à 380 nm (**Figure 84**).



**Figure 84 : Structure et propriétés spectrales de la sonde Fura-2.**

Le Fura-2 est une sonde calcique double excitation/mono émission. Elle peut être excitée à deux longueurs d'ondes. A 340 nm, l'excitation induit une émission maximale à 510 nm pour la forme liée au  $\text{Ca}^{2+}$  (F340, tracé rouge). A 380 nm, l'excitation induit une émission maximale à 510 nm pour la forme non liée au  $\text{Ca}^{2+}$  ou libre (F380, tracé bleu). La mesure du rapport de fluorescence F340/F380 permet de suivre en mode ratiométrique la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

*III.1.3.1. Jn-1 : préparation des cellules*

A Jn-1, les cellules GH3b6 sont ensemencées en plaque noire stérile à fond transparent et plat 96 puits (655090 - Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA) à une densité de 100 000 cellules/puits dans 100µL de milieu complet. Elles sont laissées 20 minutes à température ambiante (TA) avant de les incuber 27h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

*III.1.3.2. Jn**III.1.3.2.a. Préparation des réactifs, de la sonde et des échantillons*

Les réactifs nécessaires à la préparation du tampon de mesure HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) complet sont présentés dans le **Tableau 33** ci-après. Le pH est ajusté à 7,3.

**Tableau 33 : Réactifs et protocoles de préparation des solutions mères constituant le tampon de mesure HBSS complet.**

Désignation	Préparation solution mère	Concentration finale dans le tampon	Référence	Fournisseur
<b>BSA</b>	Solution à 10% dans de l'eau Milli-Q®	0,5%	A2153-50G	
<b>CaCl<sub>2</sub> dihydrate</b> MM= 147g/mol	Solution à 250mM dans de l'eau Milli-Q®	2,5mM	C5080-500G	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>MgCl<sub>2</sub></b> MM= 95,21g/mol	Solution à 100mM dans de l'eau Milli-Q®	1mM	M8266-1KG	
<b>HBSS 10x, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> free</b>	/	1x	14185-045	Gibco® (Carlsbad, CA, USA)
<b>HEPES, 1M</b>	/	5mM	15630-080	CA, USA)

La sonde Fura-2AM est préparée dans du tampon de mesure HBSS complet d'après les proportions présentées dans le **Tableau 34**.

**Tableau 34 : Réactifs et protocoles de préparation des solutions mères constituant le mix de charge de la sonde Fura-2AM.**

Désignation	Préparation solution mère	Concentration finale dans mix de charge	Référence	Fournisseur
<b>Fura-2, AM</b>	Solution à 10mM dans du DMSO	4 $\mu$ M	F0888-1MG	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
<b>Pluronic™ F-127</b>	Solution à 20% dans du DMSO	0,02%	P2443-250G	

Les solutions mères des produits à tester sont concentrées 10 fois. La préparation des ligands de référence, l'antagoniste tétródotoxine (TTX) et l'agoniste partiel vératridine (VTD), des canaux sodium voltage dépendant sont présentés dans le **Tableau 35** ci-après :

**Tableau 35 : Préparation des échantillons.**

Désignation	Préparation solution mère	Référence	Fournisseur
<b>Tétródotoxine</b>	Solution à 10 $\mu$ M dans de l'eau Milli-Q®	L8503	Latoxan (Portes-lès-Valence, France)
<b>Vératridine – Solution à 20Mm dans du DMSO</b>	Solution à 100 $\mu$ M dans de l'eau Milli-Q®	Sc-201075A	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
<b>Triton X-100</b>	Solution à 4% dans de l'eau Milli-Q®	X100-1L	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
<b>Venins à 10 mg/mL dans eau Milli-Q®</b>	Solution à 0,7 mg/mL dans tampon HBSS complet	/	Latoxan (Portes-lès-Valence, France)

### *III.1.3.2.b. Charge des cellules*

Après 24h d'incubation à 37°C, le milieu de culture est retiré par retournement de la plaque. Les cellules sont lavées une fois avec 100 $\mu$ L/puits de tampon HBSS complet. Les cellules sont ensuite incubées 1h à TA dans l'obscurité avec 50 $\mu$ L/puits de mix de charge de la sonde Fura-2AM.

### *III.1.3.2.c. Etape de désestérification / préparation des antagonistes*

Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec 100 $\mu$ L/puits de tampon HBSS complet.

Pour chaque agoniste testé, les effets sur la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  sont mesurés en présence de l'inhibiteur de référence des canaux  $\text{Na}_v$ , la TTX. Par conséquent, les échantillons sont testés en triplicat en présence et en absence de TTX ( $\pm$  TTX). Pour la recherche d'inhibiteurs des canaux  $\text{Na}_v$ , les antagonistes sont déposés 20 minutes avant la fin de l'étape de désestérification. L'agoniste de référence, la vératridine, sera ensuite ajouté par l'automate (après 30 secondes d'acquisition).

Pour permettre la réaction de désestérification, les cellules sont incubées pendant 1h à TA dans l'obscurité à température ambiante dans du tampon HBSS complet. Dans les puits incubés en présence d'agonistes (vératridine ou venin), 135  $\mu\text{L}$  de tampon HBSS complet seront ajoutés. Dans les puits incubés en présences d'antagonistes (TTX ou venins), 121,5  $\mu\text{L}$  de tampon HBSS complet seront déposés. Après 40 minutes d'incubation, 13,5  $\mu\text{L}$ /puits d'antagonistes sont ajoutés : ils sont dilués au  $1/10^{\text{ème}}$ . La TTX est déposée à 1  $\mu\text{M}$  final et les venins à 0,07 mg/mL final (soit 10  $\mu\text{g}$ / puits).

#### *III.1.3.2.d. Préparation de la plaque agonistes*

15 $\mu\text{L}$  d'agonistes seront injectés/puits dans un volume final de 150 $\mu\text{L}$  (en triplicat). Les agonistes sont donc préparés à une concentration dix fois plus importante que celle souhaitée lors du traitement. Ils sont dilués et préparés dans du tampon de mesure HBSS complet. 75 $\mu\text{L}$ /puits sont déposés dans des plaques 96 puits transparentes fond en V (651101 – Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA). Dans le cadre de recherche d'activateurs des canaux  $\text{Na}_v$ , les agonistes testés sont les venins. En revanche, dans le cadre de recherche d'inhibiteurs de ces canaux, l'agoniste injecté est la VTD. Les venins agonistes ont été testés à la concentration finale de 0,07 mg/mL (soit 10  $\mu\text{g}$ / puits) et la vératridine à 10  $\mu\text{M}$  final.

#### *III.1.3.2.e. Lecture à la FlexStation® 3*

Les cônes, la plaque cellules/antagonistes et la plaque agonistes sont insérés dans la FlexStation® 3. Ce dernier est doté d'un automate pipeteur multi-canaux permettant d'injecter de façon programmée les solutions dans les puits de la plaque 96 puits contenant les cellules. Le lecteur est programmé pour effectuer des excitations à 340 et 380 nm et mesurer la fluorescence émise à 510 nm. L'automate de la FlexStation® injecte 15  $\mu\text{L}$  des solutions à tester 30s après le début des mesures. Après 330s d'acquisition, 17  $\mu\text{L}$  de triton à 4% est ajouté afin de lyser les cellules et d'obtenir le signal maximal (de mobilité calcique).

*III.1.3.2.f. Analyse des résultats*

La mesure du rapport de fluorescence F340/F380 permet de suivre en mode ratiométrique la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Les points de mesures enregistrés lors des 30 premières secondes afin d'éliminer le bruit de fond permettant d'obtenir le ratio F340/F380 corrigé. Tous les résultats (cf. PARTIE B - Chapitre III : Résultats et Discussion) seront sous cette forme corrigée. La lecture des résultats est réalisée sous forme de graphique  $\text{F340/F380} = f(\text{temps})$ . La réponse maximale de la mobilisation calcique correspond à l'intégrale de 30s à 330s des cellules en présence de triton. La mobilisation calcique induite par les échantillons correspond à l'intégrale 30s à 330s normalisée sur celle du triton de 330s à 600s pour chacune des conditions. L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA).

*III.1.3.2.g. Analyse statistique*

Afin de visualiser la reproductibilité des résultats (moyenne  $\pm$  SEM), la significativité statistique est démontrée par analyse de la variance (one-way ANOVA). Ce test est réalisé sur des expériences menées en triplicat avec le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Lorsque  $p < 0,05$ , la valeur est considérée comme étant statistiquement significative et est marquée par une astérisque (\*). Une valeur de  $p$  inférieur à 0,01 est notée avec deux astérisques (\*\*) et trois astérisques correspondent à  $p < 0,001$ .

## **IV. Purification et identification des molécules actives par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)**

Les venins sont des substances complexes, contenant plusieurs centaines de molécules différentes. Afin de purifier et d'identifier les molécules présentant une activité antibactérienne, les venins sont fractionnés par HPLC en phase inverse (RP-HPLC).

### **IV.1. Réactifs**

L'ensemble des réactifs utilisés pour la purification des produits par HPLC, tels que l'eau, l'acétonitrile (ACN) et l'acide trifluoroacétique (TFA) sont de qualité HPLC et ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

## IV.2. Fractionnement des venins par HPLC préparative

Les venins sélectionnés présentant une activité antibactérienne ou modulatrice des canaux sodiques voltage dépendant sont pesés à hauteur de 50 mg et solubilisés dans 10 mL d'eau HPLC. La solution est ensuite centrifugée 5 minutes à 5000 rpm et le surnageant est filtré sur membrane de nylon 0,45 $\mu$ m.

Le fractionnement a été réalisé au moyen d'une chaîne HPLC préparative Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) équipée d'un système de pompe à gradient quaternaire et d'un détecteur UV multi-longueur d'onde (Multi-Wavelength Detector = MWD).

Le surnageant a été injecté sur une colonne en phase inverse C18ec Nucléodur<sup>®</sup> 100-5 VP250/21<sup>b</sup> (250 x 21 mm, pores de 100 Å et particules de 5 $\mu$ m – 762022.210 - Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) préalablement équilibrée avec le solvant A (eau HPLC + 0,1% TFA), via une boucle d'injection (de 10 mL). La phase mobile est composée du solvant A (eau HPLC+0,1% TFA) et du solvant B (Acétonitrile + 10% eau HPLC + 0,1% TFA). L'éluât a été réalisé selon un gradient en solvant B passant de 0 à 60% en 60 minutes, après 3 minutes de phase stationnaire à 100% de solvant A, à un débit de 6 mL/min. L'absorbance de l'éluât est suivi à 214 nm et 280 nm. Ces dernières, permettent de visualiser de manière optimale, les liaisons amides et les cycles aromatiques, respectivement. Le fractionnement est réalisé toutes les 3 minutes.

Les fractions obtenues sont ensuite lyophilisées, puis reprises dans 1 mL d'eau HPLC pour les tests réalisés sur les canaux Nav ou dans un volume permettant la réalisation des tests. L'activité des fractions ainsi obtenues est ensuite évaluée selon le même protocole de criblage.

Les fractions actives sont sous-fractionnées par RP-HPLC semi-préparative ou analytique en fonction des quantités. Ces dernières sont à leur tour sous-fractionnées par RP-HPLC. Chaque sous-fraction obtenue est à nouveau testée. Ces étapes successives, de purification par HPLC, de lyophilisation, puis de tests (antibactérien ou modulateur des canaux Nav) sont répétées jusqu'à l'obtention des molécules actives purifiées.

---

<sup>b</sup> Taille des pores de 100 Å - Taille des particules de 5 $\mu$ m - VP = Vario Prep – longueur 250 mm, diamètre 21 mm

### **IV.3. Fractionnement des fractions par HPLC semi-préparative**

Certaines fractions ont été sous-fractionnées au moyen d'une colonne semi-préparative C18ec Nucléodur® 100-5 VP250/10 (762022.100 - Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) sur la chaîne HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'élution a été effectuée selon les mêmes conditions de solvants, de gradient et de longueurs d'ondes mais à un débit de 3 mL/min.

### **IV.4. Fractionnement et analyse par HPLC analytique**

L'analyse des différents produits (fractions, sous-fractions, produits actifs) ainsi que les purifications des produits présents en faibles quantités a été effectuée par HPLC analytique. Deux modèles ont été utilisés. Une LC-2010A HT (Shimadzu, Kyoto, Japon), équipée d'un détecteur UV, ou une Agilent 1100 Hewlett Packard (Santa Clara, CA, USA) munie d'un détecteur à barrette de diode (Diode Array Detector = DAD). L'élution est effectuée sur une colonne analytique C18ec Nucléodur® 100-5 (4,6 x 250 mm – 760002.46 - Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Lors de l'utilisation de l'instrument Shimadzu la colonne est thermostatée à 35°C. Les conditions expérimentales en termes de solvants, de gradient et de longueurs d'ondes sont restées identiques, mais avec un débit d'élution à 1 mL/min.

D'autres colonnes ont été utilisées en fonction de la nature des échantillons à analyser et à purifier. La colonne AdvanceBio RP-mAb Diphényl (4,6 x 150 mm – porosité = 450 Å – 793975-944 - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) est utilisée en HPLC analytique avec une phase mobile composée des solvants A (H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) et B (ACN pur). L'élution est effectuée selon un gradient passant de 25% à 40% de solvant B en 60 minutes à un débit de 1 mL/min. L'absorbance de l'éluât est suivie à 214 nm et 280 nm.

## **V. Caractérisations physicochimiques des molécules actives**

### **V.1. Spectrométrie de masse**

#### **V.1.1. MALDI-TOF**

La première information nécessaire à la caractérisation des molécules bioactives purifiées est la détermination de leur masse. Ces analyses ont été réalisées au moyen d'un spectromètre de

---

masse MALDI-TOF Microflex II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) en collaboration avec la Plate-Forme Protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM, Marseille, France) sous la direction des Drs. Pascal Mansuelle et Régine Romi-Lebrun.

La masse moléculaire des biomolécules actives naturelles isolées à partir des venins a été déterminée par spectrométrie de masse couplant une source de Désorption et Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF). Cette technique consiste à irradier un dépôt cristallin d'une matrice organique co-cristallisant avec l'analyte par un faisceau laser à 337nm. L'excitation de la matrice génère des ions moléculaires qui sont analysés par un TOF. Les ions produits en source vont être accélérés sous l'effet d'un champ électrique fixe  $V_0$ , induisant la même énergie cinétique,  $zV_0$ , à tous les ions de même charge  $z$ . L'analyseur TOF permet donc de mesurer le temps que mettent les ions à parcourir la distance du tube de vol, à partir de la relation  $V_0 = \frac{1}{2} mv^2$ .

Un microlitre de peptide pur a été co-cristallisé sur une plaque cible MALDI réutilisable en acier inoxydable avec un volume égal d'une solution de matrice d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA – C8982-10MG - Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) à 70% d'ACN (34851-2.5L-M – Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) dans de l'eau et 0,1% de TFA (T6508-500ML-M – Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). La masse globale a été mesurée sur le spectromètre de masse MALDI-ToF Microflex II dans la gamme de 600 à 5000 Da en mode linéaire positif, ou en mode réflectron dans la gamme de 200 à 5000 Da. L'étalonnage de masse externe a été effectué sur la moyenne  $[M+H]^+$  du Protein Calibrant I ou Peptide Calibrant (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

#### V.1.2. Digestion à la GluC ou à la trypsine suivie par fragmentation MS/MS

Afin d'identifier les séquences des peptides une analyse MS/MS a été effectuée après digestion des peptides par l'endoprotéinase GluC ou la trypsine. Ces analyses ont été effectuées au sein de la Plateforme Protéomique du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) au moyen d'un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) sous la direction du Dr. Patrick Fourquet.

---

Environ 10 pmol de peptides ont été digérés à la GluC (V1651 - Promega, Fitchburg, WI, USA) ou à la trypsine (V5071 – Promega, Fitchburg, WI, USA) selon un ratio enzyme/peptide de 1/20 (w/w) pendant 2-18h à 37°C.

Les solutions peptidiques digérées sont acidifiées avec 1 µL de TFA à 12,5% dans de l'eau, séchées au Speed Vac, puis dissoutes dans du TFA 0,1% dans de l'eau. Un microlitre est déposé sur une plaque MALDI auquel est ajouté 1 µL de matrice HCCA à 70% d'ACN dans de l'eau et 0,1% de TFA. Les analyses ont été effectuées au moyen d'un Ultraflex II TOF-TOF dans un range de 600 à 5000 Da. Les acquisitions ont été réalisées en mode linéaire positif. La calibration externe de la masse a été réalisée sur la moyenne  $[M+H]^+$  du Peptide Calibrant (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

### V.1.3. Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS)

#### V.1.3.1. *Q-Exactive Plus*

Certaines molécules ont été identifiées au moyen d'un Q-Exactive™ Plus (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ces analyses ont été effectuées par Mme Marie-Pierre Pavageau et Mr Gilles Schnell (ThermoFisher Scientific).

Le Q-Exactive™ Plus est un spectromètre de masse hybride combinant les performances d'un quadrupole pour la sélection de précurseurs et d'un Orbitrap pour une détection à haute résolution et grande précision compatible avec la chromatographie ultra rapide. Il permet ainsi l'identification de molécules provenant d'un mélange simple (injection directe), ou d'une matrice complexe après séparation par HPLC.

Préalablement à l'analyse de masse, les molécules des sous-fractions non-homogènes ont été séparées par U-HPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) sur une colonne C18 Hypersil Gold (15cm, 2,1mm, 1,9µm - ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) thermostatée à 40°C. La phase mobile est constituée des solvants A (H<sub>2</sub>O + 0,1% acide formique) et B (ACN + 0,1% acide formique). L'éluion est effectuée à un débit de 300 µL/min selon un gradient allant de 10% à 95% en 21 minutes suite à une phase stationnaire à 10% de solvant B pendant 1 minute. La source d'ionisation électrospray (ESI) est en mode positif avec

une différence de potentielle de 3500V et la température du capillaire de 300°C. La gamme de mesure des analyseurs de masse quadrupole et Orbitrap s'étend de 160 à 1500 m/z.

### V.1.3.2. *Synapt G2-S*

D'autres molécules, présentes au sein de mélanges, ont été analysées au moyen d'un Synapt G2-S (Waters, Milford, MA, USA) couplé à une UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) par Mr Gilles Valette et Mr Guillaume Cazals du Laboratoire de Mesures Physique (Montpellier, France).

Les analyses sont effectuées sur une UPLC Acquity H-Class (Waters, Milford, MA, USA) équipée d'une colonne Kinetex C18 100Å (100 x 2.1mm, 2,6µm – Phenomenex, Torrance, CA, USA) thermostatée à 25°C. La phase mobile est constituée des solvants A (H<sub>2</sub>O + 0,1% acide formique) et B (ACN + 0,1% acide formique). L'élution est effectuée selon un gradient isocratique à 100% de solvant A pendant 12 minutes, puis un passage de 0% de B à 100% de B en 1 minute et une phase d'élution stationnaire à 100% de B pendant 1 minute. Le débit est de 0,5 mL/min. Le chromatogramme UV est enregistré sur un détecteur à barrette photodiode (Photodiode Array Detector = PAD) entre 200 et 400 nm.

Le spectromètre couplé à la chaîne chromatographique est un Synapt G2-S équipé d'une source ESI et d'un analyseur TOF. Le spectre de masse est enregistré en mode positif, entre 50 et 1500 m/z. La tension de capillaire est de 3000 V et la tension de cône de 30 V. Les températures de source et de désolvation sont respectivement de 140°C et 450°C.

