



HAL
open science

Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*

Ménonvè Atindehou

► **To cite this version:**

Ménonvè Atindehou. Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*. Sciences agricoles. Université de Strasbourg; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2012. Français. NNT : 2012STRAJ015 . tel-00856585

HAL Id: tel-00856585

<https://theses.hal.science/tel-00856585>

Submitted on 2 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI**



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (Strasbourg)

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie (Abomey-Calavi)

THÈSE

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université de Strasbourg &
Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi**

Discipline : Science du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

présentée par :

Ménonvè Mègnissè ATINDEHOU

**Caractérisation structurale et biologique de nouveaux
agents antibactériens naturels actifs dans les infections
intestinales :
des peptides de la chromogranine A et des principes
actifs de *Chromolaena odorata***

soutenue le : **15 Juin 2012**

THÈSE dirigée par :

Mme Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE
Mr Ambaliou SANNI

Directeur de recherche, Strasbourg, France
Professeur, Cotonou, Bénin

RAPPORTEURS :

Mr Mohamed AMICHE
Mr Mohamed ZAIYOU

Chargé de recherche (HDR), France
Docteur (HDR), Nancy-France

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr Jean-Eric GHIA
Mme Marie-Claire LETT
Mme Joëlle OGIER

Professeur adjoint, Winnipeg, Canada
Professeure, Strasbourg, France
Professeure, Strasbourg, France

Thanksgiving

L'une des traditions que j'apprécie est celle de la fête de Thanksgiving. A l'origine, c'était une fête célébrée après les moissons. Elle avait pour but de rendre grâce pour les bonnes récoltes. Pour moi, c'est aussi le moment des récoltes, non seulement de quatre années de thèse mais surtout de trois décennies d'histoire ou de bout d'histoire....

Mes dédicaces sont donc des actions de grâce à l'endroit de tous ces êtres qui me sont si chers.

A Maman : C'est l'occasion pour moi de te dire que je t'aime. Pour tes privations, tes encouragements, tes sacrifices, ta tendresse, tes inquiétudes, ton amour, tes attentions.... Je te dis merci. Tu es la meilleure des mamans et une femme épatante. J'espère un jour te ressembler. Je rends grâce.

A Papa : Tu m'as toujours poussé à aller plus loin, encore plus loin dans mes études. Quand je me plaignais de tout ce à quoi il me fallait renoncer pour y arriver, tu m'as dit que la vie ce n'est pas une course de vitesse mais une course de fond. Merci pour ces leçons de vie qui font qu'aujourd'hui, je ne stresse plus par rapport aux défis que je n'ai pas encore relevé ; le moment vient, j'en ai la certitude. Merci papa, Je rends grâce.

A Arias : $365 \text{ jours} \times 4 \text{ ans} = 1460$ coups de fil. C'est beaucoup mais en deçà de la réalité. Tu as été avec moi à chaque instant de cette aventure et même loin l'un de l'autre, tu as été présent. Merci d'être là. C'est le début d'une autre aventure, avec toi à mes côtés, je n'ai pas peur de prendre la route. Je rends grâce.

A mes frères et sœurs, et frères et sœurs par alliance : Clémence et Daniel, Alex et Armandine, Yannick, Ayïcha, Aïcha Bb, Eric, Audrey. Merci pour tout l'amour dont vous m'entourez et pour les encouragements. Nous voir toujours unis est l'une de mes plus grandes fiertés. Soyez en sûrs, une étoile est faite pour briller et les nôtres brilleront. Je rends grâce.

Thanksgiving

A Maman Dedo : Merci de m'avoir accueilli à bras ouvert dans ta famille et de m'aimer comme votre fille. Je rends grâce.

A tonton Jean-Baptiste : Merci pour tes encouragements et ta tendresse.

A mes amis, la famille que j'ai eu la chance de rencontrer et de choisir. C'est une chance incommensurable que j'ai, d'en avoir autant sur qui je peux vraiment compter et me reposer. Al, Alain, Alex, Alfred, Arnaud, Aurore, Bénédicte, Bénito, Christiane, Clément, Diane, Geoffroy, Habib, Innocent, Laurine, Lynda, Kati, Raoul, Tatiana, Sabine, Sophie, Stanislas, Wilfried et tous les autres que je n'oublie pas, mes cousines Déborah, Fausta, Thérèse, merci d'être là chaque fois, toutes les fois. Je rends grâce.

A mes filleules, neveux et nièces : j'ai perdu quelques années de vos vies ; peut-être en perdrais-je encore quelques-unes, mais soyez assurés que je reste votre Tati qui vous aime tendrement. Je rends grâce.

A tous les Gospelsiens. J'ai passé de très bons moments avec vous. Merci pour la chaleur humaine qui m'a rendu cette aventure d'outre-mer plus supportable. Je rends grâce.

A la Sœur Ema Rosa Dias et au Père Jean-Michel. Merci Ema pour ta tendresse toute maternelle à notre égard, tu as été un refuge précieux pour nous qui nous sentions un peu coupés de nos racines. Merci Jean-Michel pour l'attention que tu portes à chacun de nous et pour ta relecture attentive.

A tous ceux dont l'histoire a un jour rencontré la mienne, pour un instant ou un instant un peu plus long. Ces rencontres ont contribué à faire de moi, celle que je suis aujourd'hui. Belles ou pas, elles ont compté ; Je rends grâce.

A Tantie Cherry et à papa Jean-Baptiste : vous n'êtes pas là pour voir l'accomplissement mais je sais que vous auriez été fiers de moi. Vous l'étiez déjà ! Je vous porte.

Remerciements

Il était une fois, dans une contrée très éloignée, une fille qui voulut entreprendre une grande aventure...

L'histoire qui commence ainsi, est riche en péripéties. Dans celle-ci, je n'ai pas été seule car différentes personnes m'ont apporté leur aide et m'ont permis de mener l'histoire à son terme. C'est l'occasion pour moi de les remercier.

Mes plus sincères et chaleureux remerciements vont à l'endroit de ma directrice de thèse, Madame Marie-Hélène Metz-Boutique. Pour son encadrement, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour sa chaleur humaine, pour sa rigueur scientifique, pour son temps qu'elle ne compte pas, pour ces encouragements, pour... J'ai de la chance de vous avoir eu comme directrice. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté aussi bien sur le plan scientifique et sur le plan humain.

Mes remerciements vont également à Mr Ambaliou Sanni, mon co-directeur de thèse. Je vous remercie, pour votre confiance, pour votre apport scientifique et pour n'avoir pas épargné votre temps.

Merci à Mesdames Marie Lett, Joëlle Ogier et messieurs Mohamed Zaiou, Mohamed Amiche, et Jean-Eric Ghia d'avoir accepté d'évaluer ce travail, pour leurs corrections et leurs contributions scientifiques qui m'ont permis de l'améliorer.

Merci aux directeurs des différentes unités dont j'ai fait partie : Dominique Aunis et Jean-Claude Voegel.

Merci également à Messieurs Lamine Babamoussa, Merawa Mouhamadou et Gilles Prévost qui ont rendu cette histoire possible.

Un grand merci à Mr Youssef Haïkel sans qui elle se serait interrompue un peu brusquement. Merci sincèrement pour le soutien financier en complément de celui du projet Franco béninois ARHES (Appui à la Restructuration et à l'Harmonisation de l'Enseignement Supérieur au Bénin), qui m'a permis de travailler sereinement et d'aller plus loin.

Merci à l'Ambassade de France au Bénin, au Gouvernement Béninois et à la faculté de chirurgie dentaire de l'université de Strasbourg pour le soutien financier.

Merci à madame Lucie Ayi, messieurs Hyacinthe Ahissou, René Hountondji, Karime Dramane et Jacques Henry Weil, de qui j'ai beaucoup appris.

Merci à mesdames Sylvette Chasserot et Minje Zhao, messieurs Jean du Barry, Stéphane Gasman, Stéphane Ory, Jean-Marc Strub avec qui j'ai eu à collaborer pour ce travail, à mademoiselle Virginie Gilson, pour la planification de la salle de microscopie et au personnel du deuxième étage de l'INCI (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives) où j'ai réalisé les expériences sur les cellules BON et monsieur Francis Schneider pour son éclairage des résultats du point de vue médical.

Merci également aux collègues et compagnons du projet ARHES et à Roland Lawson et Arnaud Adjaho pour les corrections.

Enfin mes remerciements vont à l'endroit de ces collègues et amis qui ont partagé mon quotidien ou ma paillasse : Thomas Lavau, Isabelle Fournier, Mélanie Gries, Camille Bergholtz, Olivier Huck, Nicodème Chabi, et plus récemment Emilie Straub, Yoshifumi Toyoshita, Meriem Sahraoui, Zyneb Medjahed, Sophie Helle, aux personnels de l'unité U 977 et du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire de Cotonou et de l'ex-unité U575 (Sylvie Grosch et Yannick Goumon) et en particulier à Aziza Akaddar, Catherine Neiss de l'INCI et Peiman Shooshtarizadeh pour votre spontanéité et votre gentillesse mes premiers jours à Strasbourg.

Une mention très spéciale à Charlotte Bach pour son énergie débordante et communicative et pour le clic-clac, à Cosette Betscha toujours attentive et disponible, Martine Rivet pour les moments de convivialité et les facilités administratives, Rizwan Aslam toujours discret mais présent en cas de besoin et pour les corrections en anglais, Bernard Guérold pour son grand cœur, ces jeux de mots qui m'ont fait sourire et sa passion communicative sur les lipides et les plantes, Jean-François Chich pour tes innombrables réponses à mes questions et de l'autre côté de la mer à Latifou Lagnika pour tout ce que j'ai appris avec toi spécialement sur les plantes et pour cette fraternité, à Boris Cachon pour sa disponibilité et son aide qu'il ne monnaie pas. Je vous remercie également pour les bons moments aux pauses, les encouragements, vos relectures attentives et votre contribution d'une manière ou d'une autre à ce travail.

Et l'histoire continue...

Table des matières

Thanksgiving.....	3
Remerciements.....	7
Table des matières.....	11
Liste des figures.....	19
Liste des tableaux.....	23
Liste des abréviations.....	25
Introduction générale.....	31
Partie 1 : Données bibliographiques	35
Chapitre I : L'immunité	37
I- Généralités	37
II- La reconnaissance du pathogène	40
III- L'immunité innée	41
III-1- Les barrières épithéliales.....	41
III-2- Les phagocytes.....	42
III-3- Les cellules Natural Killer.....	45
III-4- Le système du complément.....	46
III-5- Les cytokines.....	48
IV- L'immunité adaptative	49
IV-1- Les lymphocytes T.....	50
IV-2- Les lymphocytes B.....	50
IV-3- Autres mécanismes de défense.....	52
V- Relations entre le système immunitaire, le système endocrinien et le système nerveux	52
V-1- Généralités sur les systèmes nerveux et endocrinien.....	52
V-2- Interactions entre le système nerveux et le système immunitaire <i>via</i> le système endocrinien..	53
Chapitre II : Les peptides antimicrobiens	57
I- Introduction	57



II- La répartition des peptides antimicrobiens.....	58
III- La classification des peptides antimicrobiens.....	59
III-1- Les peptides antimicrobiens cationiques.....	61
III-2- Les peptides antimicrobiens contenant des cystéines et des ponts disulfures.....	61
III-3- Les PAMs dérivés de grandes protéines.....	61
III-4- Les PAMs anioniques.....	62
IV- La structure des PAMs.....	62
V- Les activités biologiques des peptides antimicrobiens.....	63
V-1- L'activité directe des peptides antimicrobiens.....	64
V-2- Les peptides antimicrobiens dans l'immunomodulation.....	65
V-3- Les peptides antimicrobiens dans la régénération nerveuse et tissulaire.....	66
V-4- L'expression des peptides antimicrobiens dans les pathologies.....	66
V-5- Les peptides antimicrobiens dans les médicaments.....	67
VI- Les mécanismes d'action des peptides antimicrobiens.....	68
VI-1- Les mécanismes d'action membranaire.....	68
VI-2- Les mécanismes d'action intracellulaire.....	71
VII- La résistance des microorganismes aux peptides antimicrobiens.....	72
VII-1- La dégradation protéolytique.....	73
VII-2- Les mécanismes de piégeage.....	74
VII-3- Le transport actif des PAMs utilisant des pompes à efflux.....	74
VII-4- Les modifications des propriétés membranaires.....	74
VIII- Les nouvelles approches thérapeutiques basées sur les peptides antimicrobiens.....	74
VIII-1- Les peptides antimicrobiens combinés.....	75
VIII-2- Les peptides multimériques ou peptides branchés.....	75
VIII-3- Les peptides mimant des épitopes.....	75
VIII-4- Les oligoacyllysines.....	76
VIII-5- Les céragénines.....	76
VIII-6- Les peptides synthétiques mimétiques des peptides antimicrobiens.....	77
VIII-7- Les lipopeptides.....	77
VIII-8- Les peptoides.....	78
VIII-9- Les copolymères à séquence aléatoire.....	78



Chapitre III : Les granines	81
I- Les glandes surrénales	81
I-1- Le cortex.....	82
I-2- La médullosurrénale	82
I-2-1- Les cellules chromaffines.....	83
I-2-2- Les granules de sécrétion des cellules chromaffines	83
II- La famille des granines	85
II-1- Les chromogranines et les sécrétogranines	85
II-2- La chromogranine A	89
II-2-1- La catestatine.....	92
II-2-2- La chromofungine.....	94
Chapitre IV : Les plantes médicinales	95
I- Généralités sur les plantes médicinales	95
II- Les grandes familles de principes actifs	96
II-1- Les sucres.....	96
II-2- Les lipides	97
II-3- les vitamines	97
II-4- Les macroéléments et les microéléments	97
II-5- Les protéines	98
II-6- Les composés phénoliques	98
II-7- Les composés phénoliques oxygénés.....	99
II-8- Les huiles essentielles.....	100
II-9- Les iridoïdes	100
II-10- Les lactones sesquiterpènes et diterpènes	100
II-11- Les structures stéroïdiennes	101
II-12- Les saponosides.....	101
II-13- Les caroténoïdes.....	102
II-14- Les alcaloïdes	102
III- Les plantes médicinales testées sur des bactéries intestinales	103
Chapitre V : Les maladies intestinales	109
I- L'intestin	109
I-1- L'intestin grêle	111