## V.2. Séquençage N-terminal par dégradation d'Edman

La séquence des peptides a été déterminée par la méthode d'Edman au moyen du séquenceur automatique Procise 494 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) couplé à une HPLC par Mr. Pascal Mansuelle et Mme Régine Lebrun de la Plate-Forme Protéomique de l'IMM (Marseille, France).

Les échantillons ont été dilués dans 100 µL d'eau/0,1%TFA et déposés sur la membrane PVDF du Prosorb<sup>c</sup> préalablement prétraitée avec 10 µL de méthanol. Un lavage par 100 µL d'eau/TFA0.1% a été réalisé, puis la membrane a été découpée, séchée et déposée dans la

---

<sup>c</sup> Permet de concentrer l'échantillon et mettre le peptide dans une matrice compatible avec le séquençage.

cartouche du séquenceur Procise 494. Un nombre de cycles correspondant au nombre d'acides aminés attendus est effectué.

La méthode d'Edman consiste à réaliser une dégradation récurrente du peptide à partir de son extrémité N-terminale. La dégradation se réalise en trois étapes principales : le couplage, le clivage et la conversion. Au cours de la **réaction de couplage**, le PhénylIsoThioCyanate (PITC) réagit avec la fonction amine de l'acide aminé N-terminal, dans des conditions basiques (N-méthyl pipéridine = NMP) à 45°C, pour former un peptide PhénylThioCarbamylé (peptide PTC).

Dans des conditions acides (TFA), le peptide PTC est **clivé** libérant ainsi l'AnilinoThioazolinone (ATZ) de l'acide aminé N-terminal. Le peptide ayant perdu le 1<sup>er</sup> acide aminé reste quant à lui solidaire de la membrane. Ce « nouveau » peptide possède un groupement aminé libre et peut réagir avec le PITC pour être dégradé une deuxième fois.

L'ATZ est ensuite extrait du milieu réactionnel et **converti** en milieu acide (TFA à 25% dans de l'eau) en PhénylThio-Hydantoïne (PTH-AA) plus stable. Ce composé détectable par mesure d'absorption UV à 269 nm est ensuite analysé par RP-HPLC sur colonne Applied PTH C18 (2,1 mm x 22 cm, 5µm) thermostatée à 55°C. L'élution est réalisée à 0,325 mL/min selon un gradient d'ACN/isopropanol (solvant B) dans de l'eau (à 3,5% de tétrahydrofurane) tamponnée à pH 4 par de l'acétate de sodium (**Tableau 36**). Le temps de rétention étant spécifique de chaque acide aminé, la nature du résidu N-terminal peut être déterminée par comparaison avec un profil HPLC de référence. Ce chromatogramme « étalon » est obtenu à chaque début de séquençage grâce à l'analyse d'un mélange standard des dérivés PTH des 20 acides aminés les plus courants.

**Tableau 36 : Gradient d'élution des PTH-AA.**

Temps (minutes)	% solvant B
0	8
0,3	8
0,4	16
18	46
18,5	90
21,5	90

Le cycle de réaction, couplage, clivage et conversion, peut être répété et conduit ainsi à la séquence du peptide.

Les séquences d'acides aminés obtenues ont été soumises à une recherche de séquences homologues dans la banque de données appropriée à l'aide du logiciel en ligne BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### V.3. Analyse en acides aminés

La quantification des peptides purifiés et la vérification de leur composition ont été réalisées par une Analyse en Acides Aminés au sein de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble.

Suite à une hydrolyse acide avec 6N HCl à 110°C pendant 24 heures<sup>d</sup>, les acides aminés de l'échantillon sont séparés sur une résine échangeuse de cations. Les composés formés sont ensuite dosés par mesure d'absorbance à 440 nm (pour la proline et l'hydroxyproline) et 570 nm après réaction avec la ninhydrine. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente dans le milieu réactionnel et le rapport d'absorption optique 570 nm/440 nm est caractéristique pour chaque acide aminé.

## VI. Synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

La synthèse de l'ensemble des peptides et de leurs analogues a été réalisée dans notre laboratoire de Chimie Radicalaire Organique et Polymères de Spécialité (CROPS), au sein de l'Institut de Chimie Radicalaire (ICR, Marseille), sous la direction du Dr. Kamel Mabrouk.

### VI.1. Synthèse peptidique

Les deux peptides d'origine naturelle, I<sub>1</sub>L<sub>12</sub> et I<sub>1</sub>L<sub>17</sub>, ainsi que les 18 analogues dérivés de ces deux peptides ont été synthétisés par voie chimique en phase solide au moyen d'un synthétiseur de peptides ABI 433 A (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Contrairement à la voie biologique de synthèse, la SPPS s'effectue à partir de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, nécessitant une protection des acides aminés par un groupement protecteur de l' $\alpha$ -

---

<sup>d</sup> Hydrolyse la liaison peptidique (entre les acides aminés (AA)) très stable et libère les AA.

amine. Les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc/t-butyl sur une résine Fmoc-Rink-amide (0,69 mmole/g). Tous les acides aminés sont protégés par un groupement N- $\alpha$ -fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) en  $\alpha$ -amine. Les Fmoc-acides aminés possédant une chaîne latérale fonctionnalisée sont également protégés par un groupement de type tert-butylloxycarbonyle (t-butyl). Tous les Fmoc-acides aminés-Fmoc, ainsi que la résine (BR-1340-0100) ont été achetés chez Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Allemagne).

Afin de réaliser la réaction du 1<sup>er</sup> acide aminé, le Fmoc présent sur la résine est éliminé au moyen d'une solution de 20% de pipéridine (1040094-1L – Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) dans du N-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP – Grade HPLC - 270458-2,5L-M). Suite à cinq lavages au NMP, le premier Fmoc-acide aminé a été fixé sur la résine par son carboxylate au moyen d'un agent de couplage 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate/1-hydroxybenzotriazole (HOBt/HBTU – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) associé à une base, la N,N-Diisopropyléthylamine (DIPEA) qui permet de réguler le pH du milieu réactionnel. Une solution à 20% de pipéridine dans du NMP permet ensuite la déprotection du Fmoc-acide aminé suivant. Les réactifs en excès, les traces de pipéridines et autres sous-produits indésirables sont éliminés par lavage au NMP. La réaction de couplage permettant la formation de la liaison amide entre l'acide aminé déprotégé et le Fmoc-acide aminé suivant protégé est à son tour réalisée. Une nouvelle étape de lavage est réalisée avec du NMP afin d'éliminer l'excès d'acides aminés n'ayant pas réagi lors du couplage. Les étapes de déprotection, lavage et couplage sont réalisées pour chaque acide aminé ajouté à la séquence du peptide.

La déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales de type t-butyl et le clivage du peptide de la résine ont été réalisés en condition acide au moyen de 10 mL d'une solution à 92,5% de TFA et 7,5% d'un cocktail de piègeurs chimiques ou scavengers composés de Tri-IsopropylSilane (TIS – 233781-50G – Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) et d'eau selon un ratio 1 :2. Les scavengers sont des molécules nucléophiles qui permettent d'éviter que les groupements protecteurs ne réagissent avec les acides aminés de la séquence au cours du clivage. Les peptides synthétisés libérés sont extraits de la résine par filtration (filtre en fibres de verre). Ils sont ensuite précipités avec de l'éther à 4°C. Le précipité peptidique formé est refroidi quelques minutes à -80°C avant d'être centrifugé à 5 000 rpm<sup>543</sup>.

## VI.2. Analyse par spectrométrie de masse

Le culot est ensuite analysé par HPLC analytique couplée à un spectromètre de masse électrospray (ESI)-quadropole (LCMS-2010EV – Shimadzu, Kyoto, Japon). La séparation est effectuée sur une colonne C18ec Nucléodur® 100-5 (4,6 x 250 mm – Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), thermostatée à 35°C, selon un gradient passant de 0% à 60% de solvant ACN + 0,1% d'acide formique (270458-2,5L-M – Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) en 60 minutes après une phase stationnaire de 3 minutes en eau HPLC + 0,1% acide formique à un débit de 1mL/min. L'absorbance de l'éluât est suivi à 214 et 280 nm. L'ionisation est effectuée en mode négatif à une température de 250°C. La tension du détecteur est fixée à 1,5Kv, celle de l'interface à 4,5Kv, et la température du bloc-chauffant est constante à 200°C. La masse d'intérêt a été identifiée grâce à la formule suivante :

$$\frac{m}{z} = \frac{M_{produit} + (z \times M_{adduit})}{z}$$

où :

- M produit = la masse molaire recherchée du peptide synthétisé (g/mol)
- z = le nombre de charges
- M aduit = la masse molaire de la charge ( $H^+ = 1\text{g/mol}$  ;  $Na^+ = 23\text{g/mol}$  ;  $K^+ = 39\text{g/mol}$ )

## VI.3. Purification des peptides néo-synthétisés

Les peptides ayant la masse théorique attendue sont purifiés par HPLC en phase inverse sur un instrument Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) au moyen d'une colonne semi-préparative C18ec Nucléodur® 100-5 (4,6 x 250 mm – Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'élution a été effectuée selon un gradient linéaire passant de 0% à 60% de solvant B (ACN + 10% eau HPLC + 0,1%TFA) en 60 minutes, après 3 minutes de phase stationnaire à 100% de solvant A (eau HPLC + 0,1% TFA) à 3 mL/min. Le suivi d'élution a été effectué à 214 et 280 nm. La masse moléculaire du peptide a été confirmée par spectrométrie de masse. Les peptides purifiés sont ensuite lyophilisés pour pouvoir être testés.

## VII. Caractérisations pharmacologiques

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec de laboratoire BiosCiencas de l'iSm2, sous la direction du Dr Marc Maresca.

### VII.1. Détermination de la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI)

L'activité antibactérienne et la concentration minimale inhibitrice des peptides synthétiques ont été déterminées grâce à un test d'inhibition de croissance bactérienne en milieu liquide. Une colonie de chaque souche bactérienne a été cultivée sur la nuit dans 2 mL de milieu LB (244620 - DIFCO™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) à 37°C sous agitation à 200 rpm (Unitron HT Infors, Bottmingen, Suisse). Ce test a été réalisé en plaque 96 puits en polypropylène (655261 + couvercle : 656161 – Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA) dans un volume final de 100 µL contenant la souche bactérienne testée, préalablement diluée dans du milieu Mueller Hinton (MH ; 275710 - DIFCO™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) à une concentration finale comprise entre  $1.10^5$  et  $1.10^6$  UFC/mL et les peptides synthétiques aux concentrations finales de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 et 0 µM. L'inhibition de la croissance bactérienne a été évaluée par mesure d'absorbance à 630 nm avec un lecteur de microplaques (PowerWave X340, BioTek Instrument, Winooski, VT, USA) après 17-18h d'incubation à 37°C (Logiciel de lecture de DO Gen5 2.05, BioTek Instrument, Winooski, VT, USA). Chaque peptide a été testé dans au moins deux expériences différentes.

La mélittine (L8403-1MG - Latoxan, Portes-Lès-Valence, France) a été utilisée comme un PAM de comparaison. Elle a été testée aux mêmes doses que nos peptides synthétiques. Les antibiotiques témoins ont également été dilués au ½ en cascade selon une dose-réponse. Pour les tests contre *B. subtilis* et *S. aureus*, 20 µL d'amoxicilline (A8523-25G - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) à 25 µg/mL dans 180 µL de bactéries ont été utilisés comme dilution de départ. Pour *E. coli*, une solution à 250µg/mL a été utilisée. Enfin, 20 µL de gentamycine (SV30080.01 – HyClone™, San Angelo, TX, USA) à 25 µg/mL dans 180 µL de bactéries ont été utilisés comme dilution de départ contre *P. aeruginosa*. Une gamme de dilution a été effectuée avec de l'eau stérile milliQ correspondant au témoin négatif.

## VII.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide des peptides a été déterminée par sous-culture des puits présentant une inhibition sur milieu gélosé.

Après détermination de la CMI, 10 µL de milieu de chacun des puits dans lesquels il n'y avait pas de croissance bactérienne visible (supérieurs ou égales à la MIC) ont été inoculés sur une gélose LB. Les colonies survivantes ont été comptées après 24h d'incubation à 37°C. La MBC correspond à la plus faible concentration de peptides induisant la croissance d'aucune ou de moins de 3 colonies, correspondant à la mort de 99,7% de l'inoculum initial. Les contrôles consistent au dépôt sur la gélose LB de 10 µL de milieu contenu dans le puits de concentration inférieure à la CMI, témoin de l'absence d'activité antibactérienne du peptide à cette concentration et de la croissance des bactéries, ainsi que 10 µL d'eau stérile MilliQ, témoin négatif.

## VII.3. Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité des peptides synthétiques a été évaluée en triplicat sur des érythrocytes humains et sur des érythrocytes de mouton au moyen d'un test hémolyse ainsi que sur des cellules épithéliales humaines grâce à un test MTT.

### VII.3.1. Détermination de l'activité hémolytique

L'activité hémolytique des peptides synthétiques a été évaluée sur des érythrocytes de sang frais humain O<sup>+</sup> (IPLA-WB3-22020 - Innovative research, Novi, MI, USA) et de mouton (IC100-0210 - Innovative research, Novi, MI, USA) selon la méthode suivante en plaque 96 puits. Les peptides et les érythrocytes ont été préparés dans du Dulbecco's PBS 1X pH 7-7,2, CaCl<sub>2</sub> +, MgCl<sub>2</sub> + (DPBS ; 14040-133 - Gibco<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA). Le sang est lavé deux fois dans du DPBS par centrifugation 5 minutes à 1000 g. Le culot est dilué dans du DPBS pour avoir 8% de globules rouges final. Après avoir été solubilisé dans du DPBS, les peptides sont dilués directement dans la plaque, en cascade au ½ dans du DPBS. Jusqu'à 1 mM de peptides ont été incubés avec 1,5-2.10<sup>8</sup> d'érythrocytes humains/mL (= 4%) par puits. Après 1h d'incubation à 37°C, la plaque est centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. Après transfert dans une nouvelle plaque 96 puits, l'absorbance du surnageant est mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Synergy<sup>™</sup> HT (BioTeck<sup>®</sup>, Winooski, Vermont, USA). Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé selon la formule suivante :

---

$$100 - \left[ \frac{(A_{tot} - A_{blanc}) - (A_{peptide} - A_{blanc})}{(A_{tot} - A_{blanc})} \right] \times 100$$

en utilisant 0,1% de Triton X-100 pour le 100% d'hémolyse ( $A_{tot}$ ), alors que  $A_{blanc}$  et  $A_{peptide}$  ont été déterminées en absence ou présence de peptides dans du DPBS respectivement. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

### VII.3.2. Détermination de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité des peptides a été évaluée sur des kératinocytes humains néonatal sains (NHEK-Neo ; 192907 - Lonza, Bâle, Suisse) au moyen d'un test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Le test MTT est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité des cellules et donc, par extension, de déterminer la toxicité cellulaire induite par un composé. Le principe du test repose sur la capacité des succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes à réduire de sel de tétrazolium MTT, en un sel de formazan. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce composé insoluble de couleur violette devra être solubilisé par du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm.

Une solution stérile de MTT filtrée à 5 mg/mL de tampon phosphate salin PBS (10010-023 ; Gibco®, Carlsbad, CA, USA) a été stockée à l'abri de la lumière à -20°C jusqu'à ce qu'elle soit utilisée. Les cellules NHEK-Néo (passage 3) ont étéensemencées en plaque 96 puits à une densité de 25 000 cellules/puits et cultivées dans du milieu de culture complet sans sérum pour kératinocytes (KGM-Gold™ basal ; 192151 - Lonza, Bâle, Suisse) jusqu'à 80-90% de confluence (=48h post-ensemencement). Le surnageant est éliminé puis remplacé par 100 µL/puits de milieu neuf. Les peptides ont été ajoutés aux puits à différentes concentrations : de 0 à 1 mM, selon des dilutions au ½ en cascade dans milieu KGM-Gold™ neuf. Après 24 heures d'incubation, un volume de 10 µL (0,5 mg/mL final) de solution de MTT a été ajouté/puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, les puits sont lavés avec du DPBS et les cristaux contenus dans les puits sont solubilisés par ajout de 50 µL de DMSO. La plaque est incubée 20 minutes à 37°C pour permettre une bonne solubilisation. Le soluté obtenu est homogénéisé par agitation et l'absorbance a été mesurée à 570 nm. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculée avec la formule suivante :

$$\left[ \frac{(A_{0\%viabilité} - A_{100\%viabilité}) - (A_{peptide} - A_{100\%viabilité})}{(A_{0\%viabilité} - A_{100\%viabilité})} \right] \times 100$$

en utilisant 0,1% de Triton X-100 pour le 0% de viabilité ( $A_{0\%viabilité}$ ), alors que  $A_{100\%viabilité}$  et  $A_{peptide}$  ont été déterminées en absence ou présence de peptides dans du DPBS respectivement. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

#### VII.4. Dosage de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique

Les effets des peptides antimicrobiens synthétiques sur l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne et eucaryote ont été étudiés en utilisant l'iodure de propidium (IP), un marqueur ADN/ARN imperméable aux cellules viables<sup>428,544</sup>. Les tests de perméabilisation ont été réalisés sur des souches bactériennes et les cellules NHEK-néo (192907 - Lonza, Bâle, Suisse). L'effet de perméabilisation des peptides a été évalué par rapport à l'effet du Cetrimonium bromide (CTAB), un détergent utilisé comme témoin positif.

##### VII.4.1. Perméabilisation des membranes procaryotes

Une UFC de chaque souche à tester a été cultivée sur la nuit dans 2 mL de milieu LB à 37°C sous agitation à 200 rpm (Unitron HT Infors, Bottmingen, Switzerland). Le lendemain, la suspension bactérienne est diluée au 1/20<sup>ème</sup> dans 30 mL de milieu MH. Après 3-4 heures à 37°C, lorsque la DO est proche de 1, la suspension bactérienne est lavée deux fois par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans un volume de PBS (10010-023 - Gibco®, Carlsbad, CA, USA) permettant d'avoir une concentration bactérienne finale d'environ  $1.10^9$  UFC/mL. Cette solution est répartie à hauteur de 100 µL/puits, correspondant à  $1.10^8$  UFC/puits, dans une plaque 96 puits en polypropylène noir Greiner Bio-One (655209 ; Monroe, NC, USA). L'IP (P4864-10ML - Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). L'IP a ensuite été ajouté à une concentration finale de 30 µM/puits ainsi que les peptides, préparés selon une dilution au ½ en cascade de 0 à 100µM dans du PBS. La cinétique des variations de fluorescence a ensuite été enregistrée à T1 minute, T5, T10, T20 et T40 minutes en utilisant le spectrophotomètre de plaque à fluorescence Synergy™ HT (BioTeck®, Winooski, VT, USA) (excitation à 540 nm / émission à 590 nm). Chaque peptide a été testé en triplicat. Les puits sans échantillons, contenant seulement du PBS constituent le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en fonction de l'effet en CTAB, utilisé comme control positif à 0,2%/puits et correspondant à 100% de perméabilisation.