I-2-Le gros intestin	112
II- Le système immunitaire intestinal.....	113
II-1- les cellules de l'intestin.....	113
II-2- Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin.....	115
III- Les pathologies intestinales infectieuses	116
III-1- Les pathologies intestinales infectieuses	116
III-1-1- Généralités sur les bactéries.....	116
III-1-2- Les bactéries étudiées.....	119
III-2- Les maladies inflammatoires de l'intestin : étude d'un modèle, les cellules BON	122
III-2-1- Les tumeurs carcinoïdes de l'intestin.....	122
III-2-2- Etude d'un modèle cellulaire, les cellules BON.....	123
IV- Les traitements actuels des maladies intestinales infectieuses	124
IV-1- Classification des antibiotiques.....	124
IV-1-1- Les antibiotiques agissant sur la paroi	125
IV-1-2- les antibiotiques agissant sur la membrane plasmique.....	125
IV-1-3- Les antibiotiques agissant sur le ribosome.....	125
IV-1-4- Les antibiotiques agissant sur l'ADN	126
IV-1-5- Les antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique	126
IV-2- Les limites des traitements antibiotiques.....	126
Partie 2 : Stratégie Expérimentale	129
I- Préparation du matériel biologique.....	131
I-1- Les extraits de plantes	131
I-1-1-Choix et récolte des plantes.....	131
I-1-3- Extraction des molécules potentiellement antimicrobiennes	131
I-2- La synthèse peptidique.....	132
I-3- Les cellules entérochromaffines.	136
I-3-1 Culture cellulaire.....	136
I-3-2- Stimulation des cellules entérochromaffines	136
I-4- Les cultures bactériennes.....	136
II- Méthode de purification du matériel biologique.....	137
II-1- Le Sephadex G-25 superfine	137
II-1-1-Préparation de l'extrait de plantes à purifier	138



II-1-2-Préparation de la colonne de Sephadex G-25 superfine.....	139
II-1-3- Dépôt de l'échantillon sur la colonne de Sephadex G-25 superfine.....	139
II-2-Chromatographie sur couche mince	139
II-2-1-Principe	139
II-2-2-Analyse de l'extrait purifié après passage sur Sephadex G-25.....	139
II-3- Dessalage	140
II-4-Chromatographie en phase inverse : RP-HPLC.....	140
II-4-1- HPLC pour les peptides synthétiques.....	140
II-4-2- HPLC pour la purification des extraits de plantes.....	141
II-4-2- HPLC pour les milieux de sécrétion des cellules entérochromaffines	141
II-4-4- HPLC pour les surnageants bactériens.....	141
III- Méthodes d'analyse du matériel biologique.....	142
III-1- Séquençage peptidique par la méthode automatique d'Edman	142
III-1-1-Principe	142
III-1-2-Méthode expérimentale	144
III-2- Western Blot.....	144
III-3- Coloration au bleu de coomassie- décoloration.....	146
III-4- Analyses nanoLC-MS/MS réalisées avec le couplage NanoAcquity-Synapt	146
III-5- Analyses MALDI –MS (Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF).....	148
III-6- Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	149
III-7- RMN.....	150
IV- Méthodes de caractérisation des activités biologiques.....	151
IV-1-Tests antibactériens.....	151
IV-1-1-Préculture bactérienne.....	151
IV-1-2- Caractérisation de l'activité antibactérienne	151
IV-1-3-Tests antimicrobiens avec les extraits de plantes.....	152
IV-2- Biautographie.....	153
IV-2-1- Principe	153
IV-2-2- Mode opératoire.....	153
IV-3-Combinaison peptide-antibiotique.....	154
IV-3-1- But.....	154
IV-3-2- Mode opératoire.....	155
IV-4- Cinétique d'action du peptide et du couple Peptide-Antibiotique.....	155



IV-5-Dégradation protéolytique.....	156
V- Analyse par microscopie.....	157
V-1-Microscopie calcique.....	157
V-2- Microscopie confocale.....	158
VI- Méthodes informatiques et bioinformatiques.....	159
Partie 3 : Résultats & Discussion.....	161
Chapitre I : Interactions Peptides-Bactéries.....	163
I- Résultats.....	163
I-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides.....	163
I-3- Etude de l'effet la combinaison de la cateslytine et de la minocycline.....	167
II- Discussion des résultats.....	170
Résultats supplémentaires.....	173
Chapitre II : Interactions Plantes-Bactéries.....	177
I- Résultats.....	177
I-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes du Bénin, actives contre les bactéries responsables d'infections intestinales.....	177
I-2- Détermination de deux principes actifs de <i>Chromolaena odorata</i>	178
II- Discussion des résultats.....	181
Résultats supplémentaires 2.....	183
Chapitre III : Interactions Peptides-Cellules.....	189
I- Résultats.....	189
I-1- Sécrétion protéique des cellules BON.....	189
I-2-Profil et Maturation de la CGA dans les cellules BON.....	193
I-3- Mécanisme d'action de CAT et CHR sur les cellules BON.....	194
II- Discussion des résultats.....	200
Résultats supplémentaires 3.....	202
Conclusion et perspectives.....	207
Annexes.....	211
Manuscrit 1.....	235
Chromogranin A-Derived Peptides Are Involved in Innate Immunity.....	237
Manuscrit 2.....	271



The natural antimicrobial chromogranins/secretogranins-derived peptides: production, lytic activity and processing by bacterial proteases	271
Manuscrit 3	306
Antibacterial activities of chromogranin A derived peptides against gut infections.....	308
Manuscrit 4	331
Characterization of two flavonoids from <i>Chromolaena odorata</i> (Asteraceae), active against four diarrheal strains	333
Manuscrit 5	353
Chromofungin, a Chromogranin A-derived fragment is an autocrine regulator of human neuroendocrine tumor cells secretion	355
Manuscrit 6	385
Chromofungin and Catestatin, two Chromogranin A derived fragments modulate BON cells secretion	387
Références bibliographiques	211
Liste des publications, communications et posters	417





Liste des figures



Figure 1 : Origine des cellules du système immunitaire.	38
Figure 2 : Les différentes phases de la phagocytose.	42
Figure 3 : Mécanismes de défense mettant en jeu les neutrophiles.....	43
Figure 4 : Les principaux composants du complément et leurs actions effectrices.	47
Figure 5 : Stimulation antigénique des lymphocytes B et des lymphocytes T.....	51
Figure 6 : Relations entre le système nerveux central et le système immunitaire, au travers de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et du système sympathique dans le cadre de la réaction à un stress.	55
Figure 7 : Structures secondaires de quelques PAMs représentant les quatre types de repliement de base.....	63
Figure 8 : Activités des peptides antimicrobiens.	64
Figure 9 : Illustration du mode d'action des peptides antimicrobiens.....	68
Figure 10 : Modèle d'insertion membranaire des PAMs dans les cellules	69
Figure 11 : Autres modèles d'insertion membranaire.....	71
Figure 12 : Mécanisme d'action intracellulaire des PAMs	72
Figure 13 : Mécanisme de résistance des bactéries aux PAMs.....	73
Figure 14 : Construction d'un peptide mimant des épitopes à partir d'une boucle β -hairpin	76
Figure 15 : Structure générale d'un oligoacyllysine	76
Figure 16 : Exemple de ceragénines : CSA-8 et CSA-13	77
Figure 17 : Synthèse d'un PAMM à partir d'un PAM naturel par l'intermédiaire d'une structure rigide	77
Figure 18 : Structure d'un peptoïde comparée à celle d'un peptide.	78



Figure 19 : Conformation d'un copolymère à séquence aléatoire par rapport à un peptide antimicrobien.....	79
Figure 20 : Localisation des glandes surrénales	81
Figure 21 : Représentation schématique de la médullosurrénale.....	82
Figure 22 : Représentation schématique d'une cellule chromaffine.....	83
Figure 23 : Fonctions biologiques des constituants des granules de sécrétion des cellules chromaffines.....	84
Figure 24 : Localisation sur la séquence de la CGA humaine des points de clivage et des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés	91
Figure 25 : Localisation sur la séquence de la CGA bovine des points de clivage et des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés	91
Figure 26 : Régulation autocrine et paracrine de la catestatine.....	93
Figure 27 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996).	99
Figure 28 : Quelques plantes médicinales utilisées dans le traitement de pathologies intestinales.....	105
Figure 29 : Schéma de l'appareil digestif humain	109
Figure 30 : Structure de la paroi du tube digestif.....	110
Figure 31 : Structure des modifications de la paroi de l'intestin.....	111
Figure 32 : Cellules de l'intestin grêle (Andreu et al., 2006).	113
Figure 33 : Immunité innée intestinale.....	115
Figure 34 : Structure des bactéries.....	117
Figure 35 : Structure de la paroi des Gram négatifs.	118
Figure 36 : Mode d'invasion des shigelles d'après Samuel Baron	121
Figure 37 : Mode opératoire du fractionnement obtenue après broyage des plantes séchées.....	131
Figure 38 : 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).....	132



Figure 39 : Acide aminé n°1 lié en –NH ₂ terminal par le groupement Fmoc et fixé en –COOH terminal sur la résine Wang (paraméthylphénoxy méthyl polystyrène).	133
Figure 40 : Etape 1 de la synthèse peptidique. Déprotection du –NH ₂ de l'acide aminé n°1 par élimination du groupement Fmoc.	133
Figure 41 : HOBt (hydroxybenzotriazole) et HBTU (O- benzotriazole N, N, N', N'-tétraméthyluronium- hexafluorophosphate).	134
Figure 42 : Etape 2 de la synthèse peptidique. Activation du –COOH du résidu aa2.	134
Figure 43 : Etape 3 de la synthèse peptidique. Couplage entre le -NH ₂ terminal déprotégé de l'acide aminé n-1 et le –COOH terminal activé de l'acide aminé n.....	135
Figure 44 : 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine.	135
Figure 45 : Schéma représentant les différentes étapes de traitement des plantes.	138
Figure 46 : Etape 1 de séquençage : couplage entre le PITC et le peptide pour donner un phénylthiocarbamyl-amino acide (PTC-aa).....	142
Figure 47 : Etape 2 du séquençage : Cyclisation du PTC-aa et clivage du peptide n-1 par action du TFA.....	143
Figure 48 : Etape 3 du séquençage : conversion de L'ATZ-aa en un composé stable le en phénylthiohydantoïne-amino acide (PTH-aa).....	143
Figure 49 : Profil d'éluion des PTH-aas standards.	144
Figure 50 : Mécanisme de réaction de l'iodonitrotétrazolium.....	152
Figure 51 : Séparation bidimensionnelle des extraits sur gel de silice d'une plaque de chromatographie sur couche mince.	153
Figure 52: Analyse par RP-HPLC des surnageants bactériens	165
Figure 53 : Activité antibactérienne de la combinaison de la cateslytine et de la minocycline.....	167
Figure 54 : Etude cinétique de l'action de la combinaison de la minocycline et de la cateslytine.....	168
Figure 55 : Analyse du surnageant bactérien en présence de la minocycline	169



Figure 56 : Chromatographie sur couche mince de quatre extraits de <i>Chromolaena odorata</i>	179
Figure 57: Chromatographie bidimensionnelle de <i>Chromolaena odorata</i>	179
Figure 58: Isolation de deux principes actifs Cp 1 et Cp 2 de <i>Chromolaena odorata</i> par RP-HPLC.....	180
Figure 59: Structure et masse moléculaire de la sinensétine.....	180
Figure 60: Structure et masse moléculaire du tétraméthyléther scutellaréine.....	180
Figure 61: Analyse de la sécrétion des cellules BON par RP-HPLC.....	190
Figure 62 : Ratio du nombre de protéines dans chacune des conditions (Ionomycine 2 μ M, CAT 100 μ M, CHR 100 μ M) par rapport au contrôle.....	191
Figure 63 : Classification des protéines sécrétées par dans les différentes conditions en fonction des processus biologiques dans lesquels elles interviennent.	192
Figure 64 : Détection par Western Blot de la sécrétion de CGA par les cellules BON...	193
Figure 65 : Identification par analyse protéomique des fragments dérivés de la chromogranine A dans les sécrétions de cellules BON induites en présence de 2 μ M d'Io ou 100 μ M de CHR.	193
Figure 66 : Influx de calcium dans les cellules BON dans différentes conditions.	195
Figure 67 : Effet Bloqueur de CAT sur l'influx de calcium induit par CHR.....	196
Figure 68 : Influx de calcium en présence de 2-APB et de TG.....	197
Figure 69 : Influx de calcium en présence de CMZ.....	198
Figure 70 : Influx de calcium en présence de W7	199
Figure 71 : Microscopie confocale des cellules BON après incubation avec du peptide rhodaminé.	200



Liste des tableaux



Tableau I : Les cellules dérivées des cellules souches et leurs rôles.	39
Tableau II : Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les récepteurs de reconnaissance (PRRs).	41
Tableau III : Exemple de quelques protéines régulatrices du système du complément, leur localisation et leurs fonctions.	48
Tableau IV : Principales cytokines de l'immunité innée, leurs sources cellulaires et leurs cibles cellulaires et tissulaires	49
Tableau V : Classification des peptides antimicrobiens en fonction de leurs structures....	60
Tableau VI : Exemples de quelques peptides antimicrobiens et de leurs implications dans différentes maladies.	67
Tableau VII : Peptidomimétiques en phase clinique d'expérimentation et applications thérapeutiques.	80
Tableau VIII : Les 9 membres de la famille des granines et les principaux auteurs ayant conduit à leur découverte	85
Tableau IX : Variation du niveau de CGA dans différentes pathologies.....	86
Tableau X : Fonctions des CGs et de leurs peptides dérivés.	88
Tableau XI : Caractéristiques et propriétés de la CGA humaine et bovine.....	90
Tableau XII : Conservation des séquences primaires des parties N- et C -terminales de la CGA au cours de l'évolution.	90
Tableau XIII : Tableau chronologique récapitulatif de preuves écrites de phytothérapie dans différentes civilisations.	95
Tableau XIV : Plantes étudiées, leurs familles, la partie utilisée dans cette étude ainsi qu'une liste non-exhaustive des principales indications thérapeutiques.....	103
Tableau XV : Exemple de quelques maladies de l'intestin	116
Tableau XVI : Exemple de quelques antibiotiques en fonction de leur cible cellulaire et de leur spectre d'activité.....	124



Tableau XVII : Volume de solution nécessaire à la préparation d'un gel de séparation et de concentration.....	145
Tableau XVIII : Caractéristiques d'un système fonctionnel en mode MS	148
Tableau XIX : Corrélation entre l'indice CFI et l'effet des combinaisons peptides-antibiotiques	155
Tableau XX : Sécrétagogues utilisés pour déterminer le mécanisme d'action de la catestatine et de la chromofungine sur les cellules BON.....	158
Tableau XXI : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice de 4 peptides dérivés de la CGA.....	163
Tableau XXII : Identification des nouveaux peptides générés.....	166
Tableau XXIII : Concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes.....	177
Tableau XXIV: Identification des fragments dérivés de la CGA dans chacune des bande après stimulation à la chromofungine ou à l'ionomycine.	194



Liste des abréviations



A

Aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
ACh	Acétylcholine
ACN	Acétonitrile
ACTH	Adrénocorticotropine Hormone
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Antigène
AMPc	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
2-APB	2-AminoPhenyl Borate
Arg	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
ATZ-aa	AnilinoThioZolinone- acide aminé
AVP	Arginine VasoPressine

B

BEL	BromoEnol Lactone
BPB	BromoPhénacyl Bromide
BPI	Bactericidal Permeability-Increasing protein
BSA	Bovine Serum Albumin

C

C4BP	C4 binding protein
CAM	Complexe d'Attaque Membranaire
CAT	Catestatine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Cluster de Différenciation
CFI	Concentration Fractionnaire Inhibitrice
CG (s)	Chromogranine (s)
CGA	Chromogranine A
CGB	Chromogranine B
CGRP	Calcitonin Gene-Regulated Peptide
CHR	Chromofungine
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMZ	Calmidazolium



CPP	Cell Penetrating Peptide
CRH	Corticotrophin Release Hormone
CRP	C Reactive Protein
CTL	Cateslytine
D	
DAF	Decay Accelerating Factor
DHB	2,5 acide Di-HydroBenzoïque
DIEA	DiIsopropyl EtylAmine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOI	Digital object Identifier
DTT	Dithiothréitol
E	
ECL	Enterochromaffin-Like Cells
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESI	ElectroSpray Ionization
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	
FBS	Fetal Bovine Serum
FMOC	9-FluorenylMethOxyCarbonyl
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
G	
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GFP	Glu1-Fibrinopeptide B
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
GM-CSF	Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor
H	
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
hBD	Human Beta Defensin
HBTU	O- Benzotriazole N,N,N',N'-TétraméthyluroniumHexafluorophosphate
HCCA	α-cyano-4-hydroxycinnamique
HEPES	4 - (2-HydroxyEthyl)-1-PipérazineEthaneSulfonique
HIAA	5-HydroxyIndolAceticAcid
HNP	Human Neutrophil Peptide
HOBr	Acide hypobromeux
HOBT	Hydroxybenzotriazole
HOCl	Acide hypochloreux
HOI	Acide hypoiodéux
HPLC,	High Performance Liquid Chromatography



HPTLC High Performance Thin Layer Chromatography
5-HT 5-HydroxyTryptophane

I

IDR Innate Defense regulator
IFN Interféron
Ig Immunoglobine
IL Interleukine
IMAC Immobilized Metal Affinity Chromatography
IMAD Institut des Maladies de l'Appareil Digestif
INT IodoNitroTétrazolium

K

KAR Killer Activating Receptors
KIR Killer Inhibitory Receptors

L

LB Lymphocytes B
LDCV Large Dense Core Vesicle
LH Luteinizing Hormone
LPS LipoPolySaccharides
LRR Leucin Rich Repeat
LT Lymphocytes T
LTA Lipoteichoic acid

M

Mal MyD88 adaptor-like
MALDI-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight
MALT Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAPK Mithogen Activated Protein Kinase
MASP Mannan binding lectin-Associated Serine Protease
MBL Mannan Binding Lectin
MCP Membrane Cofactor Protein
MEK MAPK/ERK Kinase
MH (B) Mueller Hinton (Bouillon)
MIN Minocycline
MIRL Membrane Inhibitor of Reactive Lysis
MMP Matrix MetalloProteinase
MMR Récepteur de Mannose des Macrophages
MyD88 Myeloid Differentiation domain

N

NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH Nicotinamide Adénine Dinucléotide désHydrogénase
NADPH Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase
NET Neutrophil Extracellular Trap
NFkB Nuclear Factor kappa B



NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NMP	N-méthylpyrrolidine
NOD	Nucleotide binding Oligomerization Domain
NPY	Neuropeptide Y

O

OAKs	Oligoacyllsines
.OH	Radical hydroxyle
1O2	Oxygène singulet
O2-,	Superoxyde
O3	Ozone
OmpA	Outer membrane protein
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PAM(s)	Peptides AntiMicrobien(s)
PAMM(s)	Peptides antiMicrobiens Mimétique(s)
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phox	NADPH oxydase phagocytaire
PITC	PhénylIsoThioCyanate
PLP	Protéine Liant la Pénicilline
PMN	PolyMorphoNucléaire
PRRs	Patterns Recognition Receptors
PSG	Protéines Solubles des Granules de sécrétion
PTC-aa	PhénylThioCarmamyl-amino acide
PTH-aa	PhénylThioHydantoine-amino acide
PVDF	PolyFuorure de VinyliDène

R

RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Reactive Oxygen Intermediate
Rpm	Révolution par minute
RTD-1	Rhesus Theta Defensin-1

S

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Sérine
SG	Sécrétogranine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SN	Système Nerveux
SOC	Store Operated Channels



T

TDH	Thréonine DésHydrogénase
TFA	TriFluoro Acetic acid
TG	Thapsigargine
TGS	Tris Glycine Solution
T _H helper	Lymphocyte T helper
TIR	Toll-Like Interleukin Receptor
TLC	Thin Layer Chromatography
TLRs	Toll-Like Receptors
TNF- α ,	Tumor Necrosis Factor-alpha
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRP	Transient receptor potential channel
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid

U,V, W

UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra Violet
VGF	Vaccina Growth Factor
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide
W7	N-6-aminohexyl-5-chloro-l-naphthalenesulfonamide



Introduction générale



Avec la commercialisation de la pénicilline en 1941, puis des premières familles d'antibiotiques, les souches bactériennes résistantes ont fait leur apparition. Durant ces deux dernières décennies, de plus en plus de cas de multirésistances bactériennes aux antibiotiques classiques ont été recensés. Au niveau de tous les microorganismes, ces multirésistances sont liées à plusieurs facteurs tels que l'utilisation abusive des antibiotiques en agriculture et élevage, l'utilisation inappropriée des antibiotiques en clinique et de manière plus spécifique, des modifications du microorganisme lui-même. Devant cette situation alarmante, il est urgent de trouver de nouveaux traitements contre lesquels les bactéries n'ont pas encore développé de résistance. A cette fin, diverses voies sont explorées par les chercheurs : (1) celles des bactériophages qui peuvent conférer des gènes de sensibilité aux bactéries, (2) celles des combinaisons thérapeutiques à activité synergique, (3) celles des extraits de plantes de pharmacopée de différents pays, (4) celles des peptides antimicrobiens (PAMs), des peptoïdes et molécules de synthèse obtenues à partir des PAMs.

Le sujet de notre thèse a porté sur les infections intestinales car elles sont la deuxième cause de mortalité infantile : 1,5 million de décès ont été recensés en 2009 par l'OMS (75% des cas dans les pays en voie de développement). Deux milliards de cas sont recensés chaque année. Cela est d'autant plus inquiétant que des diarrhées persistantes peuvent induire à long terme, des maladies inflammatoires de l'intestin, puis un cancer.

Dans ce contexte, l'objectif de notre thèse a été la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes pour lutter contre les infections intestinales. Deux grandes pistes ont été explorées : celle des PAMs naturels dérivés de la chromogranine A (CGA) et celle des plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle béninoise. Quatre pathogènes (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio Cholera*), responsables de graves infections intestinales ont été choisis pour tester l'efficacité des molécules étudiées.

La CGA est une protéine exprimée et libérée par les cellules nerveuses, endocrines et immunitaires au cours du stress. Sous l'effet d'enzymes protéolytiques, la CGA est dégradée pour produire des peptides biologiquement actifs dont certains possèdent des activités antibactériennes et antifongiques et qui ne sont pas toxiques



pour l'hôte. Ainsi, la CGA et ses peptides dérivés sont directement impliqués dans l'immunité innée. Avec la découverte de l'activité de modulation des sécrétions de neutrophiles, leur rôle dans l'immunité a été élargi.

Les plantes médicinales sont utilisées sur tous les continents pour leur efficacité, leur accessibilité et le faible coût par rapport aux médicaments vendus en pharmacie. Un éclairage scientifique sur ces connaissances ancestrales est important pour valider l'usage de quelques-unes de ces plantes. Par ailleurs, les principes actifs de nombreux médicaments vendus en pharmacie ont été découverts dans les plantes. C'est le cas par exemple de l'aspirine isolé du saule blanc à l'origine et utilisé pour le traitement de la fièvre ou du taxol isolé de l'if et utilisé dans le traitement des cancers du sein ou de l'ovaire. Cela traduit toute l'importance des plantes dans la découverte de nouvelles molécules actives.

Notre travail s'est donc articulé autour de deux axes initiés respectivement dans l'unité Inserm U575 (Physiopathologie du système nerveux, Strasbourg) et le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire (Cotonou).

Le premier axe concernant les PAMs dérivés de la CGA est composé de deux volets. Le premier volet analyse l'interaction peptide-bactérie en étudiant l'activité des peptides dérivés de la CGA sur les quatre souches bactériennes retenues et la dégradation des peptides par ces bactéries. Le rôle des PAMs étudiés a été testé en association avec une antibiothérapie conventionnelle. Le deuxième volet de ma thèse porte sur l'analyse de l'interaction de deux peptides, la catestatine CGA₃₄₄₋₃₆₄ et la chromofungine CGA₄₇₋₆₆ sur des cellules de l'hôte jouant un rôle important dans l'immunité intestinale. Il s'agit du modèle des cellules entérochromaffines provenant d'une tumeur carcinoïde humaine, les cellules BON.

Le deuxième axe a pour but de valider l'usage de 14 plantes provenant du Bénin, utilisées en médecine traditionnelle africaine par des études *in vitro*. Pour chaque plante, quatre extraits (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol) ont été obtenus à partir du matériel récolté en milieu naturel, puis séché à l'abri de la lumière au laboratoire et broyé. Une plante, *Chromolaena odorata*, la moins étudiée parmi les plus actives, a été retenue et l'isolement des principes antibactériens a permis d'identifier deux molécules.

Les résultats obtenus pour ces travaux sont présentés dans ma thèse qui comprend trois grandes parties :

❖ Les Données bibliographiques

Après cette courte introduction, une première partie présente les Données bibliographiques récentes importantes pour la compréhension de mon travail. Il s'agit de l'immunité, des PAMs, des granines, des plantes et des maladies intestinales infectieuses.



❖ La Stratégie expérimentale

Cette deuxième partie du document est consacrée aux matériels et méthodes utilisés pour mener à bien nos expériences. Elles ont fait appel à des techniques de biochimie, de protéomique, de chimie, de microbiologie et de biologie cellulaire décrites plus en détail que dans les manuscrits présentés.

❖ Les Résultats et Discussion

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois chapitres articulés autour des deux axes précédemment décrits : les peptides dérivés des chromogranines dans les interactions avec les bactéries ou les cellules entérochromaffines et l'effet des plantes sur les bactéries responsables d'infections intestinales. Ces résultats ont donné lieu à quatre manuscrits originaux (en soumission) et deux articles présentés dans une revue et un chapitre de livre. Ils sont présentés en annexe.

En conclusion, notre travail de thèse a montré que des peptides dérivés de la CGA ont une activité antimicrobienne sur des bactéries pathogènes intestinales. La cateslytine s'est révélée être le peptide le plus actif car elle résiste le mieux à la dégradation bactérienne. Les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour résister à l'action des peptides sont révélés et nous avons montré l'effet synergique des peptides avec des antibiotiques conventionnels. Nous proposons donc cette nouvelle voie thérapeutique.

L'étude de la catestatine et de la chromofungine sur les cellules BON apporte un éclairage sur le rôle que ces deux peptides pourraient jouer *in vivo* au niveau de l'intestin. La chromofungine se révèle être un sécrétagogue plus puissant que la catestatine tandis que la catestatine est capable de bloquer cet effet. Des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu par ces deux peptides.

Nos travaux ont également permis de valider l'usage de 14 plantes médicinales et d'établir un tableau d'efficacité des activités antimicrobiennes observées sur les quatre souches étudiées. Deux flavonoïdes ont été isolés et caractérisés à partir de *Chromolaena odorata* et sont responsables de son activité antibactérienne.







Partie 1 :



**Données
bibliographiques**



Chapitre I : L'immunité

Ce premier chapitre est consacré à l'immunité. Après une brève présentation de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, ainsi que de leurs interactions, nous présenterons les relations existantes entre le système immunitaire et le système nerveux *via* le système endocrinien, qui contrôle notamment la sécrétion des chromogranines (CGs) que nous avons étudiées.