#### VII.4.2. Perméabilisation des NHEK-néo

Les cellules NHEK-néo (passage 3) sont ensemencées en plaque 96 puits en polystyrène noir Corning® (3603 ; Corning, NY, USA) à 25 000 cellules/puits dans du milieu de culture pour kératinocytes (KGM-Gold™ basal, 192151 - Lonza, Bâle, Suisse). Elles sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, jusqu'à confluence. Le surnageant est éliminé, les cellules sont lavées avec du DPBS (CaCl<sub>2</sub> +, MgCl<sub>2</sub> + - 14040-133 - Gibco®, Carlsbad, CA, USA). Elles sont ensuite incubées avec 30µM d'IP et une dose décroissante de peptides de 0 à 1 mM dilués au ½ en cascade dans du DPBS. La cinétique des variations de fluorescence a ensuite été enregistrée à T1 minute, T5, T10, T20 et T40 minutes en utilisant le spectrophotomètre de plaque à fluorescence Synergy™ HT (BioTeck®, Winooski, VT, USA) (excitation à 540 nm / émission à 590 nm). Chaque peptide a été testé en triplicat. Les puits sans échantillons, contenant seulement du DPBS constituent le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en fonction de l'effet en CTAB, utilisé comme control positif à 0,2%/puits et correspondant à 100% de perméabilisation.

### **VII.5. Evaluation de l'activité de surface et de l'interaction avec les lipides**

L'activité de surface des peptides synthétiques a été mesurée au moyen du microtensiomètre automatisé µTROUGH SX (Kibron Inc., Helsinki, Finlande).

#### VII.5.1. Etude de l'adsorption des peptides à l'interface air-eau

L'activité de surface des peptides seuls a d'abord été évaluée en ajoutant une concentration croissante de peptide dans du PBS (sous-phase = 600 µL) en absence de lipides et en mesurant les variations de pression de surface ( $\Delta\pi$ ) induites.

#### VII.5.2. Etude de l'insertion des peptides dans des monocouches lipidiques reconstituées

L'interaction peptide-lipide a été mesurée en injectant du peptide sous une monocouche lipidique reconstituée. Les lipides purs bactériens et eucaryotes, POPG, CL, POPE et POPC (**Tableau 37**) ont été reconstitués dans du chloroforme à 1 mg/mL et conservés à -20°C. Le LTA et le LPS (**Tableau 37**) ont été reconstitués dans de l'eau MilliQ stérile à 2,5 mg/mL et 5 mg/mL respectivement.

**Tableau 37 : Désignation et références des lipides purs bactériens et eucaryotes.**

Lipides	Présence membranaire	Référence	Fournisseur
<b>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16 :0-18 :1 PC = POPC)</b>	Eucaryote	850457P	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
<b>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (16 :0-18 :1 PE = POPE)</b>	Eucaryote & Procaryote	850757P	
<b>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (16:0-18:1 PG = POPG)</b>	Procaryote	840457P	
<b>Cardiolipine (<i>E. coli</i>) (CL)</b>	Procaryote	841199P	
<b>Acide Lipoteichoïque (<i>S.aureus</i>) (LTA)</b>	Procaryote	#11J21-MM	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
<b>LipoPolySaccharide-B5 (<i>E.coli</i> 055 :B5) (LPS)</b>	Procaryote	#15C11-MM	

En utilisant une seringue Hamilton de 50  $\mu\text{L}$ , les lipides purs ont été déposés à la surface de la sous-phase de PBS formant une monocouche lipidique à l'interface eau-air. Les lipides ont été ajoutés jusqu'à l'obtention d'une surface de pression initiale de  $30 \pm 0,5$  mN/m, correspondant à une densité lipidique théoriquement équivalente à celle du feuillet externe de la membrane cellulaire <sup>448</sup>. Après 5 minutes d'incubation, permettant l'évaporation du solvant et la stabilisation de la pression initiale de surface, les peptides ont été injectés dans la sous-phase de PBS (600  $\mu\text{L}$ ) à une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$  en utilisant une seringue Hamilton de 10  $\mu\text{L}$ . La variation de la pression de surface suite à l'injection des peptides a été enregistrée continuellement jusqu'à l'atteinte d'un plateau d'équilibre. D'autres mesures ont été effectuées en faisant varier la pression de surface initiale dans le but de déterminer la pression maximale d'insertion de chaque peptide au sein des différentes monocouches lipidiques. Les lipides ont été déposés à l'interface PBS-air jusqu'à atteindre les pressions de surface initiales suivantes : environ 10, 15, 20, 25 ou 30 mN/m. Lorsque la pression de surface initiale est stabilisée, la variation de pression de surface due à l'injection de chaque peptide (1  $\mu\text{M}$ ) a été mesurée. L'extrapolation de la courbe de régression linéaire obtenue par tracé de la variation de pression de surface ( $\Delta\pi$ ) en fonction de la pression de surface initiale ( $\pi_i$ ) a permis de déterminer la pression maximale d'insertion des peptides pour chaque monocouche lipidique en utilisant

l'équation des droites de régression linéaire à une variation de pression égale à 0 mN/m. La pression maximale d'insertion correspond à la valeur théorique de la pression initiale de surface de la monocouche lipidique non permissive à l'insertion du peptide. Toutes les expériences ont été effectuées dans une atmosphère contrôlée à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les données ont été analysées avec le programme Filmware 2.5 (Kibron Inc., Helsinki, Finlande). La précision du système dans nos conditions expérimentales a été déterminée comme étant de  $\pm 0,25$  mN/m pour les mesures de la pression de surface.

---

**BIBLIOGRAPHIE**

---

1. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 959–968 (2009).
2. Kinch, M. S., Haynesworth, A., Kinch, S. L. & Hoyer, D. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827-2013. *Drug Discov. Today* **19**, 1033–1039 (2014).
3. Pammolli, F., Magazzini, L. & Riccaboni, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 428–438 (2011).
4. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural Products : a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3670–3695 (2013).
5. EFPIA. The Pharmaceutical Industry in Figures. *Eur. Fed. Pharm. Ind. Assoc.* 1–28 (2015).
6. Abecassis, P. & Coutinet, N. Caractéristiques du marché des médicaments et stratégies des firmes pharmaceutiques. *CAIRN - Horizons Strat.* **1**, 111–139 (2008).
7. Lahlou, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacol. Pharm.* **4**, 17–31 (2013).
8. Ortholand, J. Y. & Ganesan, A. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 271–280 (2004).
9. Sabin, J. G.-. Natural Products: Back to the Future in Drug Discovery. *Biochem. Pharmacol.* **1**, 1–2 (2012).
10. Donsbach, K. & Rück-Braun, K. Combinatorial biosynthesis of polyketides. *Org. Synth. Highlights IV* **3**, 343–349 (2008).
11. Mishra, B. B. & Tiwari, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4769–4807 (2011).
12. Bellamy, F. La synthèse à haut débit (synthèse combinatoire), une discipline arrivée à maturité dans la recherche pharmaceutique ? *J. la Société Chim. Fr.* 4–6 (2000).

13. Kozlov, S. A. Polypeptide toxins from animal venoms. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **1**, 200–206 (2007).
14. King, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 1469–1484 (2011).
15. Utkin, Y. N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J. Biol. Chem.* **6**, 28–33 (2015).
16. Gomes, A. *et al.* Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J. Exp. Biol.* **48**, 93–103 (2010).
17. Tambourgi, D. V. & van den Berg, C. W. Animal venoms/toxins and the complement system. *Mol. Immunol.* **61**, 153–162 (2014).
18. Cain, D. Weever fish sting: an unusual problem. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* **287**, 406–407 (1983).
19. P. Escoubas, L. Q. and G. M. N. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **43**, 279–295 (2008).
20. WHO. Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting. *Rep. a Consult. Meet. World Heal. Organ.* 14 (2007). doi:10.1613/jair.301
21. Stock, R. P., Massougbdji, A., Alagón, A. & Chippaux, J.-P. Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nat. Biotechnol.* **25**, 173–177 (2007).
22. Chippaux, J. P. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull. World Health Organ.* **76**, 515–524 (1998).
23. Chippaux, J.-P. *Venins de serpent et envenimations.* IRD Editions IInstitut De Recherche pour le Développement (2002).
24. Chippaux, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des. Devel. Ther.* **6**, 165–173 (2012).
25. Kang, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* **278**, 4544–4576 (2011).

- 
26. Hardy, M. C., Cochrane, J. & Allavena, R. E. Venomous and Poisonous Australian Animals of Veterinary Importance: A Rich Source of Novel Therapeutics. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
  27. Fernandes-Pedrosa, M. F., Félix-Silva, J. & Menezes, Y. a S. Toxins from Venomous Animals: Gene Cloning , Protein Expression and Biotechnological Applications. *An Integr. View Mol. Recognit. Toxinologu - From Anal. Proced. to Biomed. Appl.* 23–72 (2013). doi:10.5772/52380
  28. Tsai, I. H., Wang, Y. M., Chen, Y. H. & Tu, A. T. Geographic variations, cloning, and functional analyses of the venom acidic phospholipases A<sub>2</sub> of *Crotalus viridis viridis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **411**, 289–296 (2003).
  29. Casewell, N. R., Wü Ster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A. & Fry, B. G. Complex cocktails : the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* **28**, 219–229 (2013).
  30. De Lima, D. C. *et al.* Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM? *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2**, 39–47 (2005).
  31. Koh, D. C. I., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 3030–3041 (2006).
  32. Koh, C. Y. & Kini, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon* **59**, 497–506 (2012).
  33. Fox, J. W. & Serrano, S. M. T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2927–2934 (2007).
  34. Smith, J. J. *et al.* Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10478–10483 (2011).
  35. Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F. & Possani, L. D. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* **93**, 125–135 (2014).
  36. Escoubas, P., Sollod, B. & King, G. F. Venom landscapes: Mining the complexity of

- spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* **47**, 650–663 (2006).
37. Kumar, P. S., Kumar, D. S. & Umamaheswari, S. A perspective on toxicology of *Conus* venom peptides. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **8**, 337–351 (2015).
  38. Platnick, N. I. World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 18.0 [accessed on April 2017].
  39. Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M. & Tytgat, J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem.* **264**, 287–300 (1999).
  40. Wj, P. Chemical Components of Insect venoms. *Compound Interest 2014* - [www.compoundchen.com](http://www.compoundchen.com) 2014 (2014).
  41. Turillazzi, S. *Polistes* venom : a multifunctional secretion. *Ann. Zool. Fennici* **43**, 488–499 (2006).
  42. Tschinkel, W. R. A comparative study of the chemical defensive system of tenebrionid beetles: Chemistry of the secretions. *Journal of Insect Physiology* **21**, 753–783 (1975).
  43. Sitprija, V. & Suteparak, S. Animal toxins: An overview. *Asian Biomed.* **2**, 451–457 (2008).
  44. Fry, B. G. *et al.* The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* **10**, 483–511 (2009).
  45. Gasanov, S. E., Dagda, R. K. & Rael, E. D. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A<sub>2</sub>s, and Zn<sup>2+</sup>-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *J. Clin. Toxicol.* **4**, 1–14 (2014).
  46. Catterall, W. A. *et al.* Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**, 124–141 (2007).
  47. Dülger, B., Uğurtaş, I. H. & Sevinç, M. Antimicrobial Activity in the Skin Secretion of *Bufo viridis* (Laurenti , 1768). *Asiat. Herpetol. Res.* **10**, 161–163 (2004).
  48. Ranawaka, U. K., Lalloo, D. G. & de Silva, H. J. Neurotoxicity in Snakebite-The Limits of Our Knowledge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, 1–18 (2013).

- 
49. Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M. & Reitsma, P. H. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol. Rev.* **93**, 327–358 (2013).
  50. Lu, Q., Clemetson, J. M. & Clemetson, K. J. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1791–1799 (2005).
  51. Mion, G. *et al.* Action des venins sur la coagulation sanguine: diagnostic des syndromes hémorragiques. *Bull. la Société Pathol. Exot.* **3**, 132–138 (2002).
  52. Larréché, S., Mion, G. & Goyffon, M. Troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **27**, 302–309 (2008).
  53. Matsui, T., Fujimura, Y. & Titani, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 146–156 (2000).
  54. Lee, S. & Lynch, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* **391**, 317–323 (2005).
  55. Kolecki, P. Delayed Toxic Reaction Following Massive Bee Envenomation. *Ann. Emerg. Med.* **33**, 114–116 (1999).
  56. Hmed, B., Serria, H. T. & Mounir, Z. K. Scorpion peptides: potential use for new drug development. *J. Toxicol.* **2013**, 1–15 (2013).
  57. Nagaraju, S., Devaraja, S. & Kemparaju, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon* **50**, 383–393 (2007).
  58. Ferrer, V. P. *et al.* A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, 1–12 (2013).
  59. Bordon, K. C. F., Wiesel, G. A., Amorim, F. G. & Arantes, E. C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **21**, 1–12 (2015).
  60. Lokeshwar, V. B. & Selzer, M. G. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 281–287 (2008).
-

61. Lu, G., Kochoumian, L. & Te Piao King. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 4457–4465 (1995).
62. Kolarich, D., Léonard, R., Hemmer, W. & Altmann, F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J.* **272**, 5182–5190 (2005).
63. Teixeira, C. F. P., Landucci, E. C. T., Antunes, E., Chacur, M. & Cury, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* **42**, 947–962 (2003).
64. Ettinger, K., Cohen, G., Momic, T. & Lazarovici, P. The effects of a chactoid scorpion venom and its purified toxins on rat blood pressure and mast cells histamine release. *Toxins (Basel)*. **5**, 1332–1342 (2013).
65. Monteiro, H. S. A., Da Silva, I. M. S. C., Martins, A. M. C. & Fonteles, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **34**, 1347–1352 (2001).
66. Suwansrinon, K. *et al.* Effects of Russell's viper venom fractions on systemic and renal hemodynamics. *Toxicon* **49**, 82–88 (2007).
67. Pal, S. K., Gomes, A., Dasgupta, S. C. & Gomes, A. Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. *Indian Journal of Experimental Biology* **40**, 1353–1358 (2002).
68. Gomes, A. *et al.* Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J. Exp. Biol.* **45**, 579–593 (2007).
69. Beck, B. F. The Bible of Bee Venom Therapy Curative - Effects of Bee Venom. 1–5 (1997).
70. Pemberton, R. W. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **65**, 207–216 (1999).
71. Silva, J. *et al.* Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins*

- 
- (Basel). **7**, 3179–3209 (2015).
72. Goudet, C., Chi, C.-W. & Tytgat, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi Karsch*. *Toxicon* **40**, 1239–1258 (2002).
73. McMaster, M. L., Kristinsson, S. Y., Turesson, I., Bjorkholm, M. & Landgren, O. Pilot Study of Huachansu in Patients with Hepatocellular Carcinoma, Non-Small Cell Lung Cancer, or Pancreatic Cancer. *Cancer* **115**, 5309–5318 (2009).
74. Machkour-M'Rabet, S., Hénaut, Y., Winterton, P. & Rojo, R. A case of zotherapy with the tarantula *Brachypelma vagans* Ausserer, 1875 in traditional medicine of the Chol Mayan ethnic group in Mexico. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **7**, 1–7 (2011).
75. Cushman, D. W. & Ondetti, M. a. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **17**, 589–592 (1991).
76. Patlak, M. From Viper's venom to drug design : treating hypertension. *Break. Biosci.* 1–13 (2003).
77. Vetter, I. *et al.* Venomics : a new paradigm for natural products - based drug discovery. *Amino Acids* **40**, 15–28 (2011).
78. Judge, S. I., Smith, P. J., Stewart, P. E. & Bever Jr., C. T. Potassium channel blockers and openers as CNS neurologic therapeutic agents. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2**, 200–228 (2007).
79. Stiles, B. G., Sexton, F. W. & Weinstein, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon* **29**, 1129–1141 (1991).
80. Debré, P. Les défis du microbiotes. *Med. Sci. (Paris)*. **32**, 919–920 (2016).
81. Swynghedauw, B. L'évolution biologique : Grande oubliée de l'enseignement médical et base rationnelle d'une politique de santé. *Med. Sci. (Paris)*. **26**, 526–528 (2010).
82. Abt, M. C. & Pamer, E. G. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 16–22 (2014).
-

- 
83. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–16 (2010).
  84. Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**, 27–55 (2003).
  85. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).
  86. Li, J. *et al.* Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* **11**, 1–18 (2017).
  87. Gupta, R. S. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1435–1491 (1998).
  88. Jones, C. L. Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. **14**, 535–542 (2016).
  89. Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).
  90. Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 686–723 (2003).
  91. Kamio, Y. & Nikaido, H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**, 2561–2570 (1976).
  92. Beutler, B. LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment. *J. Endotoxin Res.* **8**, 329–335 (2002).
  93. Sun, Y. & Shang, D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1–8 (2015).
  94. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).

- 
95. Braun, V. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 335–377 (1975).
  96. Isenberg, H. D. Pathogenicity and virulence: another view. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 40–53 (1988).
  97. Renaud, F. Vivre avec les pathogènes aux XXIème siècle. *Med. Sci. (Paris)*. **27**, 919–920 (2011).
  98. Komolafe, O. Antibiotic resistance in bacteria - an emerging public health problem. *Malawi Medical Journal* **15**, 63–67 (2004).
  99. Davies, J. & Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433 (2010).
  100. Papp, D. Histoire des antibiotiques. *Rev. Hist. Sci. (Paris)*. **7**, 124–138 (2016).
  101. Ducourthial, G. Dioscoride, Aux origines de la Matière médicale. *Rev. Prat.* **55**, 689–693 (2005).
  102. Mahoney, J. F., Arnold, R. C. & Harris, A. Penicillin Treatment of Early Syphilis-A Preliminary Report. *Am. J. Public Health Nations. Health* **33**, 1387–1391 (1943).
  103. Powers, J. H. Antimicrobial drug development - the past, the present, and the future. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 23–31 (2004).
  104. Coates, A. R., Halls, G. & Hu, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* **163**, 184–194 (2011).
  105. Hart, T. & Shears, P. *Atlas de poche de microbiologie*. (Flammarion Médecine-Sciences, 1999).
  106. Flandrois, J. *Bactériologie médicale*. (Azay Livre, 2000).
  107. SANOFICONNECT. Les familles d'antibiotiques. *Antibio-responsable.fr* Available at: <https://www.antibio-responsable.fr/antibiotherapie/familles-antibiotiques>. (Accessed: 21st August 2017)
  108. Kinch, M. S. & Patridge, E. An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease:

- 
- HIV/AIDS drugs. *Drug Discov. Today* **19**, 1510–1513 (2014).
109. Califf, R. New Molecular Entities (NMEs) - More Collaboration, Research Needed to Develop Cures. *FDA Voice* (2015). Available at: <https://blogs.fda.gov/fdavoiced/index.php/tag/new-molecular-entities-nmes/>. (Accessed: 10th June 2017)
110. US Food and Drug Administration. Challenge and opportunity on the critical path to new medical products. <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.html>. (2004).
111. Bond, C. M. La gérance des antibiotiques : un rôle important du domaine de la pharmacie ? *Can. J. Hosp. Pharm.* **68**, 443–444 (2015).
112. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
113. Boman, H. G. & Hultmark, D. Cell-Free Immunity in Insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 103–126 (1987).
114. Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. & Miyajima, K. Molecular Basis for Membrane Selectivity of an Antimicrobial Peptide, Magainin 2. *Biochemistry* **34**, 3423–3429 (1995).
115. Yount, N. Y., Yeaman, M. R. & Kaback, H. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 7363–7368 (2004).
116. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238–250 (2005).
117. Lai, R., Liu, H., Hui Lee, W. & Zhang, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 796–799 (2002).
118. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**, 552–555 (2002).
119. Schitteck, B. *et al.* Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature* **2**, 1123–1137 (2001).
-