I- Généralités

L'immunologie étudie les moyens de défense des organismes vivants, c'est-à-dire leur immunité. C'est une science en plein essor, comme en atteste le nombre croissant des publications. Les nouvelles maladies émergentes liées à la fragilisation des patients, au vieillissement de la population et à la résistance aux antibiotiques constituent de nouveaux défis pour la science et impliquent la recherche constante d'une meilleure compréhension de l'immunité.

Le système immunitaire est l'ensemble des tissus, cellules, molécules et mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient en propre, "le soi" et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger, "le non soi". Le "non soi" correspond à l'ensemble des substances étrangères, des agents infectieux et de ses propres constituants altérés auxquels il est exposé.

La découverte de l'immunologie est attribuée à Edward Jenner (1749-1823), qui en 1796, découvrit que la vaccine (variole des vaches) induisait chez l'homme une protection contre la variole. Il appela ce processus, vaccination. C'est sur la base de cette découverte que Louis Pasteur (1822-1895) se basa pour inventer le vaccin contre le choléra (1880) et le vaccin antirabique (1884). En 1890, Emil Von Behring (1854-1917) et Shibasaburo Kitasato (1853-1931) découvrent que le sérum d'individus vaccinés contient des substances qui se fixent spécifiquement aux pathogènes correspondants. Ils appelleront ces acteurs de l'immunité adaptative, les anticorps. Auparavant, l'immunologiste Ilya Ilitch Metchnikov (Elie) (1845-1916) avait découvert que de nombreux microorganismes sont ingérés et digérés par les cellules phagocytaires, qu'il appela macrophages. Les macrophages, qui sont immédiatement disponibles pour combattre l'infection, appartiennent à l'immunité innée.

Les concepts de l'immunité innée et de l'immunité adaptative ont longtemps été dissociés l'un de l'autre. A la fin du dix-neuvième siècle deux écoles s'opposent sur le rôle majeur de ces systèmes. L'école allemande avec Paul Ehrlich met en avant le rôle prépondérant des anticorps (immunité adaptative), tandis que l'école franco-

russe avec Metchnikoff soutient, le rôle majeur de la phagocytose (immunité innée). Aujourd'hui, nous savons que l'immunité innée et l'immunité adaptative sont deux mécanismes complémentaires de défense des organismes contre les agressions et que ces deux mécanismes sont étroitement liés. Leurs travaux sur l'immunité leur ont valu conjointement le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908. Autour de ces deux concepts, de nombreuses recherches ont identifié les composants impliqués dans les mécanismes mis en jeu.

Les cellules du système immunitaire naissent dans la moelle osseuse et migrent ensuite dans les tissus périphériques *via* la circulation sanguine et le système lymphatique. Ces cellules sont toutes issues d'un même précurseur : les cellules souches hématopoïétiques. L'origine des cellules du système immunitaire est présentée sur la Figure 1.

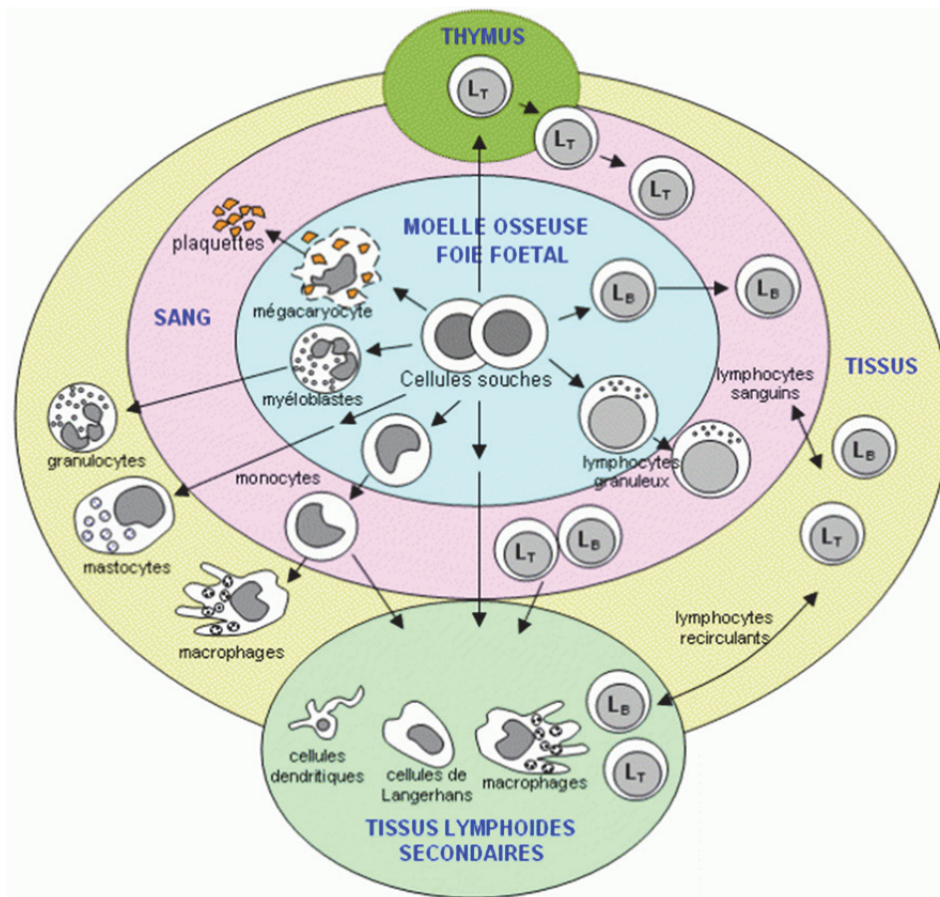


Figure 1 : Origine des cellules du système immunitaire.
 L_T : Lymphocytes T ; L_B : Lymphocytes B (Roitt et al., 1985).

Les cellules immunitaires ainsi formées sont impliquées dans différents mécanismes participant à la défense ou à l'homéostasie de l'organisme. Quelques fonctions importantes de ces cellules sont regroupées dans le tableau I.

L'analyse des fonctions mis en jeu par ces cellules éclaire les rôles respectifs joués par l'immunité cellulaire et l'immunité humorale.

L'immunité cellulaire, en lien avec les cellules de l'immunité innée (les macrophages) ou adaptative (les lymphocytes T) (Tableau I), fait directement appel à des cellules qui se déplacent dans les tissus pour atteindre les zones attaquées par les agents infectieux. Elles sont contrôlées par des messagers biochimiques (Faller et al., 2006).

L'immunité humorale est assurée par les protéines hydrosolubles, les anticorps ou immunoglobulines produits par les lymphocytes B (immunité humorale adaptative) ou des peptides antimicrobiens produits par les neutrophiles et le système du complément (immunité humorale innée).

Les cellules du système immunitaire (Figure 1) sont impliquées dans tout l'organisme, mais se localisent préférentiellement dans la moelle osseuse, les organes lymphoïdes, le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) (Male, 2005).

Dans le processus de défense contre des agents pathogènes, différentes étapes peuvent être définies : la reconnaissance du pathogène, la mise en place de l'immunité innée puis de l'immunité adaptative.

Tableau I : Les cellules dérivées des cellules souches et leurs rôles.

	Cellules	Fonctions	
Précurseur myéloïde	Plaquettes	Coagulation du sang, homéostasie, réactions inflammatoires et anti-infectieuses	Immunité innée
	Erythrocytes	Cellules anucléées riches en hémoglobine transportant l'oxygène	
	Monocytes macrophages	Phagocytose Activation des mécanismes de bactéricidie, Présentation de l'antigène	
	Granulocytes Neutrophiles	Cellules phagocytaires très importantes Activation des mécanismes de bactéricidie	
	Granulocytes Eosinophiles	Défense contre les infections parasitaires	
	Granulocytes Basophiles	Défense dans les allergies	
	Mastocytes	Libération de substances affectant la perméabilité vasculaire Réponses allergiques Protection de la muqueuse contre les pathogènes	
	Cellules dendritiques	Capture et présentation de l'antigène	
	Précurseur lymphoïde	Cellules tueuses (Natural Killer)	
Lymphocytes B		Sécrétion d'anticorps	
Lymphocytes T		Lymphocytes T cytotoxiques : sécrétion d'anticorps	

II- La reconnaissance du pathogène

La reconnaissance du pathogène est l'étape préalable à l'activation du système immunitaire. Elle se fait *via* les motifs moléculaires associés aux pathogènes et les récepteurs de reconnaissance localisés sur les cellules de l'hôte.

Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) sont des structures ou substances indispensables aux microorganismes pour leur croissance et leur survie. Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance des cellules de l'hôte (PRRs, *Patterns Recognition Receptors*) tels que la collectine, ficoline, les *Toll-Like*, les protéines NOD (*Nucleotide binding oligomerization domain*), le complément, la protéine C réactive et la lectine liant le mannose.

Les PRRs se retrouvent dans l'épithélium, qui est la première structure de défense de l'immunité innée. Ils se divisent en trois groupes :

- les récepteurs sécrétés : ce sont des opsonines qui se lient aux parois cellulaires et marquent les microbes pour la dégradation par le système du complément ou pour la phagocytose à l'exemple de la lectine fixant le mannose,
- les récepteurs endocytotiques : ils sont exprimés à la surface des phagocytes et interviennent dans l'ingestion et le transport des microorganismes vers les lysosomes. C'est l'exemple des récepteurs *scavenger* qui se lient aux parois bactériennes pour les éliminer de la circulation (Burmester et Pezzutto, 2005),
- les récepteurs de signalisation : ils sont impliqués dans l'activation des récepteurs ayant rencontré un microorganisme. C'est le cas des TLRs (*Toll-like receptors*), des NODs ou encore des hélicases (Delneste et al., 2007).

Les PAMPs, leur origine, les PRRs qui les reconnaissent et la réponse qu'ils provoquent sont résumés dans le Tableau II.

Parmi les PRRs, la famille des TLRs représente un groupe très important. Ils sont situés la surface des cellules du système immunitaire et sur des cellules ayant un contact avec le milieu externe (cellules épithéliales pulmonaires, cellules intestinales et cellules de la peau). Découverts pour la première fois chez la drosophile (Hoffmann et al., 1996), les TLRs sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine extracellulaire riche en Leucine : LRR (*Leucine Rich Repeat*), une partie transmembranaire riche en cystéine et un domaine intracytoplasmique également retrouvé dans les récepteurs des interleukines (IL) IL-1 et IL-18 et appelé TIR (*Toll-Like Interleukin Receptor*). Chez l'humain, il existe 11 TLRs dont 9 sont mieux connus. Ils sont localisés dans la membrane plasmique (TLR1, 2, 4, 5 et 6) ou dans les endosomes (TLR 3, 7, 8 et 9) (Kabelitz et Medzhitov, 2007). Ils reconnaissent les

motifs répétés riches en leucine des bactéries, champignons, virus à ADN et ARN, mycobactéries et protozoaires. Ainsi activés, ces TLRs vont conduire à la synthèse de cytokines proinflammatoires par l'intermédiaire de protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid differentiation domain*) et Mal (*MyD88 Adaptor-Like*) et à la synthèse d'interféron de type I par la voie dépendante des TRIF (*TRIF-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (Takeda et Akira, 2004 ; Takeda et Akira, 2005).

Tableau II : Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les récepteurs de reconnaissance (PRRs) (adapté de (Abbas et Lichtman, 2005).

Motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMPs)	Origine	Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs)	Réponse principale de l'immunité innée
ARN double brin	Virus en réplication	Les récepteurs de TLR3	La production de l'interféron de type I par les cellules infectées
Lipopolysaccharide	Paroi des bactéries gram-	Le récepteur TLR4 /CD14	L'activation des macrophages
Nucléotide CpG non méthylés	ADN bactérien	Le récepteur de TLR9	L'activation des macrophages
N-formylméthionyl peptides	Protéines bactériennes	Les récepteurs aux N-formylméthionylpeptides	L'activation des macrophages et des neutrophiles
Glycanes riches en mannose	Glycoprotéines et glycolipides bactériens	1-Le récepteur de mannose des macrophages (MMR) 2-La lectine liant le mannose	1-La phagocytose 2-L'opsonisation, l'activation du système du complément
Phosphorylcholine	Membrane microbienne	La protéine C réactive du plasma	L'opsonisation, l'activation du système du complément

III- L'immunité innée

Lors d'une agression de l'organisme, l'immunité innée est la première ligne de défense non-spécifique. Elle a pour but de fournir les premières défenses contre les pathogènes et ensuite d'informer l'immunité adaptative pour une défense plus spécifique. Cette réponse est l'action spontanée et coordonnée de différents types cellulaires et de facteurs circulants.

III-1- Les barrières épithéliales

Les barrières épithéliales sont des barrières physiques et chimiques contre les infections. Elles protègent les interfaces entre l'organisme et le milieu extérieur et se

localisent sur la peau, les muqueuses des tractus digestif, respiratoire et urogénital. Elles interfèrent physiquement avec l'entrée des microbes par des mécanismes d'acidification (Blanchette et al., 2009) ou par la production de molécules antimicrobiennes. C'est le cas de la cathélicidine LL-37 ou encore de la catestatine ou la chromofungine, des peptides dérivés de la chromogranine A qui font l'objet de mon travail de thèse (Metz-Boutigue et al., 2010 ; Wiesner et Vilcinskas, 2010 ; Schroder, 2011).

III-2- Les phagocytes

Les phagocytes sont des cellules sanguines. Il en existe trois types : les granulocytes, les macrophages et les cellules dendritiques.

Les phagocytes sont responsables de la destruction des microorganismes, des corps apoptotiques et nécrotiques. La phagocytose a été découverte par Elie Metchnikoff en 1882 (Karnovsky, 1981). Les principales étapes de ce processus sont illustrées sur la figure 2.

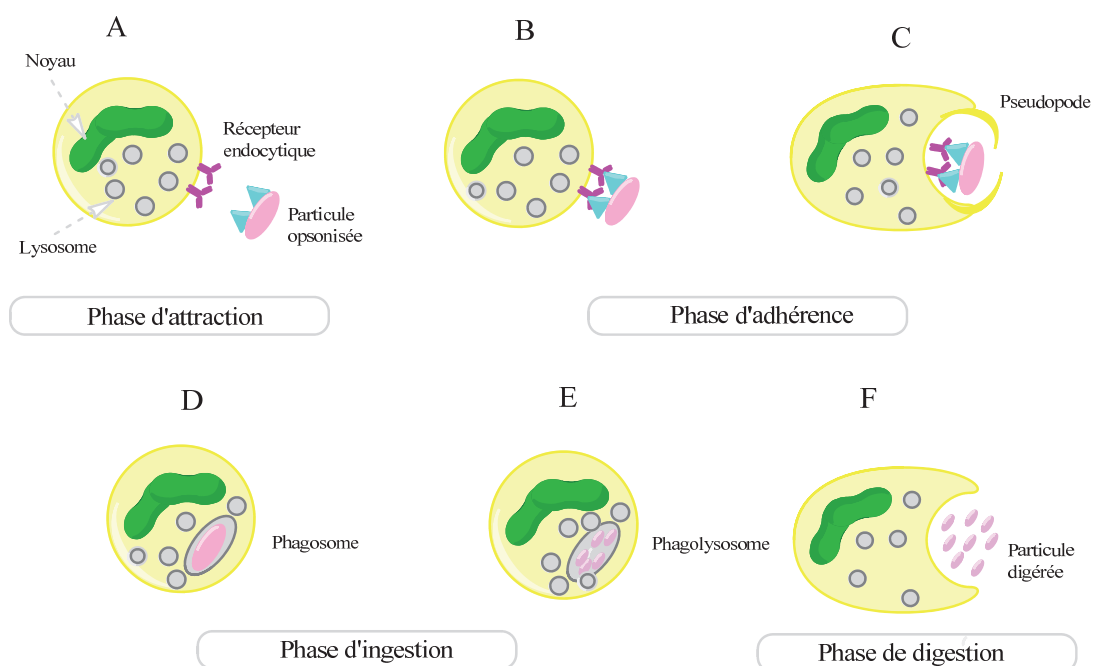


Figure 2 : Les différentes phases de la phagocytose.

Durant La première phase (A), la particule étrangère (bactérie, virus, champignons..) est marquée par opsonisation. Elle est attirée par chimiotactisme vers les cellules phagocytaires possédant des récepteurs endocytotiques. La phase d'adhérence (B) consiste en la fixation de la particule opsonisée sur ces récepteurs. La cellule émet alors des pseudopodes pour englober cette particule étrangère (C). La troisième phase (D) est la phase d'ingestion au cours de laquelle, il y a formation d'un phagosome. La quatrième phase est la digestion. Sur le phagosome, viennent se fixer des lysosomes (E) qui vont digérer la particule étrangère pour produire un phagolysosome. Les particules digérées sont ensuite expulsées de la cellule par exocytose (F).

❖ Les granulocytes ou polynucléaires

Ces leucocytes sont les cellules blanches les plus abondantes du sang et se composent des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles. Les neutrophiles sont recrutés au niveau des sites d'inflammation ou d'infection par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes. Libérés dans les vaisseaux sanguins lors de la diapédèse (phénomène de libération des cellules matures, érythrocytes, plaquettes, leucocytes, etc., des réserves médullaires dans le sang circulant), les neutrophiles passent dans les tissus conjonctifs cibles et meurent après la phagocytose à la différence des autres cellules phagocytaires. En plus de la phagocytose, ils induisent la sécrétion de PAMs (Figure 3), d'intermédiaire oxygènes réactifs (ROI, *Reactive Oxygen Intermediate*) (Nathan, 2006), de cytokines et interviennent aussi dans l'immunité adaptative.

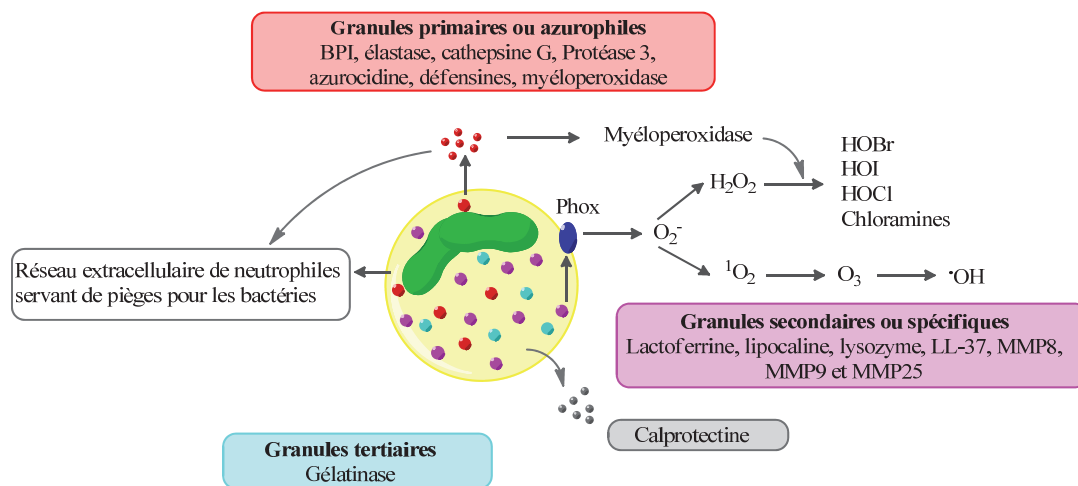


Figure 3 : Mécanismes de défense mettant en jeu les neutrophiles

(adapté de Nathan, 2006).

Les granules azurophiles, les granules spécifiques et les granules tertiaires sécrètent des molécules à activité antimicrobienne. Des espèces réactives d'oxygène, toxiques pour les pathogènes, sont produites par l'assemblage et l'activation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase oxydase (NADPH-oxydase, Phox) au niveau de la membrane plasmique et de la membrane du phagosome. H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène, BPI : protéine bactéricide augmentant la perméabilité, HOBr : acide hypobromeux, HOCl : acide hypochloreux, HOI : acide hypoiodéux, MMP : métalloprotéinase matricielle, ¹O₂ : oxygène singulet, O₂⁻ : superoxyde, O₃ : ozone, ·OH : radical hydroxyle (adapté de Nathan, 2006).

Les granules des neutrophiles ont été analysés par protéomique et se sont révélés particulièrement riches en protéines de défense (Borregaard et Cowland, 1997 ; Lominadze et al., 2005). Les neutrophiles émettent en plus dans le milieu extracellulaire des filaments composés d'ADN et de protéines lorsqu'ils sont activés. Ces filaments de 15 nm de diamètre forment un réseau (*Neutrophil Extracellular Trap*,

NET) servant à piéger et détruire les pathogènes (Brinkmann et al., 2004). Un article récent résume leur implication dans l'immunité innée et adaptative (Mantovani et al., 2011). Les neutrophiles sont impliqués dans de nombreuses maladies comme les infections causées par des pathogènes intracellulaires (Silva, 2011), l'auto-immunité (Hakim et al., 2010), l'inflammation chronique (Bian et al., 2012) ou le cancer (Gregory et Houghton, 2011).

Les basophiles possèdent des granules riches en histamine et en leucotriène C4 qui interviennent pour combattre les réactions allergiques et les parasitaires (Karasuyama et al., 2011). Ils induisent la sécrétion de chimiokines (Falcone et al., 2011 ; Iikura et al., 2001) et la sécrétion des lymphocytes T_H2 *via* l'IL-4 (Falcone et al., 2011), mais leur rôle est assez controversé car les basophiles sont également impliqués dans l'induction d'allergies chroniques par l'intermédiaire des immunoglobulines E (IgE) (Mukai et al., 2005 ; Mukai et al., 2009).

Les polynucléaires acidophiles (ou éosinophiles) ont une action antiparasitaire mise en jeu lorsqu'ils déversent le contenu de leurs granules sur les parasites et jouent aussi un rôle dans l'allergie (Lynch et Gold, 2011). Les éosinophiles expriment les ARNs des TLR1, TLR4, TLR7, TLR9 et TLR10 et peuvent être activés par les TLR7 ligand *via* R-848, qui est un ligand des TLRs (Nagase et al., 2003). Les éosinophiles sont également impliqués dans le maintien de l'homéostasie, l'immunorégulation, l'immunité adaptative et les réactions inflammatoires (Kita, 2011).

❖ Les macrophages

Les macrophages dérivent des monocytes qui sont des leucocytes évoluant pour produire des macrophages ou des cellules dendritiques. Cette différenciation se fait au contact de l'endothélium (Revillard et Revillard, 2001) et est médiée par les G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), les GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et l'IL-4 (Chomarat et al., 2000). Les macrophages coopèrent avec les granulocytes pour la phagocytose (Burmester et Pezzutto, 2005) en libérant des substances toxiques pour les microorganismes. Ils possèdent également des PRRs qui vont reconnaître ces microorganismes et induisent ainsi le recrutement de neutrophiles et la sécrétion de cytokines. Les différentes populations de macrophages expriment des récepteurs spécifiques du tissu dans lequel ils se trouvent. Ainsi, les macrophages situés dans l'intestin n'expriment pas de TLR4. C'est un PRR qui reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des Gram négatifs. Ceci est important pour la tolérance immunitaire de l'intestin vis-à-vis de la flore bactérienne importante pour son équilibre. Les macrophages sécrètent IL-1 qui va stimuler la prolifération puis la différenciation des lymphocytes T4 et sont ainsi impliqués dans l'immunité adaptative. Ils participent à l'homéostasie en éliminant les débris cellulaires et autres résidus de l'organisme. Ils interviennent également en tant

que cellules présentatrices d'antigènes en exprimant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH).

Deux types de macrophages (M1 et M2) sont activés en réponse à des microorganismes ou à des médiateurs. Les macrophages M1 (état d'activation classique) sont des cellules effectrices qui sont activées par des cytokines produites par les lymphocytes Th1 telles que IL-1 β , IFN γ ou par des agents microbiens tels que les lipopolysaccharides bactériens. Ils produisent principalement des cytokines proinflammatoires comme TNF α , IL-6 et IL-12. Une activation excessive et prolongée des M1 peut entraîner une lésion tissulaire et contribuer à la pathogénie. Les macrophages M2 (état d'activation alternative) comprennent au moins trois sous-ensembles: M2A (induites par l'IL-4 ou IL-13), M2b (induites par des complexes immuns et les agonistes de TLR ou les récepteurs de IL-1) et M2c (induites par IL-10 et des glucocorticoïdes). Les macrophages dits M2 jouent un rôle essentiel dans la résolution de l'inflammation par la production de médiateurs anti-inflammatoires (Chinetti-Gbaguidi, 2007 ; Benoit et al., 2008). Ainsi, l'activation des macrophages peut être soit pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire.

❖ Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques dérivent des monocytes. Elles sont issues d'un précurseur qui produit également les cellules de Langerhans de la peau. Elles interviennent dans la phagocytose et Schulte a montré leurs implications dans la phagocytose des entérovirus au niveau du pancréas (Schulte et al., 2010). Elles expriment plusieurs types de récepteurs ainsi que des PRRs et sont des cellules présentatrices d'antigènes (immunité adaptative) (Savina et Amigorena, 2007).

III-3- Les cellules Natural Killer

Les cellules *Natural Killer* (NK) ou cellules tueuses, sont des lymphocytes qui tuent les cellules infectées par des pathogènes. Elles produisent l'interféron gamma qui est une cytokine activant les macrophages. Elles expriment deux types de récepteurs : des récepteurs qui sont inhibés, KIR (*Killer Inhibitory Receptors*) ou activés KAR (*Killer Activating Receptors*) par les cellules de l'hôte. Les récepteurs inhibiteurs appartiennent au CMH. Les NK expriment aussi des récepteurs des anticorps IgG et sont activées par des interleukines (IL-12) (Granucci et al., 2004) ; (Andoniou et al., 2005). Elles interviennent également dans la cytotoxicité contre les cellules cancéreuses (présence de perforine, de granzyme dans leurs granules) et dans la résistance contre les microorganismes pathogènes (Bancroft, 1993).

III-4- Le système du complément

Les molécules du système du complément sont synthétisées par les hépatocytes, les cellules épithéliales intestinales et les macrophages (Chapel et al., 2004). Le système du complément intervient pour aider les anticorps à détruire les antigènes. Il est composé d'un ensemble de protéines circulantes ou membranaires importantes dans la défense contre les microorganismes.

L'activation du complément se fait par trois voies : la voie classique déclenchée par liaison de la C1q à des complexe anticorps/antigènes ou à la surface du pathogène, la voie alterne déclenchée par la présence de molécules bactériennes et la voie des lectines liant les résidus de mannose des membranes bactériennes qui est activée par liaison de la protéine sérique MBL (*Mannan Binding Lectin*) (Sarma et Ward, 2011). Il existe 9 protéines pour la voie classique (de C1 à C9) et 5 protéines pour la voie alterne (B, H, I, D et P) (Giclas, 2001). Cette activation permet la mise en jeu d'une cascade de réactions *via* ces protéines qui vont attaquer l'antigène (Figure 4).

Le rôle principal du complément est l'internalisation et l'opsonisation des pathogènes *via* la protéine C3b (Dunkelberger et Song, 2010). Il intervient aussi en stimulant le chimiotactisme des cellules immunitaires vers les sites d'infection (C3a, C4a, C5a) et favorise la formation du complexe d'attaque (CAM) de protéines polymérisées qui vont former des pores dans la membrane microbienne entraînant ainsi les influx d'eau et d'ions et provoquant la mort du microorganisme (Abbas et Lichtman, 2005). Le complément initie la réponse humorale *via* la protéine C3d et son activation génère la production des peptides antimicrobiens (Nordahl et al., 2004). Cette activation du complément est limitée par les protéines de régulation. Le Tableau III indique l'exemple de quelques protéines régulatrices du système du complément, leur localisation et leurs fonctions.