- 
120. Andersson, M., Boman, A. & Boman, H. G. *Ascaris* nematodes from pig and human make three anti- bacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 599–606 (2003).
121. Sir Alexander Fleming - Banquet Speech Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945. (1945). Available at: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-speech.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-speech.html). (Accessed: 10th June 2017)
122. Muller, A. E., Theuretzbacher, U. & Mouton, J. W. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 881–885 (2015).
123. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, 1–7 (2010).
124. Harrison, P. F., Lederberg, J. & eds. *Antimicrobial Resistance : Issues and Options*. (National Academies Press, 1998). doi:10.17226/6121
125. Levy, S. B. *The antibiotic paradox : how miracle drugs are destroying the miracle*. (Plenum Press, 1992).
126. World Health Organization. Antimicrobial resistance. *Fact Sheet 194* **317**, 609–610 (2014).
127. Jevons, P. M. ‘Celbenin’-resistant *Staphylococci*. *Br. Med. J.* **1**, 113–114 (1961).
128. Chambers, H. F. & Deleo, F. R. Waves of Resistance : *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 629–641 (2009).
129. Saga, T. & Yamaguchi, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Med. Assoc. J.* **52**, 103–108 (2009).
130. du Plessis, M. *et al.* *Neisseria meningitidis* Intermediately Resistant to Penicillin and Causing Invasive Disease in South Africa in 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3208–3214 (2008).
131. Chopra, I., Hesse, L. & O’Neill, A. in 213–225 (2002). doi:10.1016/S0165-

---

7208(02)80022-8

132. Wise, R. Antimicrobial resistance. *Br. Med. J.* **317**, 609–610 (1998).
133. Walker, D. & Fowler, T. Annual Report of the Chief Medical Officer Volume Two, 2011 Infections and the rise of antimicrobial resistance. *Dep. Heal.* (2011).
134. Global risks 2014. *Global risks 2014: Insight report. World Economic Forum* (2014).
135. Rai, J., Randhawa, G. K. & Kaur, M. Recent advances in antibacterial drugs. *Int. J. Appl. basic Med. Res.* **3**, 3–10 (2013).
136. Hampton, T. Report Reveals Scope of US Antibiotic Resistance Threat. *JAMA* **310**, 1661–1663 (2013).
137. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. *Bull. World Health Organ.* **61**, 383–394 (2014).
138. Rice, L. B. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **31**, S7–S10 (2010).
139. World Health Organisation. OMS | Résistance aux antimicrobiens. *WHO Aide-mémoire N°194*, (2016).
140. Hawkey, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *Br. Med. J.* **317**, 657–660 (1998).
141. Liu, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: Generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1393–1403 (2010).
142. Blake, K. L. & O'Neill, A. J. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 12–16 (2013).
143. Levy, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 65S–71S (2002).
144. Cattoir, V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol.*

- Biol.* **52**, 607–616 (2004).
145. Piddock, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 382–402 (2006).
146. Everett, M. J., Jin, Y. F., Ricci, V. & Piddock, L. J. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2380–2386 (1996).
147. Pumbwe, L. & Piddock, L. J. V. Two Efflux Systems Expressed Simultaneously in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2861–2864 (2000).
148. Kosmidis, C. *et al.* Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 204–209 (2012).
149. Olliver, A., Vallé, M., Chaslus-Dancla, E. & Cloeckaert, A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 267–272 (2004).
150. Kaatz, G. W., Thyagarajan, R. V & Seo, S. M. Effect of Promoter Region Mutations and *mgrA* Overexpression on Transcription of *norA*, Which Encodes a *Staphylococcus aureus* Multidrug Efflux Transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 161–169 (2005).
151. Webber, M. A., Talukder, A. & Piddock, L. J. V. Contribution of Mutation at Amino Acid 45 of AcrR to *acrB* Expression and Ciprofloxacin Resistance in Clinical and Veterinary *Escherichia coli* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4390–4392 (2005).
152. Abouzeed, Y. M., Baucheron, S. & Cloeckaert, A. *ramR* Mutations Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2428–2434 (2008).
153. Leclercq, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 482–492

- (2002).
154. Zhang, W.-J. *et al.* Characterization of the IncA/C plasmid pSCEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multiresistance gene *cfr*. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 385–389 (2014).
  155. Abraham, E. P. & Chain, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. *Reviews of Infectious Diseases* **10**, 677–678 (1988).
  156. Livermore, D. M. Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 3–10 (2008).
  157. Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R. & Livermore, D. M. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* **19**, 588–595 (2011).
  158. Johnson, A. P., Woodford, N. & Alan Johnson alanjohnson, C. P. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol.* **62**, 499–513 (2013).
  159. Wright, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1451–1470 (2005).
  160. McKenna, M. Antibiotic resistance: the last resort. *Nat. Publ. Gr.* **499**, 394–396 (2013).
  161. El-Halfawy, O. M., Valvano, M. A., Akhova, A., Nelis, H. & Coenye, T. Chemical Communication of Antibiotic Resistance by a Highly Resistant Subpopulation of Bacterial Cells. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
  162. de la Salud Bea, R., Ascuitto, M. R. & de Johnson, L. E. L. Synthesis of analogs of peptides from *Buthus martensii* scorpion venom with potential antibiotic activity. *Peptides* **68**, 228–232 (2014).
  163. Talan, D. A. *et al.* Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J. Infect. Dis.* **164**, 195–198 (1991).
  164. Falcao, C. B. *et al.* Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* **58**, 8553–8563 (2015).

- 
165. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
166. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. & Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207–215 (2012).
167. Park, S.-C., Park, Y. & Hahm, K.-S. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *Int. J. Mol. Sci* **12**, 5971–5992 (2011).
168. Dubos, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *bacillus*: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J. Exp. Med.* **70**, 1–10 (1939).
169. Dubos, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. *J. Exp. Med.* **70**, 11–17 (1939).
170. Hotchkiss, R. D. & Dubos, R. J. Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil *Bacillus*. *J. Biol. Chem.* **132**, 791–792 (1940).
171. Van Epps, H. L. & Dubos, R. J. Unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* **203**, 259 (2006).
172. Dubos, R. J. & Hotchkiss, R. D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. *J. Exp. Med.* **73**, 629–640 (1941).
173. Rammelkamp, C. H. & Weinstein, L. Toxic Effects of Tyrothricin, Gramicidin and Tyrocidine. *J. Infect. Dis.* **71**, 166–173 (1942).
174. Balls, A. K., Hale, W. S. & Harris, T. H. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.* **19**, 279–288 (1942).
175. Ohtani, K., Okada, T., Yoshizumi, H. & Kagamitama, H. Complete Primary Structures of Two Subunits of Purothionin A, a Lethal Protein for Brewer's Yeast from Wheat Flour. *J. Biochem.* **82**, 753–767 (1977).
176. Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575 (2013).
177. Fennell, J. F., Shipman, W. H. & Cole, L. J. Antibacterial action of a bee venom fraction
-

- (melittin) against a penicillin-resistant staphylococcus and other microorganisms. *Res. Dev. Tech. Rep.* 1–13 (1967).
178. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
179. Wang, Z. & Wang, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D590–D592 (2004).
180. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* **37**, D933–D937 (2009).
181. Wang, X. & Wang, G. Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. *Protein Pept. Lett.* **23**, 707–721 (2016).
182. Hancock, R. E. & Scott, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8856–8861 (2000).
183. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. & Lotfipour, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 723–736 (2012).
184. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. & Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 1–12 (2016).
185. Hancock, R. E. W. & Sahl, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551–1557 (2006).
186. Yeung, A. T. Y., Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2161–2176 (2011).
187. Hancock, R. E. W. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317–1323 (1999).
188. Lai, Y. & Gallo, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**, 131–141 (2009).
189. Nakatsuji, T. & Gallo, R. L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *J.*

- Invest. Dermatol.* **132**, 887–895 (2012).
190. Guilhelmelli, F. *et al.* Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* **4**, 1–12 (2013).
191. Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A. Amphipathic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4–30 (2000).
192. Gennaro, R. & Zanetti, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 31–49 (2000).
193. Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. & Malmsten, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 143–171 (2012).
194. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5449–5453 (1987).
195. Maloy, W. L. & Kari, U. P. Structure-Activity Studies on Magainins and Other Host-Defense Peptides. *Biopolymers* **37**, 105–122 (1995).
196. Gao, B. *et al.* Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* **92**, 350–359 (2010).
197. Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O. & Zhang, G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* **92**, 1236–1241 (2010).
198. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464–472 (2011).
199. Westerhoff, H. V., Juretić, D., Hendler, R. W. & Zasloff, M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6597–6601 (1989).
200. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**,

- 146–150 (2001).
201. Tarazi, S. Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents* **5**, 1–9 (2015).
202. Zhang, L., Rozek, A. & Hancock, R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 35714–35722 (2001).
203. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236–248 (2002).
204. Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* **1**, 143–152 (2010).
205. Oren, Z. & Shai, Y. A Class of Highly Potent Antibacterial Peptides Derived from Pardaxin, A Pore-Forming Peptide Isolated from Moses Sole Fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.* **237**, 303–310 (1996).
206. Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H.-G. & Shai, Y. The Consequence of Sequence Alteration of an Amphipathic  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptide and Its Diastereomers. *J. Biol. Chem.* **277**, 33913–33921 (2002).
207. Pace, C. N. & Scholtz, J. M. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys. J.* **75**, 422–427 (1998).
208. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491–511 (2006).
209. Dathe, M. & Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1462**, 71–87 (1999).
210. Uematsu, N. & Matsuzaki, K. Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys. J.* **79**, 2075–2083 (2000).
211. Dathe, M. *et al.* General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1558**, 171–186 (2002).

- 
212. Powers, J.-P. S. & Hancock, R. E. . The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681–1691 (2003).
213. Hallock, K. J., Lee, D.-K. & Ramamoorthy, A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys. J.* **84**, 3052–3060 (2003).
214. Epand, R. M. & Vogel, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1462**, 11–28 (1999).
215. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 37–51 (2011).
216. Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F. & Magarvey, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 980–987 (2016).
217. Papo, N. & Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* **24**, 1693–1703 (2003).
218. Bowdish, D., Davidson, D. & Hancock, R. A Re-evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 35–51 (2005).
219. Teixeira, V., Feio, M. J. & Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **51**, 149–177 (2012).
220. Park, C. B., Kim, H. S. & Kim, S. C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 253–257 (1998).
221. Xiong, Y., Bayer, A. S. & Yeaman, M. R. Inhibition of Intracellular Macromolecular Synthesis in *Staphylococcus aureus* by Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Proteins. *J. Infect. Dis.* **185**, 348–356 (2002).
222. Omardien, S., Brul, S. & Zaat, S. A. J. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front. cell Dev. Biol.* **4**, 1–16 (2016).

- 
223. Meroueh, S. O. *et al.* Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4404–4409 (2006).
224. Malanovic, N. & Lohner, K. Antimicrobial peptides targeting Gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals* **9**, 1–33 (2016).
225. Clifton, L. A. *et al.* Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir* **31**, 404–412 (2015).
226. Li, J. *et al.* Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 1112–1121 (2013).
227. Chen, F.-Y., Lee, M.-T. & Huang, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **84**, 3751–3758 (2003).
228. Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R. & Sathekge, M. M. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–15 (2014).
229. Chen, R. & Mark, A. E. The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: implications for binding and the mechanism of action. *Eur. Biophys. J.* **40**, 545–553 (2011).
230. Sani, M.-A. *et al.* Maculatin 1.1 disrupts *Staphylococcus aureus* lipid membranes via a pore mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3593–3600 (2013).
231. Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1376**, 391–400 (1998).
232. Leontiadou, H., Mark, A. E. & Marrink, S. J. Antimicrobial Peptides in Action. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12156–12161 (2006).
233. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. & Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**, 1475–1485 (2001).
234. Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E. & Marrink, S.-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*
-

- 1778, 2308–2317 (2008).
235. Lee, M.-T., Sun, T.-L., Hung, W.-C. & Huang, H. W. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14243–14248 (2013).
236. Leveritt, J. M., Pino-Angeles, A., Lazaridis, T. & Lazaridis, T. The structure of a melittin-stabilized pore. *Biophys. J.* **108**, 2424–2426 (2015).
237. Porcelli, F. *et al.* Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 45815–45823 (2004).
238. Ramamoorthy, A., Lee, D.-K., Narasimhaswamy, T. & Nanga, R. P. R. Cholesterol reduces pardaxin's dynamics-a barrel-stave mechanism of membrane disruption investigated by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 223–227 (2010).
239. Fernandez, D. I. *et al.* The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 15739–15751 (2012).
240. Szleifer, I., Kramer, D., Ben-Shaul, A., Roux, D. & Gelbart, W. M. Curvature Elasticity of Pure and Mixed Surfactant Films. *Phys. Rev. Lett.* **60**, 1966–1969 (1988).
241. Stevens, M. J. Coarse-grained simulations of lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* **121**, 11942–11948 (2004).
242. Dimroth, P., Kaim, G. & Matthey, U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J. Exp. Biol.* **203**, 51–59 (2000).
243. Lee, M.-T., Chen, F.-Y. & Huang, H. W. Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides. *Biochemistry* **43**, 3590–3599 (2004).
244. Mihajlovic, M. & Lazaridis, T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1485–1493 (2010).
245. Bertelsen, K., Dorosz, J., Hansen, S. K., Nielsen, N. C. & Vosegaard, T. Mechanisms of peptide-induced pore formation in lipid bilayers investigated by oriented <sup>31</sup>P solid-state NMR spectroscopy. *PLoS One* **7**, e47745 : 1-12 (2012).
246. Baumann, G. & Mueller, P. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* **2**, 538–557 (1974).

- 
247. Rashid, R., Veleba, M. & Kline, K. A. Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 1–13 (2016).
248. Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I. & Hong, M. Solid-State NMR Investigations of Peptide–Lipid Interaction and Orientation of a  $\beta$ -Sheet Antimicrobial Peptide, Protegrin. *Biochemistry* **41**, 9852–9862 (2002).
249. Ludtke, S. J. *et al.* Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry* **35**, 13723–13728 (1996).
250. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. *Biochemistry* **35**, 11361–11368 (1996).
251. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1462**, 55–70 (1999).
252. Ladokhin, A. S. & White, S. H. ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1514**, 253–260 (2001).
253. Otvos, L. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J. Pept. Sci.* **11**, 697–706 (2005).
254. Chen, L. & Harrison, S. D. Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 821–825 (2007).
255. Shah, P., Hsiao, F. S. H., Ho, Y. H. & Chen, C. S. The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. *Proteomics* **16**, 1225–1237 (2016).
256. Collin, F., Thompson, R. E., Jolliffe, K. A., Payne, R. J. & Maxwell, A. Fragments of the Bacterial Toxin Microcin B17 as Gyrase Poisons. *PLoS One* **8**, e61459 : 1-9 (2013).
257. Peschel, A. & Sahl, H.-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 529–536 (2006).
258. Andersson, D. I., Hughes, D. & Kubicek-Sutherland, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* **26**,
-

- 43–57 (2016).
259. Gruenheid, S. & Le Moual, H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 81–89 (2012).
260. Hankins, J. V., Madsen, J. A., Giles, D. K., Brodbelt, J. S. & Trent, M. S. Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8722–8727 (2012).
261. Li, M. *et al.* The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1136–1147 (2007).
262. Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E. & Ochoa-Zarzosa, A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**, 180–195 (2013).
263. Brown, S., Santa Maria, J. P., Walker, S. & Walker, S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 313–336 (2013).
264. Koprivnjak, T. *et al.* Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 3622–3630 (2006).
265. Peschel, A. *et al.* Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **274**, 8405–8410 (1999).
266. Cao, M. & Helmann, J. D. The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function  $\sigma^X$  factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* **186**, 1136–1146 (2004).
267. Saar-Dover, R. *et al.* D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B Streptococcus by Increasing the Cell Wall Density. *PLoS Pathog.* **8**, e1002891 : 1-13 (2012).
268. Kristian, S. A. *et al.* D-alanylation of teichoic acids promotes group a streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* **187**, 6719–6725 (2005).
269. Andrä, J., Goldmann, T., Ernst, C. M., Peschel, A. & Gutschmann, T. Multiple peptide

- resistance factor (MprF)-mediated Resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **286**, 18692–18700 (2011).
270. Ernst, C. M. *et al.* The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathog.* **5**, 1–9 (2009).
271. Peschel, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* **193**, 1067–1076 (2001).
272. Klein, S. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Mol. Microbiol.* **71**, 551–565 (2009).
273. Johnston, N. C. *et al.* Phospholipids of *Clostridium perfringens* : a reexamination. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 65–68 (2004).
274. Mishra, N. N. *et al.* Daptomycin Resistance in Enterococci Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content. *PLoS One* **7**, e43958 : 1-10 (2012).
275. Cox, E., Michalak, A., Pagentine, S., Seaton, P. & Pokorny, A. Lysylated phospholipids stabilize models of bacterial lipid bilayers and protect against antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 2198–2204 (2014).
276. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **68**, 6139–6146 (2000).
277. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science (80-. )*. **276**, 250–253 (1997).
278. Guo, L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189–198 (1998).