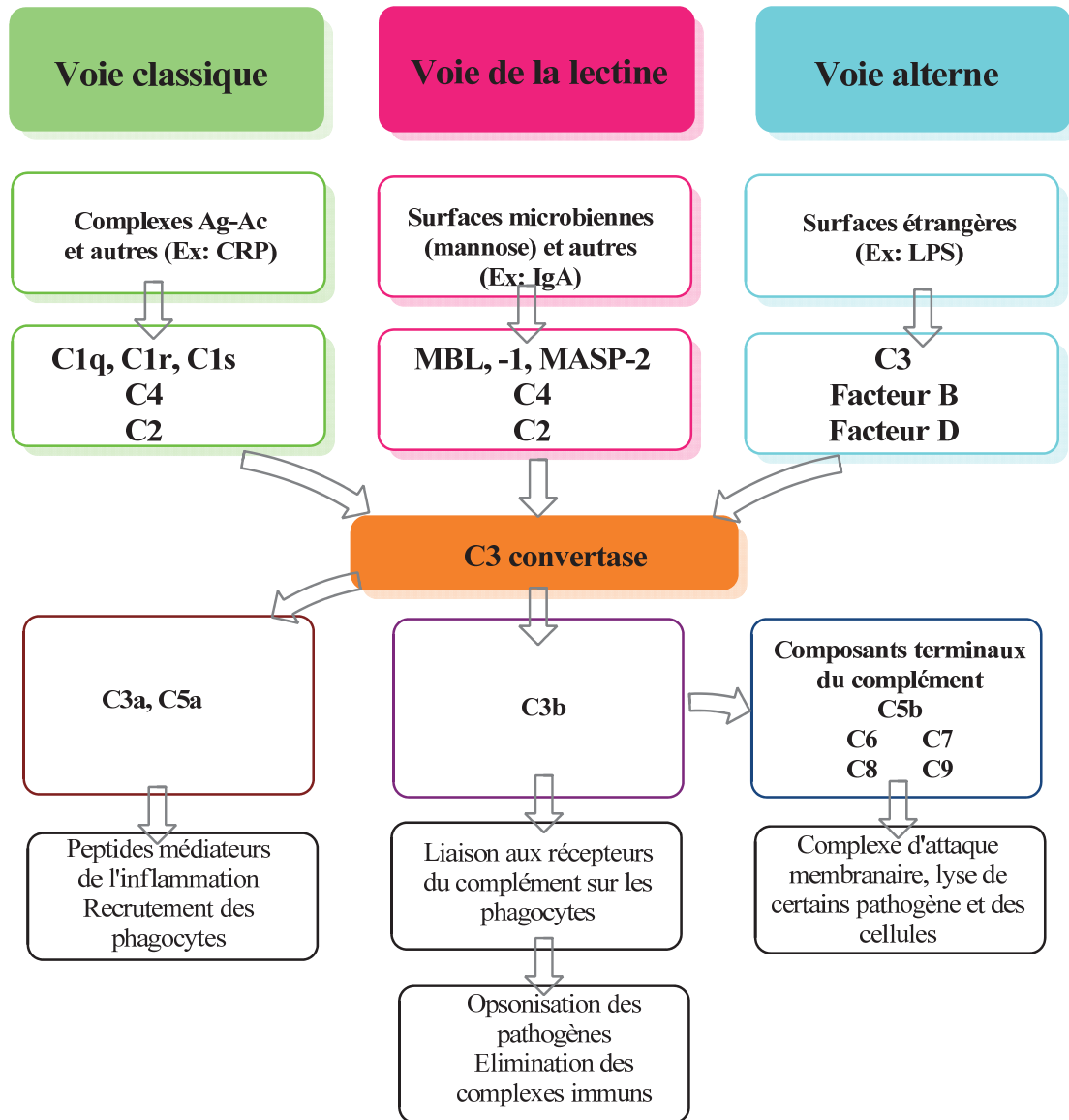


Figure 4 : Les principaux composants du complément et leurs actions effectrices
(Janeway et Travers, 2003).

L'activation (précoce) de l'une des trois voies du complément aboutit à la formation de la C3 convertase. Celle-ci est clivée en C3a et en C3b. C3a et C5a (provenant du clivage de la C5 par la C3b liée à la C3 convertase) sont des médiateurs locaux de l'inflammation. C3b se lie de manière covalente à la membrane des bactéries et les opsonise pour la phagocytose. C5b déclenche les événements tardifs menant à l'assemblage du complexe d'attaque membranaire (CAM) permettant la lyse des pathogènes (Janeway et Travers, 2003).

Tableau III : Exemple de quelques protéines régulatrices du système du complément, leur localisation et leurs fonctions.

DAF : *decay accelerating factor*, MIRL : *membrane inhibitor of reactive lysis*, MCP : *Membrane cofactor protein*, C4BP : *C4 binding protein*.

Protéines régulatrices du complément	Localisation	Fonctions
DAF	Membrane des cellules sanguines, endothéliales et épithéliales	Inhibition de la formation de nouvelles C3 convertase et diminution de la demi-vie de celles existantes (Liszewski et al., 1996)
CD59 (ou MIRL)	Membrane des pathogènes	Blocage de la formation du complexe d'attaque membranaire (Meri et al., 1990)
MCP	Membrane des cellules autres que les hématies	Hydrolysatation de C3b en peptides non fonctionnels <i>via</i> une sérine protéase (Sim et al., 1993)
C1qR	Plasma	Arrêt de l'activation de C1 (Fishelson et Muller-Eberhard, 1987)
C4BP	Plasma	Blocage du recrutement de C2 (Suankratay et al., 1999)

III-5- Les cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles servant de médiateurs des réactions cellulaires immunitaires et inflammatoires. Elles sont responsables des communications entre les leucocytes ou entre les leucocytes et d'autres cellules. Elles sont sécrétées par les cellules immunitaires, telles que les macrophages activés par la présence de microbes. Elles sont également produites par les lymphocytes T auxiliaires de l'immunité adaptative (Lacy et Stow, 2011). Une illustration de leur rôle dans l'immunité innée est donnée dans le tableau IV. Ce groupe comprend également des cytokines chimioattractantes appelées chimiokines, qui agissent sur la mobilité de plusieurs types cellulaires en se couplant aux protéines G, les interférons (IFN α , β , γ ,...), les interleukines (IL-), les facteurs de nécrose tumorale (TNF-), les facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF) et les facteurs de croissance de transformation (TGF, *Transforming Growth Factor*).

D'autres protéines différentes des cytokines, les protéines plasmatiques, participent à la défense contre les infections à l'exemple de la ficoline (Endo et al., 2011) ou des pentraxines comme la protéine réactive C, le composant sérique amyloïde P (Deban et al., 2010) et également des transferrines.

Tableau IV : Principales cytokines de l'immunité innée, leurs sources cellulaires et leurs cibles cellulaires et tissulaires (Abbas et Lichtman, 2005).

Cytokine	Source(s) cellulaire(s) principale(s)	Cibles cellulaires et tissulaires principales et effets biologiques
Facteurs de nécrose des tumeurs (TNF)	Macrophages Lymphocytes T	Cellules endothéliales : activation (inflammation, coagulation) Neutrophiles : activation Hypothalamus : fièvre Foie : Synthèse de protéine de la phase aigüe Muscle, tissu adipeux : catabolisme (cachexie) Nombreux types cellulaires : apoptose
Interleukine (IL-1)	Macrophages Cellules endothéliales Certaines cellules épithéliales	Cellules endothéliales : activation (inflammation, coagulation) Neutrophiles : activation Hypothalamus : fièvre Foie : Synthèse de protéine de la phase aigüe
Chimiokines	Macrophages, Lymphocytes T Cellules endothéliales Fibroblastes Plaquettes	Leucocytes : chimiotactisme, activation
Interleukines -12 (IL-12)	Macrophages Cellules dendritiques	Cellules NK et lymphocytes T : synthèse d'IFN- γ , augmentation de l'activité cytotolytique Lymphocytes T : différenciation en lymphocytes T _{H1}
Interféron-γ (IFN-γ)	Cellules NK Lymphocytes T	Activation des macrophages Stimulation de certaines réponses par anticorps
Interféron de type 1 (IFN-α, IFN-β)	IFN- α : macrophages IFN- β : fibroblastes	Toutes les cellules : action virale, augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I Cellules NK : activation
Interleukine-10 (IL-10)	Macrophages Lymphocytes (en particulier lymphocytes T _{H2})	Macrophages : inhibition de la production d'IL-12, réduction de l'expression des molécules de costimulation et des molécules du CMH de classe II
Interleukine-6 (IL-6)	Macrophages Cellules endothéliales Lymphocytes T	Foie : Synthèse de protéine de la phase aigüe Lymphocytes B : prolifération des cellules productrices d'anticorps
Interleukine-15 (IL-15)	Macrophages, autres cellules	Cellules NK : prolifération Lymphocytes T : prolifération
Interleukine-18 (IL-18)	Macrophages	Cellules NK et lymphocytes T : synthèse d'IFN- γ

IV- L'immunité adaptative

Les cellules de l'immunité innée interviennent dans les premières phases de l'infection ou de l'inflammation après le contact avec le pathogène. Par la suite, l'immunité adaptative intervient pour lutter de manière plus ciblée contre ces attaques.

L'immunité adaptative est déclenchée par des molécules de l'immunité innée activant les antigènes et les lymphocytes T et B. De très nombreux travaux de recherche s'intéressent à l'immunité adaptative qui est spécifique de l'antigène. Ils sont si nombreux qu'ils ne peuvent être résumés. Aussi nous contenterons nous d'une brève description des cellules impliquées.

IV-1- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T, intervenant dans l'immunité à médiation cellulaire, se différencient dans le thymus (T). Leur rôle essentiel est de reconnaître les antigènes provenant des cellules hôtes (le « soi »). Ils sont composés de différentes populations. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules du CMH sont des protéines membranaires se trouvant sur les cellules présentatrices d'antigènes (Figure 4). Les lymphocytes T se répartissent en plusieurs catégories :

- Les lymphocytes T intra-épithéliaux retrouvés dans les tissus sous muqueux et constitués en majorité de cellules T $\gamma\delta$
- Les lymphocytes T cytotoxiques qui sont à majorité des CD8⁺ (Cluster de différenciation, antigènes exprimés à la surface par différentes populations cellulaires du système immunitaire) capables de détruire les cellules cibles infectées par un microbe
- Les lymphocytes T auxiliaires ou *helper* T_H : à majorité des CD4⁺ qui aident les lymphocytes B à se différencier et à produire des anticorps grâce à des cytokines ou par contact direct. Les lymphocytes T_{H0}, T_{H1}, T_{H2} sont différenciés par les cytokines qu'elles produisent
- Les lymphocytes T suppressifs régulent négativement l'action des lymphocytes B.

Récemment, une autre population de lymphocytes, les Th17 ont été identifiés (Harrington et al., 2006). Ce sont des lymphocytes impliqués dans les maladies infectieuses et auto-immunes (Cambier et al., 2010) et dans les réponses pro-inflammatoires *via* la production d'IL-17. Au niveau intestinal, les lymphocytes Th17 sont également impliqués dans le processus de l'inflammation intestinale.

IV-2- Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, nommés d'après leur provenance de la bourse de Fabricius chez les oiseaux, sont les principales cellules responsables de l'immunité à médiation humorale. Ce sont des cellules sécrétrices d'anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig). Ils présentent à leur surface des récepteurs spécifiques d'antigènes. Ils sont moins spécifiques que les lymphocytes T, car ils répondent à d'autres molécules que les protéines comme les constituants altérés du soi (Male, 2005).

Il en existe plusieurs types (Figure 5) :

- Les plasmocytes ou cellules sécrétrices d'anticorps : ce sont des lymphocytes B qui se sont différenciés à la suite d'une rencontre avec un antigène
- Les cellules B1 et B2 sont des sous-populations qui se développent dans les centres germinatifs
- Les cellules à mémoire qui peuvent être aussi issues des lymphocytes T. Ce sont des cellules ayant déjà rencontré un antigène et donc capables si elles le rencontrent à nouveau de sécréter les anticorps plus rapidement. Les cellules B à mémoire portent des IgGs et IgAs (Male, 2005)
- Les cellules naïves qui n'ont jamais rencontré d'antigène et donc ne sécrètent pas d'anticorps.