- 
279. Bijlsma, J. J. E. & Groisman, E. A. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**, 359–366 (2003).
280. Lacour, S., Bechet, E., Cozzone, A. J., Mijakovic, I. & Grangeasse, C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One* **3**, e3053 : 1-9 (2008).
281. P76373 (UDG\_ECOLI) - UDP-glucose 6-dehydrogenase. *UniProt: the universal protein knowledgebase*
282. Gunn, J. S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* **16**, 284–290 (2008).
283. McPhee, J. B., Lewenza, S. & Hancock, R. E. W. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**, 205–217 (2003).
284. Shi, Y., Cromie, M. J., Hsu, F.-F., Turk, J. & Groisman, E. A. PhoP-regulated *Salmonella* resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Mol. Microbiol.* **53**, 229–241 (2004).
285. Shi, Y., Latifi, T., Cromie, M. J. & Groisman, E. A. Transcriptional Control of the Antimicrobial Peptide Resistance *ugtL* Gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA Regulatory Proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 38618–38625 (2004).
286. Tran, A. X. *et al.* The Lipid A 1-Phosphatase of *Helicobacter pylori* Is Required for Resistance to the Antimicrobial Peptide Polymyxin. *J. Bacteriol.* **188**, 4531–4541 (2006).
287. Cui, L. *et al.* Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5–14 (2003).
288. Mishra, N. N. *et al.* Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Host Defense Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 526–531 (2011).
-

- 
289. Needham, B. D. & Trent, M. S. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 467–481 (2013).
290. Band, V. & Weiss, D. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **4**, 18–41 (2014).
291. Dalebroux, Z. D., Matamouros, S., Whittington, D., Bishop, R. E. & Miller, S. I. PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella Typhimurium* outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1963–1968 (2014).
292. Jones, T. *et al.* Failures in Clinical Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection with Daptomycin Are Associated with Alterations in Surface Charge, Membrane Phospholipid Asymmetry, and Drug Binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 269–278 (2008).
293. Spinosa, M. R. *et al.* The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect. Immun.* **75**, 3594–3603 (2007).
294. Jones, A., Geörg, M., Maudsdotter, L. & Jonsson, A.-B. Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to *Neisseria meningitidis* resistance to the human antimicrobial peptide LL-37. *J. Bacteriol.* **191**, 3861–3868 (2009).
295. Nawrocki, K., Crispell, E. & McBride, S. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics* **3**, 461–492 (2014).
296. Campos, M. A. *et al.* Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**, 7107–7114 (2004).
297. Koprivnjak, T. & Peschel, A. Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2243–2254 (2011).
298. Llobet, E., Tomás, J. M. & Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**, 3877–3886 (2008).
299. Sutherland, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3–9 (2001).
300. Herasimenka, Y. *et al.* Interaction of antimicrobial peptides with bacterial

- polysaccharides from lung pathogens. *Peptides* **26**, 1127–1132 (2005).
301. Foschiatti, M., Cescutti, P., Tossi, A. & Rizzo, R. Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides. *Mol. Microbiol.* **72**, 1137–1146 (2009).
302. Kai-Larsen, Y. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog.* **6**, e1001010 : 1-16 (2010).
303. Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 317–364 (2008).
304. Parra-Lopez, C., Baer, M. T. & Groisman, E. A. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **12**, 4053–4062 (1993).
305. Shelton, C. L., Raffel, F. K., Beatty, W. L., Johnson, S. M. & Mason, K. M. Sap Transporter Mediated Import and Subsequent Degradation of Antimicrobial Peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002360 : 1-11 (2011).
306. Rieg, S., Huth, A., Kalbacher, H. & Kern, W. V. Resistance against antimicrobial peptides is independent of *Escherichia coli* AcrAB, *Pseudomonas aeruginosa* MexAB and *Staphylococcus aureus* NorA efflux pumps. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**, 174–176 (2009).
307. Aires, J. R. & Nikaido, H. Aminoglycosides Are Captured from both Periplasm and Cytoplasm by the AcrD Multidrug Efflux Transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 1923–1929 (2005).
308. Tzeng, Y.-L. *et al.* Cationic Antimicrobial Peptide Resistance in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **187**, 5387–5396 (2005).
309. Kupferwasser, L. I. *et al.* Plasmid-mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in *staphylococci*: role of the *qacA* locus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2395–2399 (1999).
310. Belas, R., Manos, J. & Suvanasuthi, R. *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. *Infect.*

- 
- Immun.* **72**, 5159–5167 (2004).
311. Hui, C.-Y. *et al.* *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol. Immunol.* **54**, 452–459 (2010).
312. McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S. & Kuehn, M. J. Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability. *J. Bacteriol.* **188**, 5385–5392 (2006).
313. Kuehn, M. J. & Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–2655 (2005).
314. Maisey, H. C. *et al.* A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J.* **22**, 1715–1724 (2008).
315. Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T. & Lee, B.-J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* **17**, 12276–12286 (2012).
316. Dryden, M. S. Complicated skin and soft tissue infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, iii35–iii44 (2010).
317. Dai, C. *et al.* Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3967–3972 (2008).
318. Zhao, Z. *et al.* Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3472–3477 (2009).
319. Bao, A. *et al.* A novel cysteine-free venom peptide with strong antimicrobial activity against antibiotics-resistant pathogens from the scorpion *Opisthophthalmus glabrifrons*. *J. Pept. Sci.* **21**, 758–764 (2015).
320. Naghmouchi, K., Le Lay, C., Baah, J. & Drider, D. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Res. Microbiol.* **163**, 101–108 (2012).
321. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* **15**, 40–56 (2010).
322. McGregor, D. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr. Opin.*
-

- 
- Pharmacol.* **8**, 616–619 (2008).
323. Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P. & Martins, M. C. L. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* **7**, 1431–1440 (2011).
324. Kosikowska, P. & Lesner, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 689–702 (2016).
325. Lee, I. H., Cho, Y. & Lehrer, R. I. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect. Immun.* **65**, 2898–2903 (1997).
326. Rozek, A., Powers, J.-P. S., Friedrich, C. L. & Hancock, R. E. W. Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability. *Biochemistry* **42**, 14130–14138 (2003).
327. Hong, S. Y., Oh, J. E. & Lee, K.-H. Effect of d-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1775–1780 (1999).
328. Berthold, N. *et al.* Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by Gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 402–409 (2013).
329. Carmona, G., Rodriguez, A., Juarez, D., Corzo, G. & Villegas, E. Improved Protease Stability of the Antimicrobial Peptide Pin2 Substituted with d-Amino Acids. *Protein J.* **32**, 456–466 (2013).
330. Brinckerhoff, L. H. *et al.* Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic mart-1<sub>27-35</sub> peptide: Implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer* **83**, 326–334 (1999).
331. Rink, R. *et al.* To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **61**, 210–218 (2010).
332. Ciornei, C. D., Sigurdardóttir, T., Schmidtchen, A. & Bodelsson, M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**,
-

- 2845–2850 (2005).
333. Dorschner, R. A. *et al.* The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* **20**, 35–42 (2006).
334. Björn, C. *et al.* Anti-infectious and anti-inflammatory effects of peptide fragments sequentially derived from the antimicrobial peptide centrocin 1 isolated from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *AMB Express* **2**, 1–12 (2012).
335. Svenson, J., Brandsdal, B.-O., Stensen, W. & Svendsen, J. S. Albumin Binding of Short Cationic Antimicrobial Micropeptides and Its Influence on the in vitro Bactericidal Effect. *J. Med. Chem.* **50**, 3334–3339 (2007).
336. Starr, C. G., He, J. & Wimley, W. C. Host Cell Interactions Are a Significant Barrier to the Clinical Utility of Peptide Antibiotics. *ACS Chem. Biol.* **11**, 3391–3399 (2016).
337. Zelezetsky, I. & Tossi, A. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1436–1449 (2006).
338. Koh, J.-J. *et al.* N-Lipidated Peptide Dimers: Effective Antibacterial Agents against Gram-Negative Pathogens through Lipopolysaccharide Permeabilization. *J. Med. Chem.* **58**, 6533–6548 (2015).
339. Fotakis, G. & Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**, 171–177 (2006).
340. Falagas, M. E. & Kasiakou, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit. Care* **10**, R27 : 1-13 (2006).
341. Carmona-Ribeiro, A. M. & de Melo Carrasco, L. D. Novel formulations for antimicrobial peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18040–18083 (2014).
342. Valerio Jr., L. G. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **241**, 356–370 (2009).
343. Eckert, R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial

- peptide development. *Future Microbiol.* **6**, 635–651 (2011).
344. Zhang, L., Pornpattananankul, D., Hu, C.-M. & Huang, C.-M. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Curr. Med. Chem.* **17**, 585–594 (2010).
345. Witting, M., Obst, K., Friess, W. & Hedtrich, S. Recent advances in topical delivery of proteins and peptides mediated by soft matter nanocarriers. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1355–1369 (2015).
346. Sandreschi, S., Piras, A. M., Batoni, G. & Chiellini, F. Perspectives on polymeric nanostructures for the therapeutic application of antimicrobial peptides. *Nanomedicine* **11**, 1729–1744 (2016).
347. Ragioto, D. A. M. T., Carrasco, L. D. M. & Carmona-Ribeiro, A. M. Novel gramicidin formulations in cationic lipid as broad-spectrum microbicidal agents. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3183–3192 (2014).
348. Eckert, R. *et al.* Adding selectivity to antimicrobial peptides: rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1480–1488 (2006).
349. Marr, A., Gooderham, W. & Hancock, R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 468–472 (2006).
350. Bray, B. L. Innovation: Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 587–593 (2003).
351. Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **33**, 239–254 (2006).
352. Raibaut, L., El Mahdi, O. & Melnyk, O. in *Topics in Current Chemistry* 103–154 (Springer, Cham, 2014). doi:10.1007/128\_2014\_609
353. Mygind, P. H. *et al.* Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* **437**, 975–980 (2005).
354. Won, H.-S., Jung, S.-J., Kim, H. E., Seo, M.-D. & Lee, B.-J. Systematic peptide engineering and structural characterization to search for the shortest antimicrobial

- peptide analogue of gaegurin 5. *J. Biol. Chem.* **279**, 14784–14791 (2004).
355. Won, H.-S. *et al.* Structural Determinants for the Membrane Interaction of Novel Bioactive Undecapeptides Derived from Gaegurin 5. *J. Med. Chem.* **49**, 4886–4895 (2006).
356. Duquesne, S. *et al.* Post-translational modification and folding of a lasso-type gene-encoded antimicrobial peptide require two enzymes only in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **611**, 35–36 (2009).
357. Bagheri, M., Beyermann, M. & Dathe, M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1132–1141 (2009).
358. Bader, M. W. *et al.* Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase. *Cell* **122**, 461–472 (2005).
359. Fox, J. L. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat. Biotechnol.* **31**, 379–382 (2013).
360. Conlon, J. M. *et al.* The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae). *Peptides* **30**, 1069–1073 (2009).
361. Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D. & Yu, X. Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5807–5822 (2014).
362. Microbiology., U. D. of P. and. The Antimicrobial Peptide Database. Available online: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
363. Conde, R., Zamudio, F. Z. & Rodr, M. H. Scorpine , an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* **471**, 165–168 (2001).
364. Ciscotto, P. *et al.* Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* **53**, 330–341 (2009).
365. Samy, R. P. *et al.* Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*).

- 
- PLoS One* **9**, e80199 : 1-16 (2014).
366. San, T. M., Vejayan, J., Shanmugan, K. & Ibrahim, H. Screening Antimicrobial Activity of Venoms from Snakes Commonly Found in Malaysia. *J. Appl. Sci.* **10**, 2328–2332 (2010).
367. Castro, H. C. *et al.* Comparative analysis of *Viperidae* venoms antibacterial profile: A short communication for proteomics. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2011**, 1–4 (2011).
368. Cendron, L. H. *et al.* Broad Antibacterial Activity of *Bothrops jararaca* Venom against Bacterial Clinical Isolates. *Adv. Microbiol.* **4**, 1174–1187 (2014).
369. Blaylock, R. S. M. Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. *Toxicon* **38**, 1529–1534 (2000).
370. Mosca, R. C. & Nanci Do Nascimento, N. An *in vitro* preliminary study on the growth inhibition of oral microbiota by snake venom. *J. Dent. Oral Hyg.* **3**, 114–118 (2011).
371. Jenkins, S. G. & Schuetz, A. N. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.* **87**, 290–308 (2012).
372. Jiang, L. *et al.* Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 956–963 (2013).
373. Bopp, C. A., Ries, A. A. & Wells, J. G. Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera. *World Heal. Organ. / Centers Dis. Control Prev.* **8**, 1–108 (1999).
374. Rios, J. L., Recio, M. C. & Villar, a. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 127–149 (1988).
375. Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1749–1755 (2009).
-

- 
376. Luc, M. *A Comparison of Disc Diffusion and Microbroth Dilution Methods for the Detection of Antibiotic Resistant Subpopulations in Gram Negative Bacilli*. (2015).
377. Hoelzer, K. *et al.* Agar disk diffusion and automated microbroth dilution produce similar antimicrobial susceptibility testing results for *Salmonella* serotypes Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i-, but differ in economic cost. *Foodborne Pathog. Dis.* **8**, 1281–1288 (2011).
378. Pellucuer, S., Allegrini, J. & Simeon de Buochberg, M. Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Rev. l'Institut Pasteur Lyon* **9** 135–159 (1976).
379. Yousef, R. T. & Tawil, G. G. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* **35**, 698–701 (1980).
380. Valgas, C., Souza, S. M. De, Smânia, E. F. a & Artur, S. J. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian J. Microbiol.* **38**, 369–380 (2007).
381. Whithear, K. G., Bowtell, D. D., Ghiocas, E. & Hughes, K. L. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis.* **27**, 937–949
382. Thwaite, J. E., Hibbs, S., Titball, R. W. & Atkins, T. P. Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2316–2322 (2006).
383. Zhou, G., Shi, Q. S., Huang, X. M. & Xie, X. B. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 21711–21733 (2015).
384. Pantera, B. *et al.* Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1623**, 72–81 (2003).
385. Daglio, A. *Les Guêpes Sociales (Hymenoptera: Vespidae) D'Europe Occidentale et Septentrionale*. (1972).
386. Severino, M. G. *et al.* European *Polistes* venom allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **61**, 860–863 (2006).

- 
387. Konno, K., Kazuma, K. & Nihei, K. Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. *Toxins (Basel)*. **8**, 1–11 (2016).
388. Evans, D. L. & Schmidt, J. O. *Insect defenses : adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*. (State University of New York Press, 1990).
389. Lee, S. H., Baek, J. H. & Yoon, K. A. Differential properties of venom peptides and proteins in solitary vs. Social hunting wasps. *Toxins (Basel)*. **8**, 1–29 (2016).
390. Moreau, S. J. M. & Asgari, S. Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions. *Toxins (Basel)*. **7**, 2385–2412 (2015).
391. Piek, T. *Venoms of the Hymenoptera : biochemical, pharmacological, and behavioural aspects*. (Academic Press, 1986).
392. Yang, X., Wang, Y., Lee, W. H. & Zhang, Y. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* **74**, 151–157 (2013).
393. Buck, M. A., Olah, T. A., Weitzmann, C. J. & Cooperman, B. S. Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. *Anal. Biochem.* **182**, 295–299 (1989).
394. Aguilar, M.-I. *HPLC of peptides and proteins : methods and protocols*. (Humana Press, 2004).
395. Turillazzi, S. *et al.* Dominulin A and B: Two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 376–383 (2006).
396. Cociancich, S. *et al.* Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.* **300**, 567–575 (1994).
397. Hara, S. & Yamakawa, M. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **310**, 651–656 (1995).
398. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. & Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344 (1999).
399. Silva, J. C. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan Polybia-MPII
-

- isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia vespiceps testacea* (Vespidae, Hymenoptera). *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 167–175 (2017).
400. Crankshaw, M. W. & Grant, G. A. *Identification of Modified PTH-Amino Acids in Protein Sequence Analysis*. (1993).
401. Drapeau, G. R., Boily, Y. & Houmard, J. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**, 6720–6726 (1972).
402. Zee, B. M. & Garcia, B. A. Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays Biochem.* **52**, 147–163 (2012).
403. Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169–184 (2004).
404. Rydlo, T., Miltz, J. & Mor, A. Eukaryotic Antimicrobial Peptides: Promises and Premises in Food Safety. *J. Food Sci.* **71**, R125–R135 (2006).
405. Stow, A. & Beattie, A. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 1009–1013 (2008).
406. Konno, K. *et al.* Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon* **38**, 1505–1515 (2000).
407. Mendes, M. A., De Souza, B. M. & Palma, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon* **45**, 101–106 (2005).
408. Souza, B. M. *et al.* Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* **26**, 2157–2164 (2005).
409. Čeřovský, V., Pohl, J., Yang, Z., Alam, N. & Attygalle, A. B. Identification of three novel peptides isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polistes major major*. *J. Pept. Sci.* **13**, 545–550 (2007).
410. de Souza, B. M. *et al.* Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides

- from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* **30**, 1387–1395 (2009).
411. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B. & Drin, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. *Bioinformatics* **24**, 2101–2102 (2008).
412. Wang, K. *et al.* Membrane perturbation action mode and structure-activity relationships of protonectin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4632–4639 (2013).
413. Carpenter, J. M. in *Natural History and Evolution of Paper Wasps* (ed. Stefano Turillazi & Marie-Jane West-Eberhard) 18–57 (Oxford Univ. Press, 1996).
414. Kovac, H., Käfer, H., Petrocelli, I. & Stabentheiner, A. Comparison of thermal traits of *Polistes dominula* and *Polistes gallicus*, two European paper wasps with strongly differing distribution ranges. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **187**, 277–290 (2017).
415. Murata, K. *et al.* Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2493–2497 (2006).
416. Eckert, R. H. *et al.* Targeted antimicrobial moieties - US8389679 B2. 0–143 (2013). doi:10.1016/j.(73)
417. Dohtsu, K., Okumura, K., Hagiwara, K., Palma, M. S. & Nakajima, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera-Vespidae). *Nat. Toxins* **1**, 271–276 (1993).
418. Mendes, M. A., Monson de Souza, B., Delazari dos Santos, L. & Palma, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 636–642 (2004).
419. Baptista-Saidemberg, N. B. *et al.* Protonectin (1-6): A novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* **56**, 880–889 (2010).
420. Wade, D. *et al.* All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4761–4765 (1990).

- 
421. Zhao, Y. *et al.* Antimicrobial activity and stability of the D-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide polybia-MPI. *AMB Express* **6**, 1–11 (2016).
422. Qiu, S. *et al.* Antimicrobial activity and stability of protonectin with D-amino acid substitutions. *J. Pept. Sci.* **23**, 392–402 (2017).
423. Padmaja Juvvadi, Satyanarayana Vunnam, A. & Merrifield, R. B. Synthetic Melittin, Its Enantio, Retro, and Retroenantio Isomers, and Selected Chimeric Analogs: Their Antibacterial, Hemolytic, and Lipid Bilayer Action. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8989–8997 (1996).
424. Moerman, L. *et al.* Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4799–4810 (2002).
425. Vila-Farrés, X., Giralt, E. & Vila, J. Update of peptides with antibacterial activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 6188–6198 (2012).
426. Cajal, Y. & Jain, M. K. Synergism between mellitin and phospholipase A2 from bee venom: Apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. *Biochemistry* **36**, 3882–3893 (1997).
427. Jamieson, G. A. (Graham A. . & Robinson, D. M. (David M. *Mammalian cell membranes. Volume Two, The diversity of membranes.* (1977).
428. Niven, G. W. & Mulholland, F. Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: The detection of a population of permeable cells in post-logarithmic phase cultures. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 90–96 (1998).
429. Di Pasquale, E. *et al.* Biophysical studies of the interaction of squalamine and other cationic amphiphilic molecules with bacterial and eukaryotic membranes: importance of the distribution coefficient in membrane selectivity. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 131–140 (2010).
430. Invitrogen. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain. *Mol. Probes - Invit. Detect. Technol.* 1–5 (2006). doi:10.1101/pdb.caut676
431. Páramo, L. *et al.* Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2
-

- from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* **253**, 452–461 (1998).
432. Wang, K. *et al.* Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3318–3323 (2012).
433. Katsu, T., Nakagawa, H. & Yasuda, K. Interaction between Polyamines and Bacterial Outer Membranes as Investigated with Ion-Selective Electrodes Interaction between Polyamines and Bacterial Outer Membranes as Investigated with Ion-Selective Electrodes. *Society* **46**, 1073–1079 (2002).
434. Savage, P. B., Li, C., Taotafa, U., Ding, B. & Guan, Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 1–7 (2002).
435. Vaaral, M. & Vaara, T. Polycations as Outer Membrane-Disorganizing Agents. **24**, 114–122 (1983).
436. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. & Fridkin, M. The Functional Association of Polymyxin B with Bacterial Lipopolysaccharide Is Stereospecific: Studies on Polymyxin B Nonapeptide Articles The Functional Association of Polymyxin B with Bacterial Lipopolysaccharide Is Stereospecific: Studies on Polymyxin. *Biochemistry* **39**, 1–7 (2000).
437. Bai, Y. *et al.* Progressive Structuring of a Branched Antimicrobial Peptide on the Path to the Inner Membrane Target. *J. Biol. Chem.* **287**, 26606–26617 (2012).
438. Guo, L., Smith-Dupont, K. B. & Gai, F. Diffusion as a Probe of Peptide-Induced Membrane Domain Formation. *Biochemistry* **50**, 2291–2297 (2011).
439. Qian, S. & Heller, W. T. Peptide-Induced Asymmetric Distribution of Charged Lipids in a Vesicle Bilayer Revealed by Small-Angle Neutron Scattering. *J. Phys. Chem. B* **115**, 9831–9837 (2011).
440. Maget-Dana, R. The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1462**, 109–140 (1999).