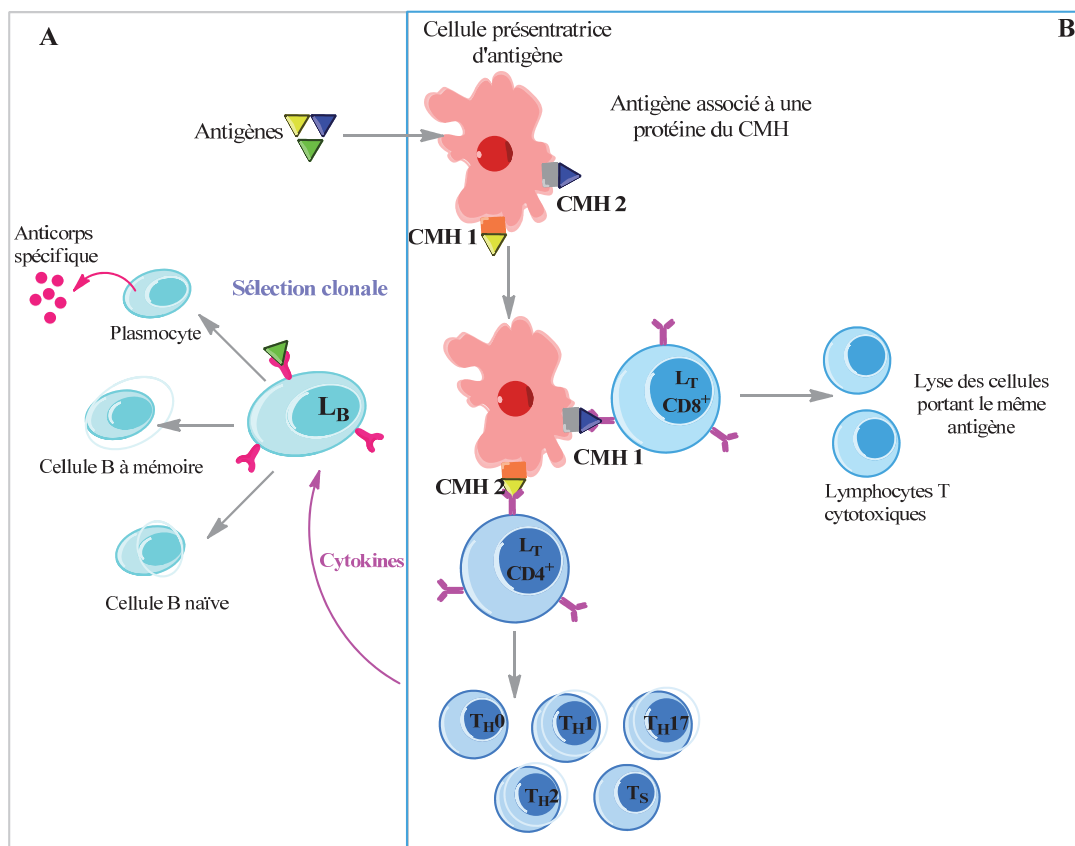


Figure 5 : Stimulation antigénique des lymphocytes B (LB) et des lymphocytes T (LT).

Les cellules présentatrices d'antigènes présentent les antigènes aux LB et LT. (A) La reconnaissance de l'antigène par des LB induit leur activation, les transformant en plasmocytes qui synthétisent des anticorps. Les LB ayant rencontré un antigène vont devenir des LB à mémoire capables de reconnaître ce même antigène lors d'une nouvelle attaque. Les LB n'ayant pas encore rencontré les antigènes spécifiques sont les cellules naïves. (B) Les lymphocytes T CD4+ se différencient en lymphocytes T "helper" (TH0, TH1, TH2, TH17) ou en lymphocytes T suppressives (TS). Ces LT CD4+ sécrètent des cytokines qui régulent l'activité des LB. Les LT CD8+ se différencient en lymphocytes cytotoxiques conduisant à la lyse des cellules étrangères portant le même antigène.

IV-3- Autres mécanismes de défense

Pour se défendre contre les agressions, l'hôte utilise également comme moyen de défense :

- L'acidification nécessaire à l'activité de certaines enzymes
- La séquestration du fer qui est indispensable à la croissance des bactéries exemple de la lactoferrine, une protéine produite par l'hôte. Elle est libérée lors de la dégranulation des neutrophiles et lie le fer.

V- Relations entre le système immunitaire, le système endocrinien et le système nerveux

Pendant de nombreuses années, on a considéré que le système immunitaire était indépendant, mais des données récentes démontrent qu'il communique avec les systèmes nerveux et endocrinien.

V-1- Généralités sur les systèmes nerveux et endocrinien

Le système nerveux (SN) composé du SN cérébro-spinal (SN central et SN périphérique) et du SN végétatif est un système en réseau formé de l'encéphale, des organes des sens, des nerfs et de la moelle épinière. Il coordonne les mouvements musculaires, contrôle le fonctionnement des organes, véhicule les informations sensorielles et motrices vers les effecteurs.

Le système nerveux végétatif dirige et coordonne les fonctions internes de l'organisme, et son fonctionnement est automatique. Il se compose :

- du système nerveux sympathique qui a pour neurotransmetteur l'adrénaline
- du système parasympathique dont l'acétylcholine est le neurotransmetteur.

Le système endocrine est composé de l'ensemble des glandes endocrines (hypophyse, pinéale, thyroïde, parathyroïde, thymus, surrénales) et des cellules endocrines (îlots pancréatiques, cellules interstitielles des testicules et des ovaires) sécrétant dans le sang des messagers chimiques (hormones). Les hormones induisent des réponses lentes avec des effets prolongés (régulation du métabolisme cellulaire, contribution de la réponse au stress...) (Mader, 2009).

Parmi les glandes endocrines, l'hypophyse joue un rôle très important, car elle est reliée à l'hypothalamus, un organe neuro-endocrinien appartenant au système nerveux central. L'hypophyse et l'hypothalamus forment ainsi un axe appelé axe hypothalamo-hypophysaire qui joue un rôle essentiel dans la régulation des sécrétions hormonales.

V-2- Interactions entre le système nerveux et le système immunitaire *via* le système endocrinien

L'axe hypothalamo-hypophysaire participe au maintien de l'homéostasie, à la reproduction, à la croissance et à la différenciation. Il intègre les informations provenant du système nerveux central et des substances véhiculées dans la circulation. Les informations d'origine nerveuse sont d'ordre interne (variation périodique d'hormones) ou externe (stress). Les situations de stress entraînent la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) dont ceux dérivés des chromogranines (CGs) (Chapitre 3). Ces actions sont coordonnées et régulées par le système nerveux *via* le système endocrinien.

Dans les années 1990, plusieurs études ont montré que les stimuli bioélectriques provoquent la libération des anticorps par les lymphocytes (Liburdy, 1992). Inversement il a été observé que l'interleukine-2 entraînent des modifications bioélectriques mais le mécanisme n'a pas été décrit (Bindoni et al., 1988). Ainsi, les relations système nerveux-système immunitaire *via* le système endocrinien ne sont pas unidirectionnelles mais plutôt bidirectionnelles.

Le contrôle neuroendocrine immunitaire sur le site de l'inflammation est médié par la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses.

Le système nerveux végétatif, par ses voies sympathiques et parasympathiques influence l'immunité innée. En effet, l'injection d'adrénaline active le recrutement des *Natural killers*, des monocytes et des cellules T chez les patients atteints d'arthrites rhumatoïdes (Kittner et al., 2002). De même la noradrénaline joue un rôle central dans la régulation neuronale du système immunitaire (Besedovsky et del Rey, 1996) ; (Elenkov et al., 2000) ; (Sanders et Straub, 2002). L'acétylcholine se lie aux macrophages et aux cellules endothéliales à travers le récepteur nicotinique $\alpha 7$, en réduisant leur activation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Saeed et al., 2005). D'autres hormones telle que la CRH (*Corticotrophin Release Hormone*), la substance P, CGRP (*Calcitonin Gene-Regulated Peptides*), impliquées dans la défense innée ont essentiellement une activité pro-inflammatoire sur les cellules immunitaires. Par exemple, un stress important est susceptible de stimuler les CRH par l'intermédiaire des cytokines comme TNF- α , IL-1 ou IL-6 et accroît la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) et du cortisol. Le cortisol inhibe les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages. La substance P favorise la libération de médiateurs vaso-actifs, comme la sérotonine et l'histamine, par les mastocytes, l'amélioration de la vasodilatation, la fuite vasculaire et l'œdème (Guhl et al., 2005). Inversement, les opioïdes et le VIP (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*) ont des propriétés anti-inflammatoires. VIP inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et les lymphocytes T, mais stimule la production d'IL-1. Il inhibe la fonction des cellules NK et réduit l'expression des TLRs sur les cellules épithéliales intestinales (Delgado et al., 2004) Di Comite, 2007). Les β -

endorphines et l'enképhaline inhibent la production d'ACTH. De plus, les hormones sexuelles et les glucocorticoïdes interviennent sur les cellules immunitaires (Escribese et al., 2011 ; Silva et al., 2011).

Le stress, l'anxiété, la dépression affaiblissent les défenses immunitaires (Nakata et al., 2011). Il a été montré qu'une augmentation d'adrénaline et de prostaglandines consécutive à un stress diminuait l'activité des NK chez le rat.

Les peptides antimicrobiens de l'immunité, sécrétés par le système nerveux ou le système immunitaire, influencent aussi l'un ou l'autre de ces systèmes. Ainsi, les peptides dérivés des granines, libérés en même temps que les catécholamines par les granules de sécrétion des glandes surrénales, ont un effet sur les cellules de l'immunité. Par exemple, la catestatine a un effet chimiotactique et donc contribue à la mobilisation des polymorphonucléaires sur le site de l'inflammation (Shooshtarizadeh et al., 2010). De plus la catestatine et la chromofungine activent la sécrétion des neutrophiles *via* les canaux SOC (*Store Operated Channels*) en induisant un influx de calcium intracellulaire (Zhang et al., 2009).

La Figure 6 résume la majorité des interactions entre le système nerveux et le système immunitaire *via* le système endocrinien (Di Comite et al., 2007).

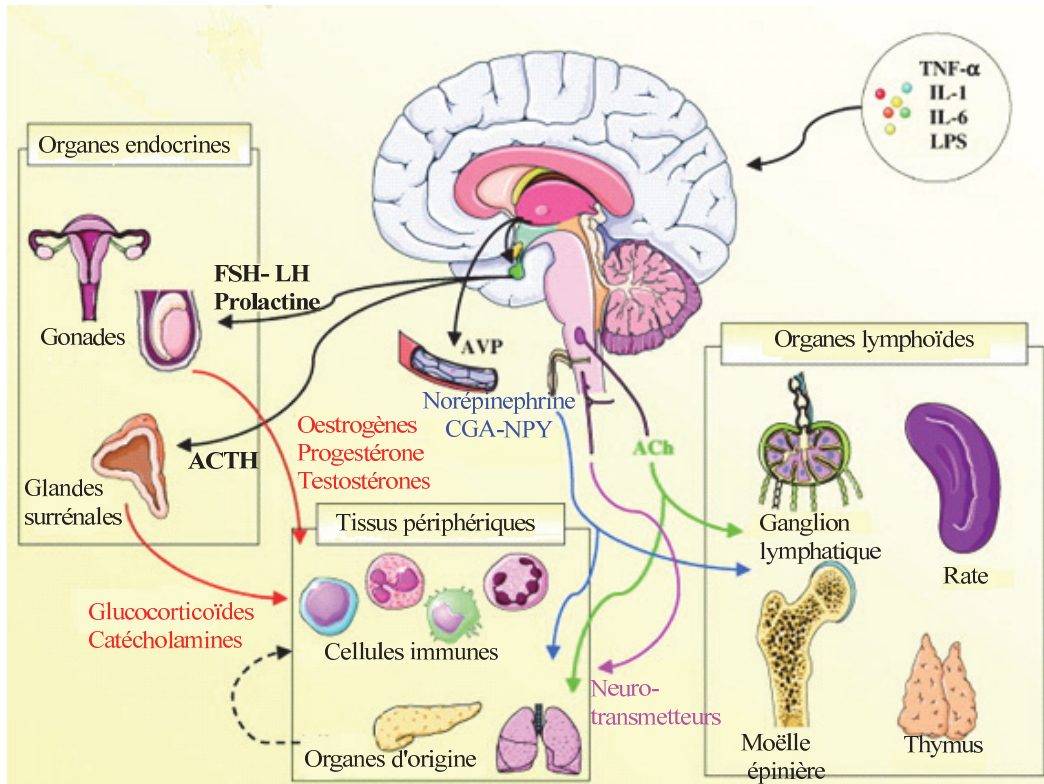


Figure 6 : Relations entre le système nerveux central et le système immunitaire, au travers de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et du système sympathique dans le cadre de la réaction à un stress.

Le système nerveux central contrôle la sécrétion des hormones sexuelles et des glucocorticoïdes (en rouge et noir) *via* l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ces hormones passent dans la circulation sanguine et agissent directement dans les tissus périphériques ou dans les organes lymphoïdes et influencent l'activité des cellules immunitaires. La sécrétion de catécholamines par la médullosurrénale est sous le contrôle des fibres cholinergiques et contribue à la suppression systémique de la fonction immunitaire. Le système nerveux périphérique contrôle également la libération de la CGA (chromogranine A) et du NPY (neuropeptide Y). Les cellules immunitaires induisent la sécrétion d'interleukines (IL) qui agissent sur le système nerveux. ACh, acétylcholine ; FSH, hormone folliculostimulante ; LH, hormone lutéinisante ; ACTH adrénocorticotropine hormone ; AVP, arginine vasopressine (Di Comite et al., 2007).

Chapitre II : Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des molécules de l'immunité innée retrouvées dans tous les règnes vivants (bactéries, archées, protistes, mycètes, végétaux, animaux). Ce chapitre présente les PAMs en général, leurs caractéristiques structurales, biologiques et leurs modes d'action ainsi que les nouveaux concepts qui leur sont associés.

I- Introduction

Les PAMs sont des composants fondamentaux de la défense immunitaire innée (Zasloff, 1992). Ils existent depuis aussi longtemps que les organismes vivants, mais l'intérêt qu'ils suscitent dans le monde scientifique se situe vers les années 1900. En effet, Ridley, dans un article publié en 1928, relate qu'entre 1902 et 1921, Conraldi, Meissner, Laschtschenko, Gengou, Turro ou encore Kuttner ont observé l'existence de substances antibactériennes dans des tissus et des leucocytes (Ridley, 1928). Mais le premier PAM antimicrobien décrit a été le lysozyme en 1922 (Fleming et Allison, 1922). Il faut souligner que de par sa taille, ce serait plutôt le terme de protéine qui conviendrait le mieux pour le désigner. Le lysozyme a été découvert par le biologiste et pharmacologiste écossais Alexander Fleming (1881-1955), connu pour sa découverte majeure, la pénicilline en 1928 avec Ernst Boris Chain (1906-1979) et Howard Walter Florey (1898-1968) et qui leur a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1945.