- 
441. Rivière-Cantin, S. Morphologie et propriétés élastiques de phases hexatiques dans des films monomoléculaires d'acides gras. (Université Paris VI, 2002).
442. Schröder, J. M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 121–134 (1999).
443. Ksenzhek, O. S., Gevod, V. S., Omel'chenko, A. M., Semenov, S. N. & Sotnichenko, A. I. Interaction of cardiotoxin from the venom of the cobra *Naja naja oxiana* with phospholipid membrane model systems. *Mol. Biol. (Mosk)*. **12**, 1057–1065 (1978).
444. Eytan, G. D. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **694**, 185–202 (1982).
445. Demel, R. A. Monomolecular layers in the study of biomembranes. *Subcell. Biochem.* **23**, 83–120 (1994).
446. Epanand, R. M. & Epanand, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Mol. Biosyst.* **5**, 580–587 (2009).
447. Gallagher, P. G. Red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* 47–52 (2017). doi:10.1182/asheducation-2005.1.13
448. Calvez, P., Bussièrès, S., Demers, E. & Salesse, C. Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie* **91**, 718–733 (2009).
449. Owen, J. S., Bruckdorfer, K. R., Day, R. C. & McIntyre, N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* **23**, 124–132 (1982).
450. Gutberlet, T., Markwitz, S., Labischinski, H. & Bradaczek, H. Monolayer investigations on the bacterial amphiphile lipoteichoic acid and on lipoteichoic acid/dipalmitoylphosphatidylglycerol mixtures. *Makromol. Chemie. Macromol. Symp.* **46**, 283–287 (1991).
451. Labischinski, H., Naumann, D. & Fischer, W. Small and medium-angle X-ray analysis of bacterial lipoteichoic acid phase structure. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1269–1274 (1991).
452. Mérens, A., Delacour, H., Plésiat, P., Cavallo, J.-D. & Jeannot, K. *Pseudomonas*

- aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Rev. Francoph. des Lab.* **2011**, 49–62 (2011).
453. Jeannot, K. *et al.* Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2455–2462 (2008).
454. Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* **2**, 1–13 (2011).
455. Schurek, K. N., Breidenstein, E. B. M. & Hancock, R. E. W. in *Antibiotic Discovery and Development* 679–715 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-1400-1\_21
456. Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol.* **4**, 1–8 (2013).
457. Report, S. *ECDC surveillance report Europe 2015*. (2015).
458. Sahm, D. F., Marsilio, M. K. & Piazza, G. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with the Surveillance Network Database--USA. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 259–263 (1999).
459. Diekema, D. J. *et al.* and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 114–32 (2001).
460. Michel, M., Pharm, B. & Sc, M. Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez un patient adulte hospitalisé: quel antibiotique choisir? *Pharmactuel* **46**, 23–33 (2013).
461. Berger-Bächi, B. & Rohrer, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch. Microbiol.* **178**, 165–171 (2002).
462. Kingston, A. W., Liao, X. & Helmann, J. D. Contributions of the  $\sigma^W$ ,  $\sigma^M$  and  $\sigma^X$  regulons to the lantibiotic resistome of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **90**, 502–518 (2013).
463. Stone, A. V *et al.* Biomedical Applications of Nisin. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1449–1465 (2016).
464. Bierbaum, G. & Sahl, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 2–18 (2009).

- 
465. Mantovani, H. C. & Russell, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 808–813 (2001).
466. Kramer, N. E., van Hijum, S. A. F. T., Knol, J., Kok, J. & Kuipers, O. P. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1753–1761 (2006).
467. Kramer, N. E. *et al.* Increased D-alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **154**, 1755–1762 (2008).
468. Pappas, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **62**, e1–e50 (2015).
469. Williams, D. & Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J. Oral Microbiol.* **3**, 1–11 (2011).
470. Chen, W. *et al.* Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor Fabricius*. *Peptides* **29**, 1887–1892 (2008).
471. Wang, K. *et al.* Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 2365–2373 (2015).
472. Wang, K. *et al.* Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. *J. Pept. Sci.* **22**, 28–35 (2016).
473. Mebs, D. & Pogoda, W. Variability of alkaloids in the skin secretion of the European fire salamander (*Salamandra salamadra terrestris*). *Toxicon* **45**, 603–606 (2005).
474. von Byern, J. *et al.* Salamanders on the bench – A biocompatibility study of salamander skin secretions in cell cultures. *Toxicon* **135**, 24–32 (2017).
475. Preusser, H. J., Habermehl, G., Sablofski, M. & Schmall-Haury, D. Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. *Toxicon* **13**, 285–288 (1975).

- 
476. Bettin, C. & Greven, H. Bacteria on the skin of *Salamandra salamandra*. *Zool. Anz.* **216**, 267–270 (1986).
477. Lai, R., Yang, D.-M., Lee, W.-H. & Zhang, Y. Biological activities of skin secretions of the salamander *Tylototriton verrucosus*. *J. Nat. Toxins* **11**, 245–250 (2002).
478. Meng, P. *et al.* The first salamander defensin antimicrobial peptide. *PLoS One* **8**, 1–5 (2013).
479. Hamilton, R. W. N-amino-17 $\alpha$ -Aza-D-homoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol and hydrazones thereof - US3374233A. 17–20 (1968).
480. Vik, A. *et al.* (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **69**, 381–386 (2006).
481. Proszenyák, A. *et al.* Synthesis, antimicrobial and antineoplastic activities for agelasine and agelasimine analogs with a  $\beta$ -cyclocitral derived substituent. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **340**, 625–634 (2007).
482. Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K. & Strong, P. N. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon* **88**, 115–137 (2014).
483. Freitas, M. A. *et al.* Citrate is a major component of snake venoms. *Toxicon* **30**, 461–464 (1992).
484. Fenton, A. W. *et al.* Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A2. *Toxicon* **33**, 763–770 (1995).
485. Francis, B., Seebart, C. & Kaiser, I. I. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* **30**, 1239–1246 (1992).
486. Odell, G. V. *et al.* Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon* **36**, 1801–1806 (1998).
487. Daly, C. G. Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces *in vitro*. *J. Clin. Periodontol.* **9**, 386–392 (1982).
488. Shanbrom, E. Use of citric acid as antimicrobial agent or enhancer or as anticancer agent - WO2002034293 A2. (2001).
-

- 
489. Fong, D., Gaulin, C., Lê, M.-L. & Shum, M. Efficacité des agents antimicrobiens de substitution pour la désinfection des surfaces dures. *Cent. Collab. Natl. en Santé Environnementale* 1–22 (2011).
490. Bjornsdottir, K., Breidt, F. J. & Mcfeeters, R. F. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 660–664 (2006).
491. Zhao, X., Zhen, Z., Wang, X. & Guo, N. Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Addit. Contam. Part A* **25**, 1–11 (2017).
492. Yang, H., Kendall, P. a, Medeiros, L. & Sofos, J. N. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella typhimurium* with compounds available in households. *J. Food Prot.* **72**, 1201–1208 (2009).
493. Chang, C. C. & Lee, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **144**, 241–257 (1963).
494. Lee, C. Y. Chemistry and Pharmacology of Polypeptide Toxins in Snake Venoms. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**, 265–286 (1972).
495. Sine, S. M., Huang, S., Li, S.-X., Dacosta, C. J. B. & Chen, L. Inter-residue coupling contributes to high-affinity subtype- selective binding of  $\alpha$ -bungarotoxin to nicotinic receptors. *Biochem. J.* **454**, 311–321 (2013).
496. Alexander, S. P. *et al.* The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Overview. *Br. J. Pharmacol.* **16**, 5729–5743 (2015).
497. Bagal, S. K., Marron, B. E., Owen, R. M., Storer, R. I. & Swain, N. A. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels* **9**, 360–366 (2015).
498. S.K., B. *et al.* Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective. *J. Med. Chem.* **56**, 593–624 (2013).
499. Bagal, S. K. *et al.* Recent progress in sodium channel modulators for pain. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* **24**, 3690–3699 (2014).
-

- 
500. Brouwer, B. A. *et al.* Painful neuropathies: The emerging role of sodium channelopathies. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **19**, 53–65 (2014).
501. De Lera Ruiz, M. & Kraus, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* **58**, 7093–7118 (2015).
502. Isom, L. L. *et al.* Structure and Function ou the  $\beta 2$  subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**, 433–442 (1995).
503. Isom, L. L. Sodium Channel  $\beta$  Subunits: Anything but Auxiliary. *Neurosci.* **7**, 42–54 (2001).
504. Narahashi, T. Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *J. Gen. Physiol.* **47**, 965–974 (1964).
505. Catterall, W. a & Nirenberg, M. Sodium uptake associated with activation of action potential ionophores of cultured neuroblastoma and muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3759–3763 (1973).
506. Mattei, C. & Legros, C. The voltage-gated sodium channel: A major target of marine neurotoxins. *Toxicon* **91**, 84–95 (2014).
507. Bourdain, F. & Fontaine, B. Canaux ioniques dépendants du voltage et maladies neuromusculaires. *EMC - Neurol.* **2**, 403–429 (2005).
508. Catterall, W. a, Goldin, A. L. & Waxman, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 397–409 (2005).
509. Liu, J., Tu, H., Zhang, D., Zheng, H. & Li, Y.-L. Voltage-gated sodium channel expression and action potential generation in differentiated NG108-15 cells. *BMC Neurosci.* **13**, 1–9 (2012).
510. Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S. & Avoli, M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* **9**, 413–424 (2010).
511. England, S. Voltage-gated sodium channels: the search for subtype-selective analgesics.
-

- 
- Expert Opin. Investig. Drugs* **17**, 1849–1864 (2008).
512. Holland, K. D. *et al.* Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neurosci. Lett.* **433**, 65–70 (2008).
513. Bhattacharya, A., Wickenden, A. D. & Chaplan, S. R. Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics* **6**, 663–678 (2009).
514. Cox, J. J. *et al.* An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* **444**, 894–898 (2006).
515. Goldberg, Y. *et al.* Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin. Genet.* **71**, 311–319 (2007).
516. England, S. & De Groot, M. J. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1413–1425 (2009).
517. Nardi, A., Damann, N., Hertrampf, T. & Kless, A. Advances in Targeting Voltage-Gated Sodium Channels with Small Molecules. *ChemMedChem* **7**, 1712–1740 (2012).
518. Osteen, J. D. *et al.* Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* **534**, 494–499 (2016).
519. Lai, J., Porreca, F., Hunter, J. C. & Gold, M. S. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 371–397 (2004).
520. Cruccu, G. Treatment of painful neuropathy. *Curr. Opin. Intern. Med.* **20**, 531–535 (2007).
521. Cummins, T. R. & Rush, A. M. Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev. Neurother.* **7**, 1597–1612 (2007).
522. Lipkind, G. M. & Fozzard, H. A. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* **66**, 1–13 (1994).
523. Remme, C. A. & Wilde, A. A. Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia. *Curr. Opin. Pharmacol.* **15**, 53–60 (2014).
524. Birch, P. J., Dekker, L. V., James, I. F., Southan, A. & Cronk, D. Strategies to identify
-

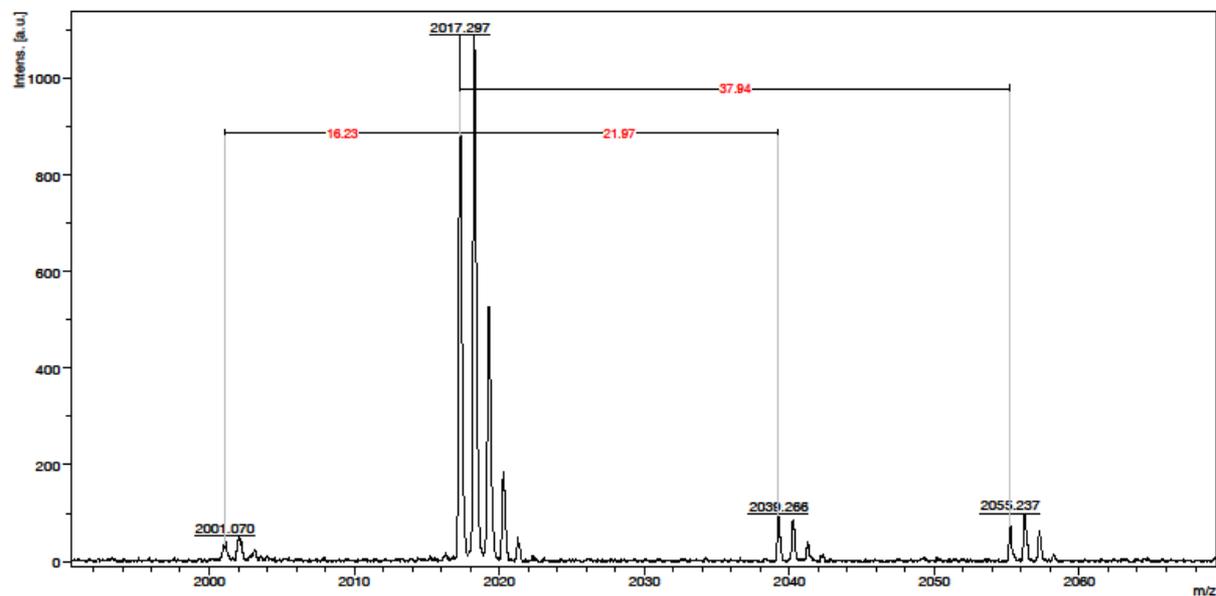
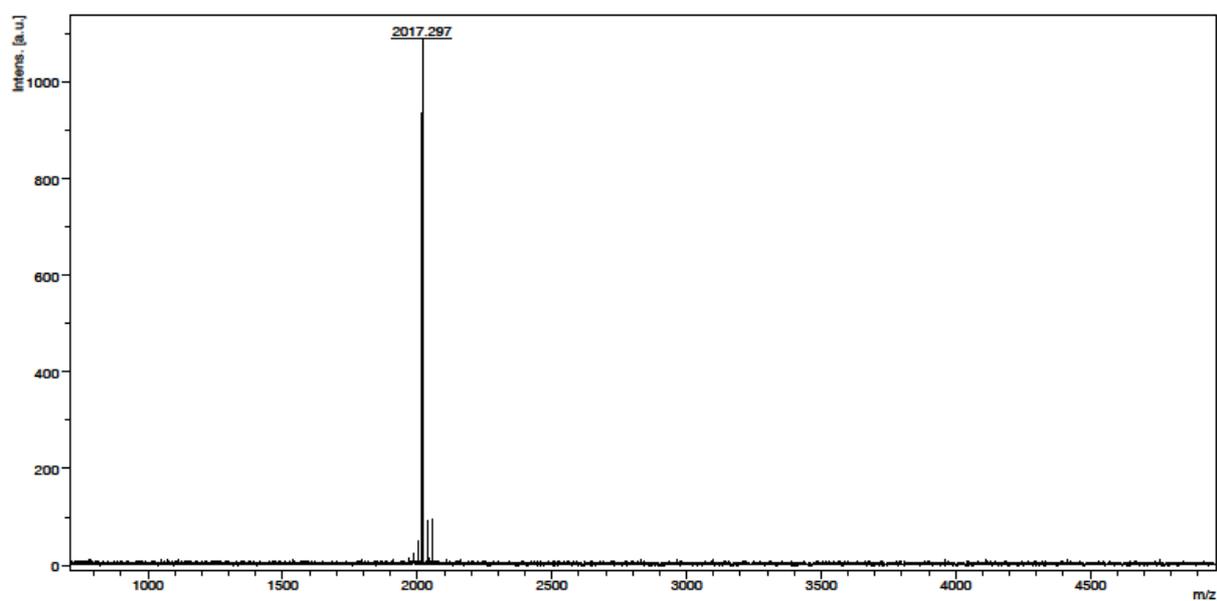
- ion channel modulators: Current and novel approaches to target neuropathic pain. *Drug Discov. Today* **9**, 410–418 (2004).
525. Nattel, S., Ran Duker, G. & Carlsson, L. Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drugs. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **98**, 328–339 (2008).
526. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
527. Qiao, X., Sun, G., Clare, J. J., Werkman, T. R. & Wadman, W. J. Properties of human brain sodium channel  $\alpha$ -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine. *British Journal of Pharmacology* **171**, 1054–1067 (2014).
528. Lin, Z., Santos, S., Padilla, K., Printzenhoff, D. & Castle, N. A. Biophysical and pharmacological characterization of Nav1.9 voltage dependent sodium channels stably expressed in HEK-293 cells. *PLoS One* **11**, 1–17 (2016).
529. Vega, A. V. *et al.* L-type calcium channel activation up-regulates the mRNAs for two different sodium channel  $\alpha$  subunits (Nav1.2 and Nav1.3) in rat pituitary GH3 cells. *Mol. Brain Res.* **116**, 115–125 (2003).
530. Baroni, D. & Moran, O. Molecular differential expression of voltage-gated sodium channel  $\alpha$  and  $\beta$  subunit mRNAs in five different mammalian cell lines. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**, 729–738 (2011).
531. Baroni, D., Barbieri, R., Picco, C. & Moran, O. Functional modulation of voltage-dependent sodium channel expression by wild type and mutated C121W- $\beta$ 1 subunit. *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**, 353–368 (2013).
532. Boccara, G. *et al.* Regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis by atypical Na<sup>+</sup> currents in cultured human coronary myocytes. *Circ. Res.* **85**, 606–613 (1999).
533. Virsolvy, A. *et al.* Antagonism of Nav channels and  $\alpha$ 1-adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
534. Michel, L. Y. M. *et al.* Function and regulation of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX3 splice variants in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **289**, 11293–11303 (2014).

- 
535. Yan, Z. *et al.* Na<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> influx through reverse mode of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in mouse ventricular cardiomyocyte. *Oncotarget* **6**, 23272–23280 (2015).
536. Larbig, R., Torres, N., Bridge, J. H. B., Goldhaber, J. I. & Philipson, K. D. Activation of reverse Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange by the Na<sup>+</sup> current augments the cardiac Ca<sup>2+</sup> transient: evidence from NCX knockout mice. *J Physiol* **58817**, 3267–3276 (2010).
537. Catalog. Identification des protéines et profilage des impuretés avec HPLC / UHPLC en phase inverse. *Agil. Technol.* (2014).
538. Froy, O. & Gurevitz, M. Arthropod defensins illuminate the divergence of scorpion neurotoxins. *J. Pept. Sci.* **10**, 714–718 (2004).
539. Jensen, H. S., Grunnet, M. & Bastlund, J. F. Therapeutic potential of Na<sub>v</sub>1.1 activators. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 113–118 (2014).
540. Yan, G. X. & Antzelevitch, C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* **100**, 1660–1666 (1999).
541. Silver, K. S. *et al.* Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. *Adv. In Insect Phys.* **46**, 389–433 (2014).
542. World Health Organization. OMS | Lutte antipaludique: comment préserver les pyréthroïdes? *WHO* (2016). Available at: <http://www.who.int/bulletin/volumes/92/3/14-020314/fr/>. (Accessed: 17th August 2017)
543. Mabrouk, K. *et al.* Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2528–2540 (2007).
544. Salmi, C. *et al.* Squalamine: An appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant gram-negative bacteria? *PLoS One* **3**, 1–8 (2008).

## ANNEXES

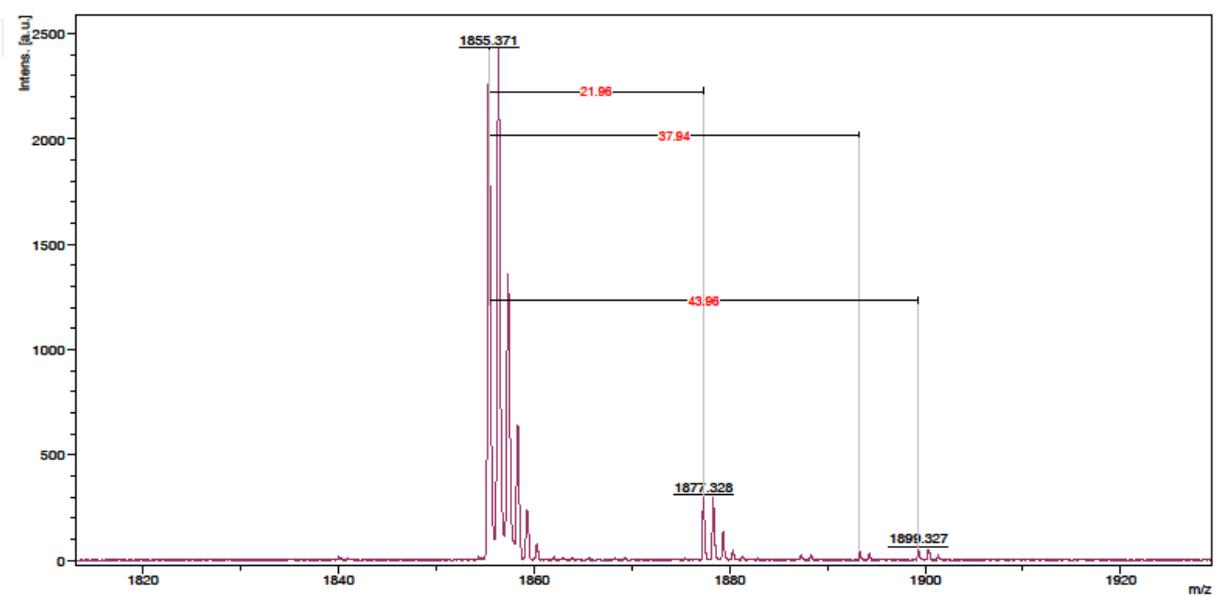
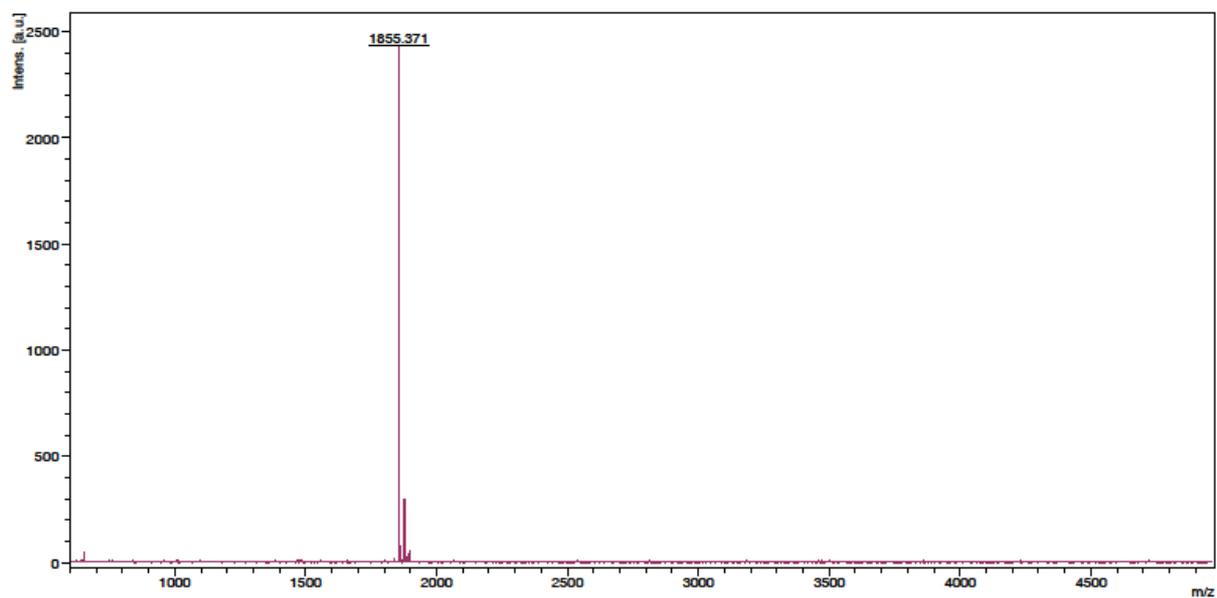
**Annexe 1 : Spectre de masse de Gal1 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA.



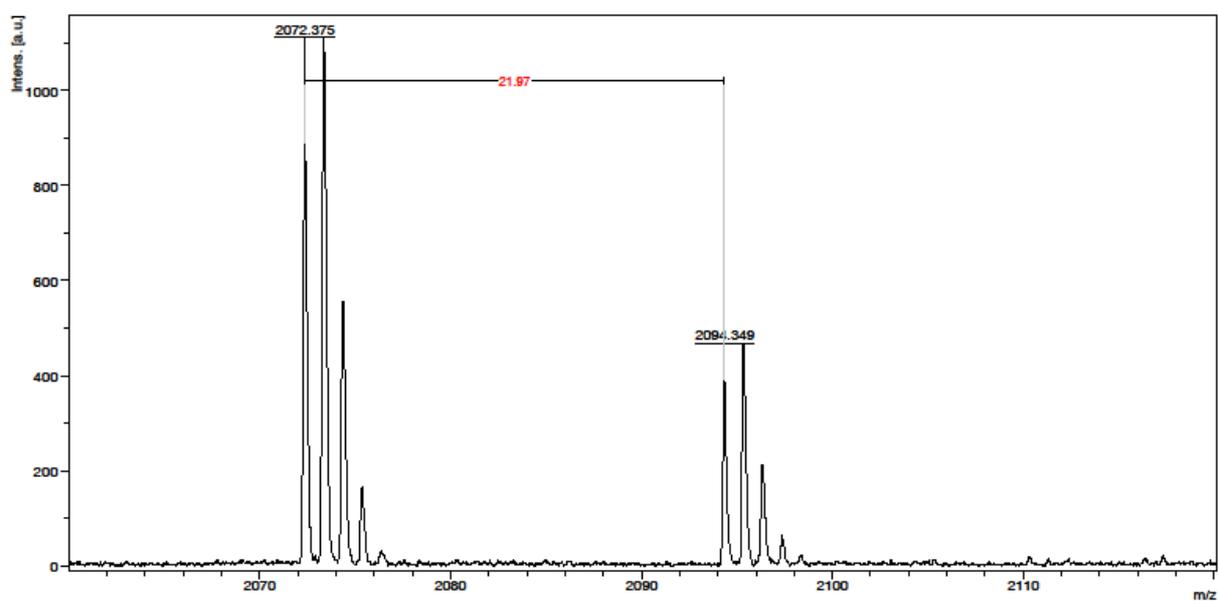
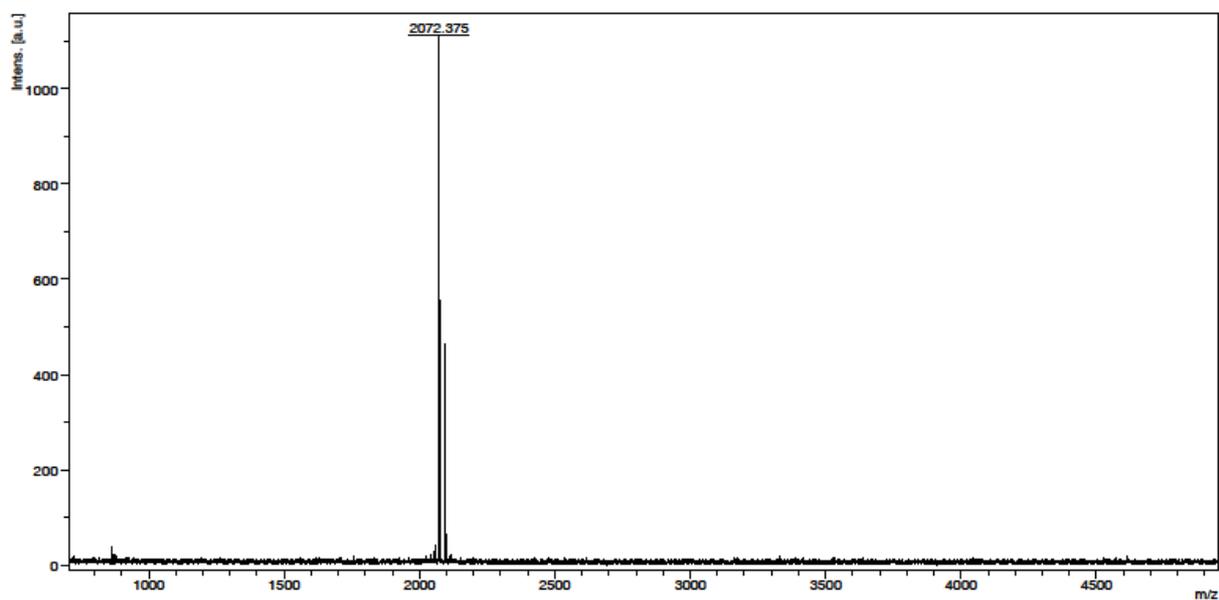
**Annexe 2 : Spectre de masse de Gal2 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA.



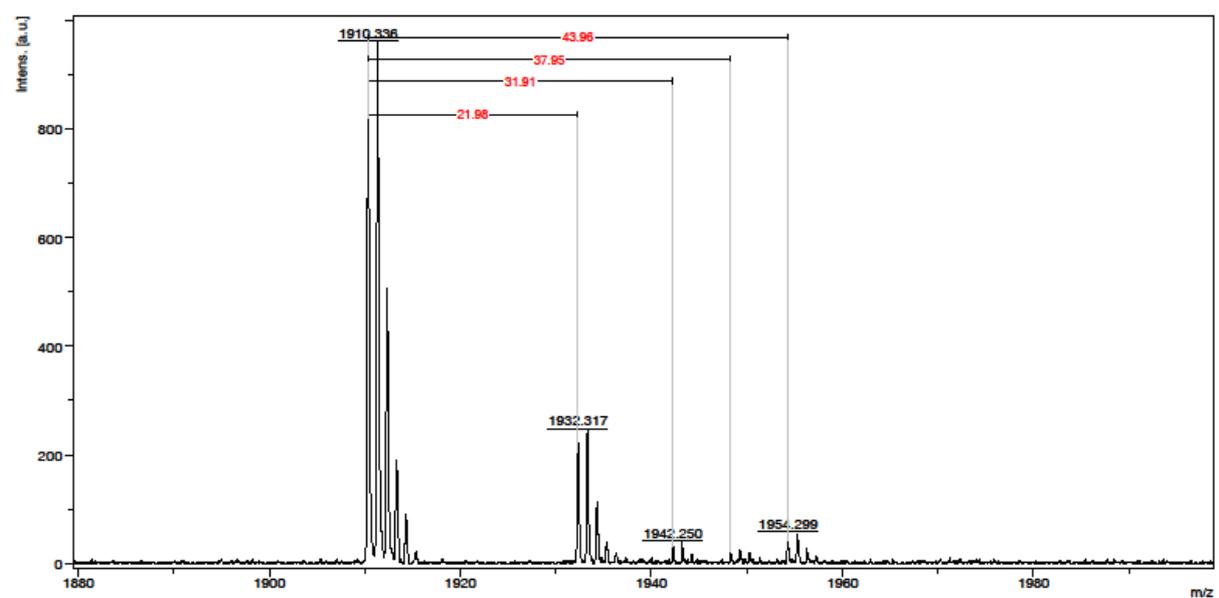
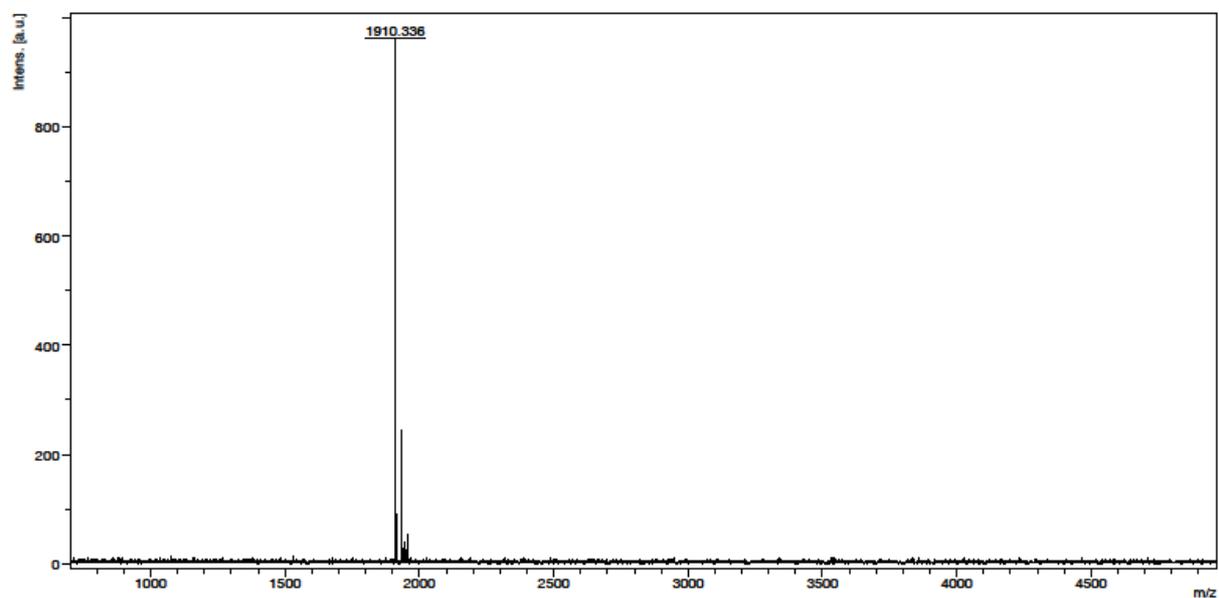
**Annexe 3 : Spectre de masse de Gal3 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA



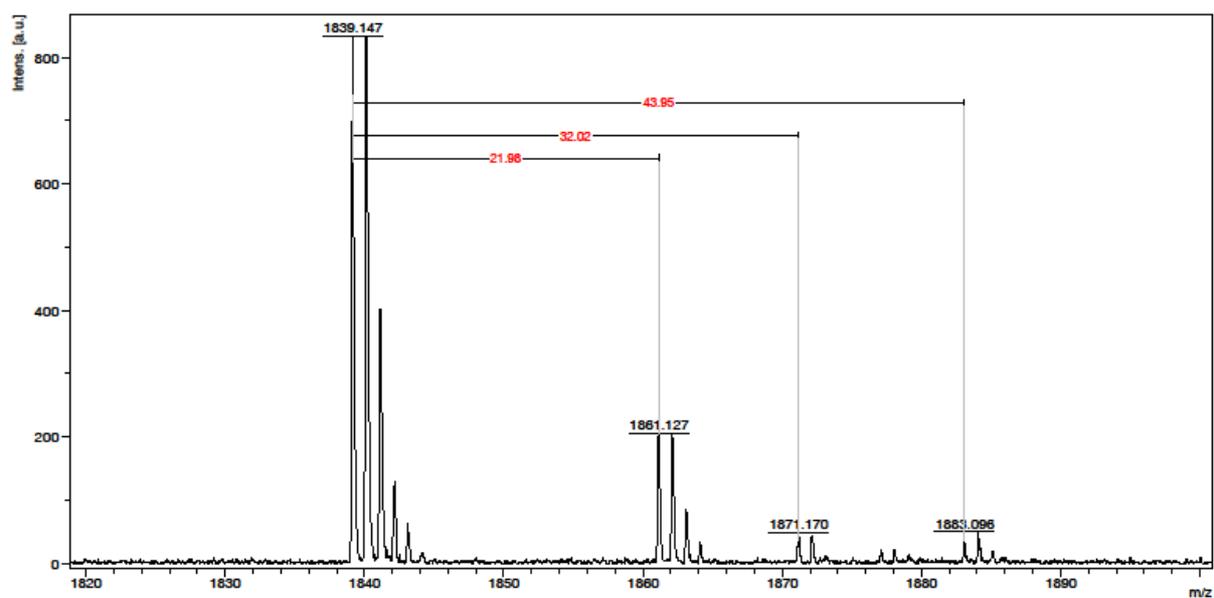
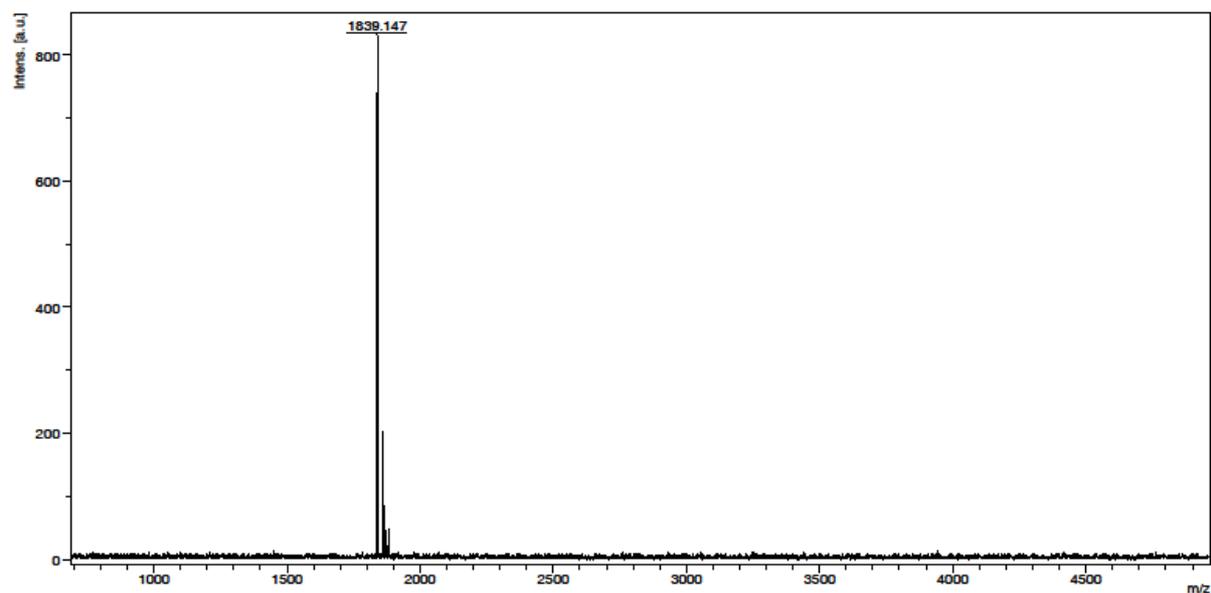
**Annexe 4 : Spectre de masse de Gal4 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA



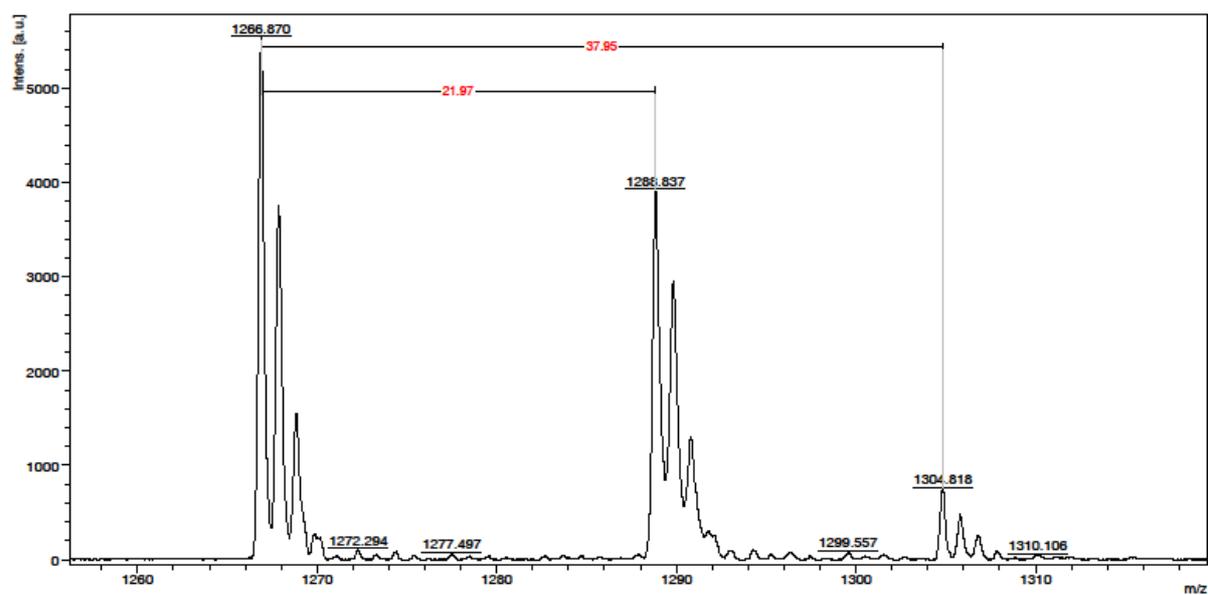
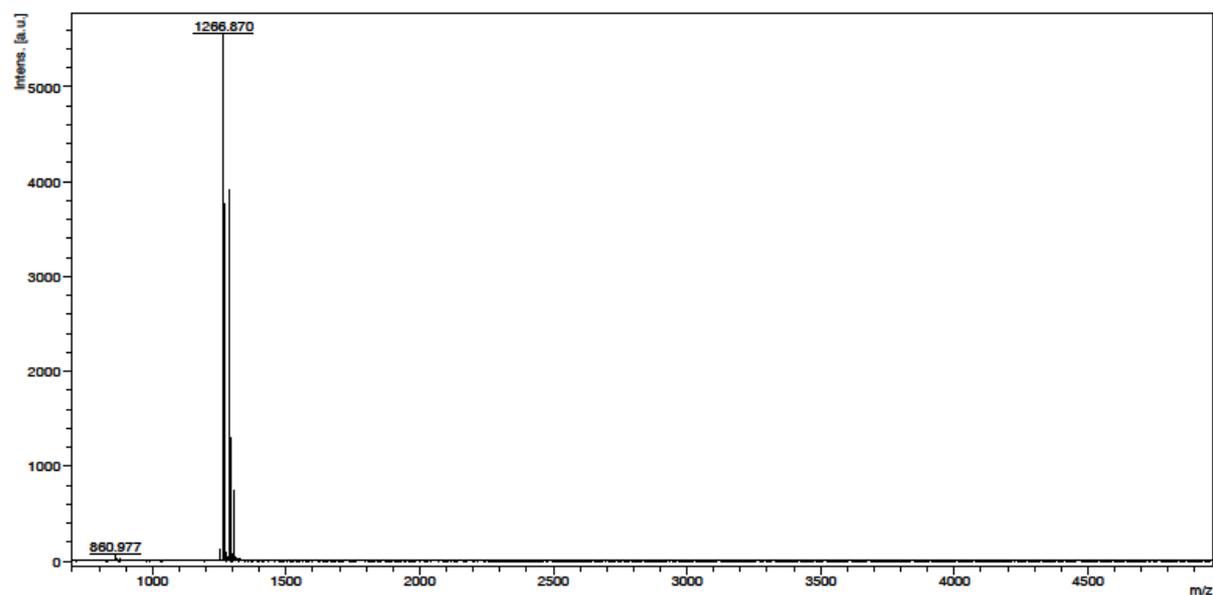
**Annexe 5 : Spectre de masse de Gal5 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA

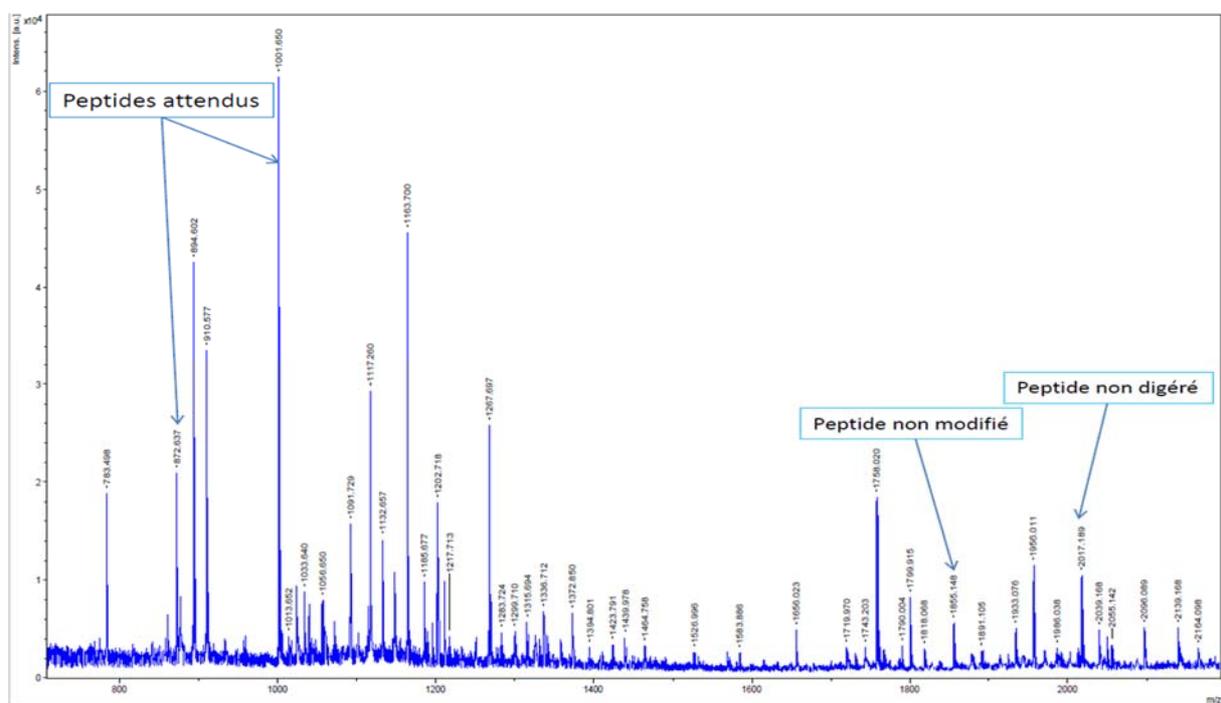
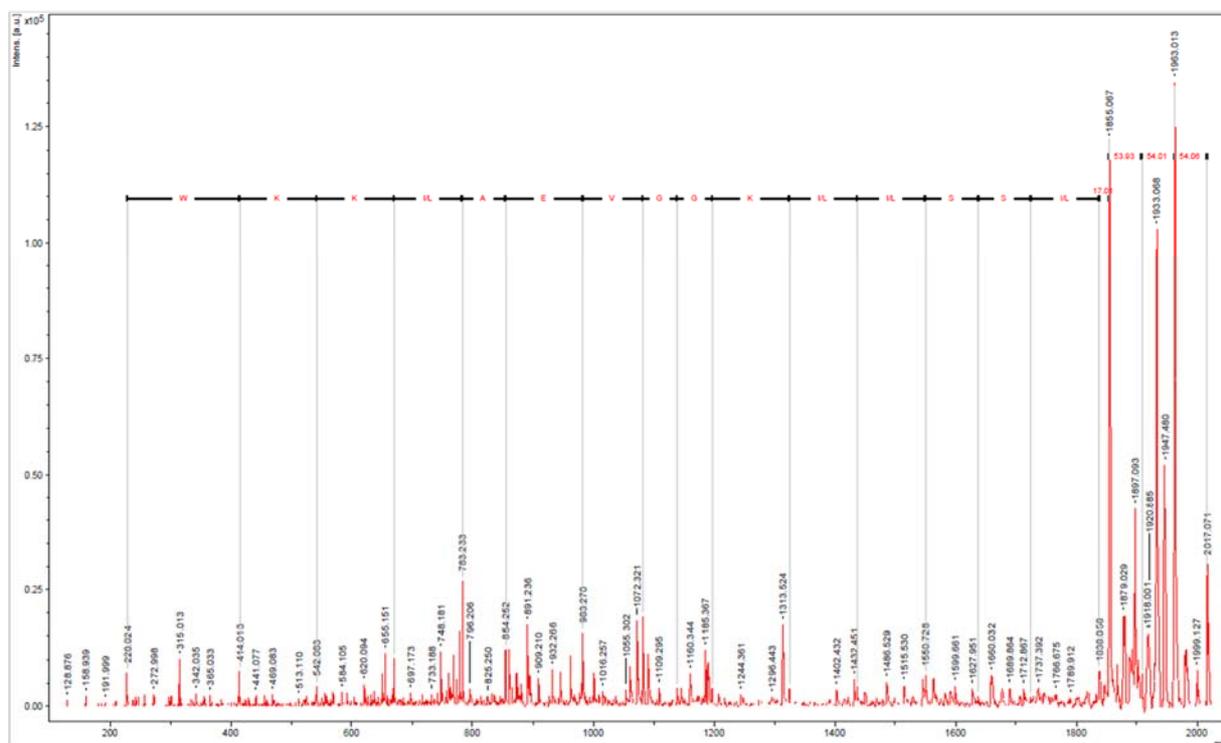


**Annexe 6 : Spectre de masse de Gal6 obtenu par MALDI TOF + Zoom.**

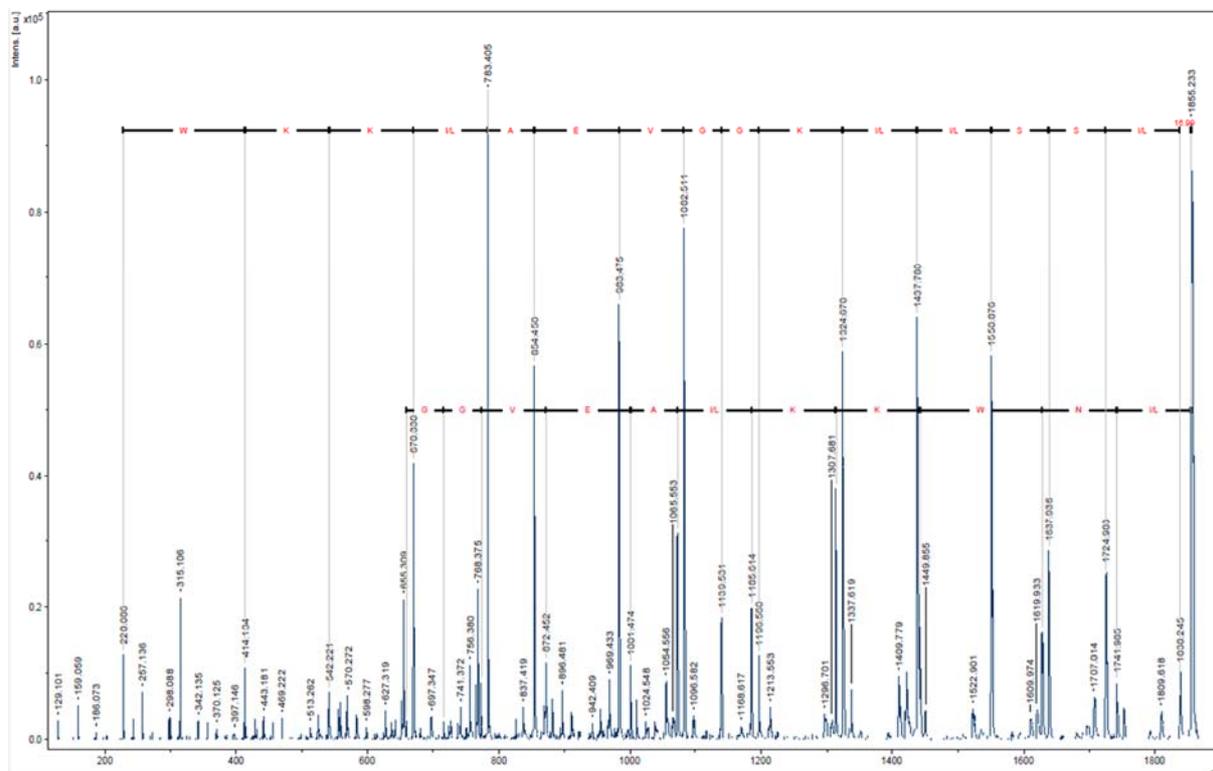
Spectre obtenu en mode réflectron après co-cristallisation sur matrice HCCA



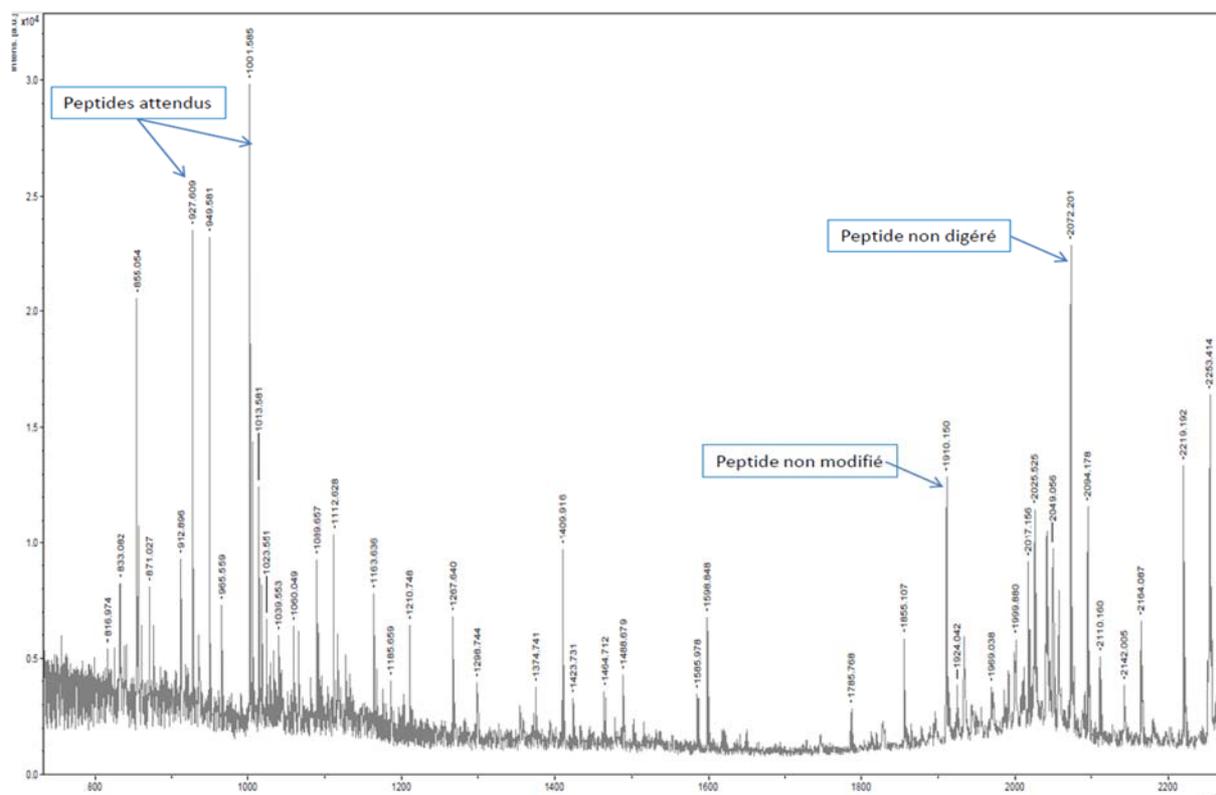
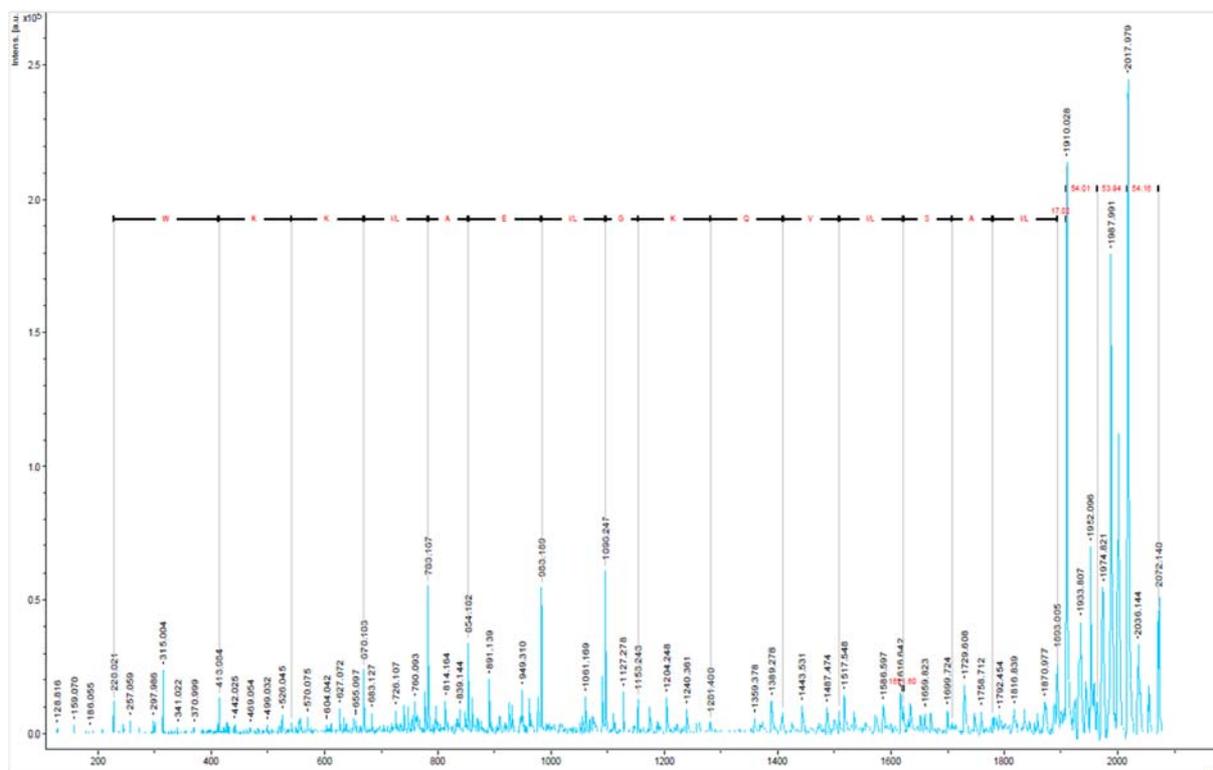
### Annexe 7 : Spectre MALDI-TOF MS/MS de Gal1 (en haut) + Spectre MALDI-TOF MS obtenu après digestion à la GluC (en bas).



## Annexe 8 : Spectre MALDI-TOF MS/MS de Gal2 .



### Annexe 9 : Spectre MALDI-TOF MS/MS de Gal3 (en haut) + Spectre MALDI-TOF MS obtenu après digestion à la GluC (en bas).



**Annexe 10 : Spectre MALDI-TOF MS/MS de Gal4 (en haut) + Spectre MALDI-TOF MS obtenu après digestion à la GluC (en bas).**