L'histoire raconte que pendant la première guerre mondiale (1914-1918), Fleming, témoin de la mort de nombreux soldats suite à des septicémies est incité à entreprendre des recherches. En 1921, alors qu'il travaille sur la mise au point de nouveaux vaccins contre la grippe, il contracte un coryza (rhume du cerveau). Les prélèvements de son mucus nasal montrent l'existence d'une bactérie qu'il nomme *AF coccus* et qu'il pense être un bactériophage. Mais c'est en effectuant les mêmes prélèvements sur des collègues et aussi dans les larmes et d'autres sécrétions organiques, qu'il s'aperçoit que l'effet bactériolytique est plutôt dû à une protéine qu'il nomme lysozyme. C'est ainsi qu'est découvert l'un des premiers PAMs ; il ne donne lieu à aucune application thérapeutique dans un premier temps mais depuis les années 1960, il existe des médicaments à base de lysozyme comme la lysopaine (Corone, 1964).

Une autre étape dans l'histoire de la découverte des PAMs est celle de la colicine chez *Escherichia coli*. André Gratia observe l'inhibition d'une souche d'*Escherichia coli* par une substance qu'il nomme principe P (Gratia, 1925). Ce n'est qu'en 1950 qu'elle est identifiée comme la colicine (Gardner, 1950). Plus tard dans les années 1930, le microbiologiste franco-américain, René Dubos découvre la gramicidine D

(Dubos et Cattaneo, 1939). C'est un peptide isolé de *Bacillus brevis*. Elle est composée de 15 acides aminés, agit par ouverture de pores et augmente la perméabilité cationique de la membrane plasmique. Ce sera le premier antibiotique à être commercialisé. Depuis lors, de multiples PAMs ont été isolés et identifiés. Il existe plusieurs bases de données qui rassemblent l'ensemble des PAMs découverts. L'une d'elle, <http://aps.unmc.edu/AP/links.php> regroupe en Avril 2012, 127 antiviraux, 686 antifongiques, 113 antitumoraux et 1576 antibactériens.

II- La répartition des peptides antimicrobiens

Les PAMs correspondent à une réponse non-spécifique, constitutive ou induite par un stimulus immun. Ils ont été retrouvés dans tous les organismes vivants : champignons, bactéries, plantes, amphibiens, oiseaux, mammifères, crustacés (Maroti et al., 2011 ; Rajanbabu et Chen, 2011 ; Song et al., 2011). L'expression des PAMs est locale, sauf chez les insectes qui peuvent les produire dans le cadre d'une réponse systémique inductible (Hoffmann et al., 1996). Les PAMs proviennent très souvent d'un précurseur appelé pré-propeptide qui comprend une séquence signal, un pro-segment et le peptide biologiquement actif (Bals, 2000). Ce sont des séquences peptidiques de petite taille (moins de 40 résidus en général), très conservées d'une espèce à l'autre, ce qui prouve leur importance pour la résistance des organismes aux agents infectieux.

La puorhionine est le premier PAM à avoir été découvert chez les plantes (Balls et al., 1942). Les PAMs des plantes appartiennent à sept familles différentes (Garcia-Olmedo et al., 1995 ; Egorov et al., 2005). Ils ont des structures et des spectres d'activités variés (Padovan et al., 2010). Ce sont les défensines, les thionines, les protéines de transfert des lipides, les cyclotides, les snakines, les hévéines et les peptides riches en glycine.

Les invertébrés produisent également de nombreux PAMs. Chez les insectes plus de 150 PAMs ont été découverts. Ils appartiennent à différentes familles dont les plus étudiées sont les défensines et les cécropines (Hoffmann, 1995). Les défensines d'insectes ont fait l'objet d'études approfondies par différentes équipes, dont celle du professeur Hoffmann, prix Nobel de physiologie ou médecine en 2011 (avec l'Américain Bruce Beutler et le Canadien Ralph Steinman) pour ses travaux dans le domaine de l'immunologie. Ces études ont permis d'isoler différents types de défensines chez les insectes, d'en caractériser les structures et les modes d'action.

Depuis la colicine découverte en 1925 chez *E.coli*, d'autres peptides antimicrobiens, les bactériocines, ont été découverts chez les bactéries. Celles-ci produisent également des substances antimicrobiennes non protéiques, les antibiotiques.

Les familles de PAMs les plus répandues et les plus étudiées chez les mammifères sont les défensines et les cathélicidines. Les défensines sont présentes chez les vertébrés, les invertébrés, les plantes et les microorganismes. Elles sont constituées d'un feuillet β et d'une hélice α . Les défensines interagissent avec la membrane microbienne et possèdent un spectre d'activités variées. Les cathélicidines ont été découvertes dans les années 1990, mais ce n'est qu'en 1995 que le terme de cathélicidine a été employé pour désigner ces peptides (Zanetti et al., 1995). Ils sont exprimés dans de nombreux types cellulaires comme les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales, les kératinocytes et les mastocytes.

III- La classification des peptides antimicrobiens

Les PAMs sont des peptides endogènes synthétisés par l'organisme et définis par le code génétique. En 1999, Hancock et Chapple décrivent deux modes de synthèse pour les PAMs : la synthèse par voie ribosomale et la synthèse par voie non ribosomale (Hancock et Chapple, 1999).

Les PAMs synthétisés par voie ribosomale sont dits naturels. Ils sont synthétisés par toutes les espèces vivantes, stockés dans les granules de sécrétion des cellules et libérés sur le lieu d'infection lors d'une attaque de l'organisme (stress induit par des agents pathogènes par exemple) (Devine, 2003 ; Levy, 2004). Ces protéines obtenues par synthèse ribosomale peuvent être de grandes tailles et servir de précurseurs pour la synthèse de peptides biologiquement actifs. C'est le cas notamment des PAMs dérivés des chromogranines que nous étudions.

Les peptides obtenus par synthèse non ribosomale se retrouvent essentiellement chez les bactéries, les champignons les streptomycètes. Ce sont par exemple les gramicidines, les polymyxines, les bacitracines, les glycopeptides (Hancock et Chapple, 1999). Ils sont issus de complexes multi-enzymatiques et sont les précurseurs de plusieurs classes d'antibiotiques (Finking et Marahiel, 2004).

Les PAMs subissent naturellement des modifications post-traductionnelles telles que l'amidation C-terminale, la phosphorylation, la glycosylation (Strub et al., 1997 ; Goumon et al., 1998 ; Bulet et al., 1999) qui protègent les peptides de la dégradation enzymatique par les protéases microbiennes.

Les PAMs peuvent être classés en fonction de leur composition en acides aminés et de leur structure. Le tableau V regroupe quelques exemples de PAMs de chaque catégorie.

Tableau V : Classification des peptides antimicrobiens en fonction de leurs structures
(Brogden, 2005).

Peptides cationiques linéaires à hélice α

- Cécropine A, andropine, moricine, cératoxine, mellitine (insectes)
- Cécropine P1 (nématodes)
- Magainine, dermaseptine, bombinine, brévinine-1, esculentine, buforine II (amphibiens)
- Pleurocidine (sécrétions des muqueuses de la peau de plie rouge)
- Séminalplasmine, BMAP, SMAP (SMAP 29, ovispirine), PMAP (bovin, ovin et porcine)
- CAP 18 (lapin)
- LL-37 (humain)

Peptides cationiques riches en certains acides aminés

- Peptides riches en proline : abaécine (abeilles)
- Peptides riches en proline et en arginine : apidaécine (abeilles), drosocine (drosophile), pyrrocoricine, (punaise, *Pyrrhocoris apterus*), bacténicines (bovin, ovin et chèvre), PR-39 (porcin)
- Peptides riches en proline et en phénylalanine : prophénine (porcin)
- Peptides riches en glycine : hyménotaécine (abeilles)
- Peptides riches en proline et en glycine : coléoptéricine et holotricine (coléoptères)
- Peptides riches en tryptophane : indolicidine (bovin)
- Petits polypeptides salivaires riches en histidine : histatine (humain et certains grands primates)

Peptides contenant des cystéines et des ponts disulfures

- Peptides contenant 1 pont disulfure : brévinine
- Peptides contenant 2 ponts disulfures : protégrine (porc), tacchylésine (limule)
- Peptides contenant 3 ponts disulfures : défensine α (humain : HNP-1, HNP-2, cryptidine ; lapin : NP-1 ; rat), défensines β (Humain (HBD1, DEFB118), bovin, souris, rat, porcine, chèvre, volaille), défensine Θ (macaque rhésus (RTD-1))
- Défensines des insectes : défensine A
- SPAG11/isoform HE2C (défensine β atypique)
- Peptides qui contiennent plus de 3 ponts disulfures : drosomycine (drosophiles), défensines antifongiques des plantes

Peptides dérivés de protéines plus grandes

- Lactoferricine, dérivée de la lactoferrine
- Casocidine, dérivée d'une caséine humaine
- Domaines antimicrobiens de la lactalbumine bovine, hémoglobine humaine, lysozyme, lactotransferrine et ovalbumine

Peptides anioniques

- **Maximime H5 (amphibiens)**
- Petits peptides anioniques riches en acide glutamique et en acide aspartique (ovin, bovin et humain)
- Dermicidine (humain)

III-1- Les peptides antimicrobiens cationiques

Les PAMs cationiques linéaires regroupent la majorité des peptides sans pont disulfure recensés. Ce sont des peptides linéaires qui peuvent être structurés en forme de pelote déroulée. Dans ce groupe, on peut distinguer les peptides cationiques linéaires à hélice- α et les peptides cationiques riches en certains acides aminés. Les peptides cationiques à hélice α ne contenant pas des cystéines possèdent 40 à 60% de résidus hydrophobes (Tossi et al., 2000), forment une hélice α amphiphile et possèdent un coude au centre de la molécule (Yount et al., 2006). L'arginine, la lysine ou l'histidine leur confèrent leur charge positive qui varie de +2 à +9. Cette charge leur permet d'interagir avec le lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif, l'acide teichoïque des bactéries Gram positif et les phosphomannanes des champignons (Salzman et al., 2004). Ces PAMs sont de petite taille en général moins de 40 résidus. C'est le cas de la cathélicidine humaine LL-37 (+6) (Uniprot : P49913) ou de la catestatine (+5) (Uniprot : P05059).

Les peptides cationiques comprennent également un grand nombre de peptides riches en certains acides aminés comme la proline (abaécine) ou d'autres acides aminés tels que l'arginine, la phénylalanine, la glycine (Scocchi et al., 2011). Ils peuvent également être riches en tryptophane (indolicidine) (Yu et al., 2010), en glycine (hyménotaécine) (Bulet et al., 1999 ; Baumann et al., 2010) ou encore en histidine (histatines) (Brogden, 2005 ; Kichler et al., 2006).

III-2- Les peptides antimicrobiens contenant des cystéines et des ponts disulfures

Les PAMs riches en résidus cystéine sont des peptides cycliques possédant plusieurs feuilletts β antiparallèles stabilisés par les ponts disulfures s'établissant entre les résidus de cystéine. Ces peptides cationiques peuvent contenir entre 2 et 8 cystéines qui s'apparient pour former des structures de type "épingle à cheveux". Les principaux représentants de cette classe de peptides sont les défensines (Dimarcq et al., 1990 ; Lehrer et Ganz, 1996 ; Dimarcq et al., 1998).

III-3- Les PAMs dérivés de grandes protéines

Les PAMs générés à partir de grandes protéines sont obtenus par protéolyse. C'est le cas de tous les peptides dérivés des granines (Strub et al., 1996 ; Lugardon et al., 2001 ; Briolat et al., 2005) ou encore des peptides dérivés de la lactoferrine (Metz-Boutigue, 1981 ; Tani, 1990), des protéines du complément (Cochrane et Muller-Eberhard, 1968 ; Hugli, 1975), de la pro-enképhaline (Goumon et al., 1998) et de l'ubiquitine (Kieffer et al., 2003).

III-4- Les PAMs anioniques

Ce sont des peptides souvent riches en acide aspartique et en acide glutamique. C'est le cas du peptide AP (GADDDDD), riche en acide aspartique avec une charge négative de -5, qui possède des activités antimicrobiennes sur *Micrococcus lysodeikticus* et *Pasteurella haemolytica*, (Kalfa et Brogden, 1999). Un autre peptide, la scygonadine, isolée la première fois, dans le liquide séminal de *Scylla serrata*, un crustacé possède des activités antibactériennes sur *Micrococcus luteus* et *Aeromonas hydrophila* (Wang et al., 2007). L'enkélytine (PEAP₂₀₉₋₂₃₇ diphosphorylé), dérivé de la pro-enképhaline présente une activité antimicrobienne de l'ordre du micromolaire sur *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium* (Goumon et al., 1998). Le mode d'action de ces peptides n'est pas aussi bien connu que celui des PAMs cationiques, mais des études suggèrent qu'ils agissent par l'intermédiaire d'une structure d'orientation oblique de leur forme hélicoïdale (Dennison et al., 2006) ou d'une distribution asymétrique de l'hydrophobicité le long de l'axe de l'hélice α permettant la pénétration du peptide dans la membrane des pathogènes par un angle faible et qu'ils ont besoin d'un cofacteur comme le zinc pour agir (Lins et Brasseur, 2008 ; Harris et al., 2009).

IV- La structure des PAMs

La nature des acides aminés constituant la chaîne peptidique est importante pour déterminer le caractère anionique ou cationique du peptide ainsi que pour son activité. Des études ont montré que le changement d'un acide aminé dans une chaîne peut modifier l'activité du peptide. La structure secondaire induit une répartition favorable des charges ce qui permet de comprendre le mode d'action d'un peptide. Quatre types de structure secondaire sont essentiellement décrits pour les PAMs : l'hélice α , le feuillet β , le coude et la pelote déroulée (Jenssen et al., 2006). La structure en coude se rencontre dans les peptides cycliques, souvent retrouvés dans les microorganismes. Ils ont donné plusieurs antibiotiques utilisés en thérapie. D'autres structures peuvent être adoptées à partir de ces configurations (structure en épingle à cheveux, hélice α -feuillet β , hélice-coude-hélice...). Ces structures secondaires permettent aux peptides d'interagir avec les membranes des pathogènes. Elles sont représentées sur la figure 7.

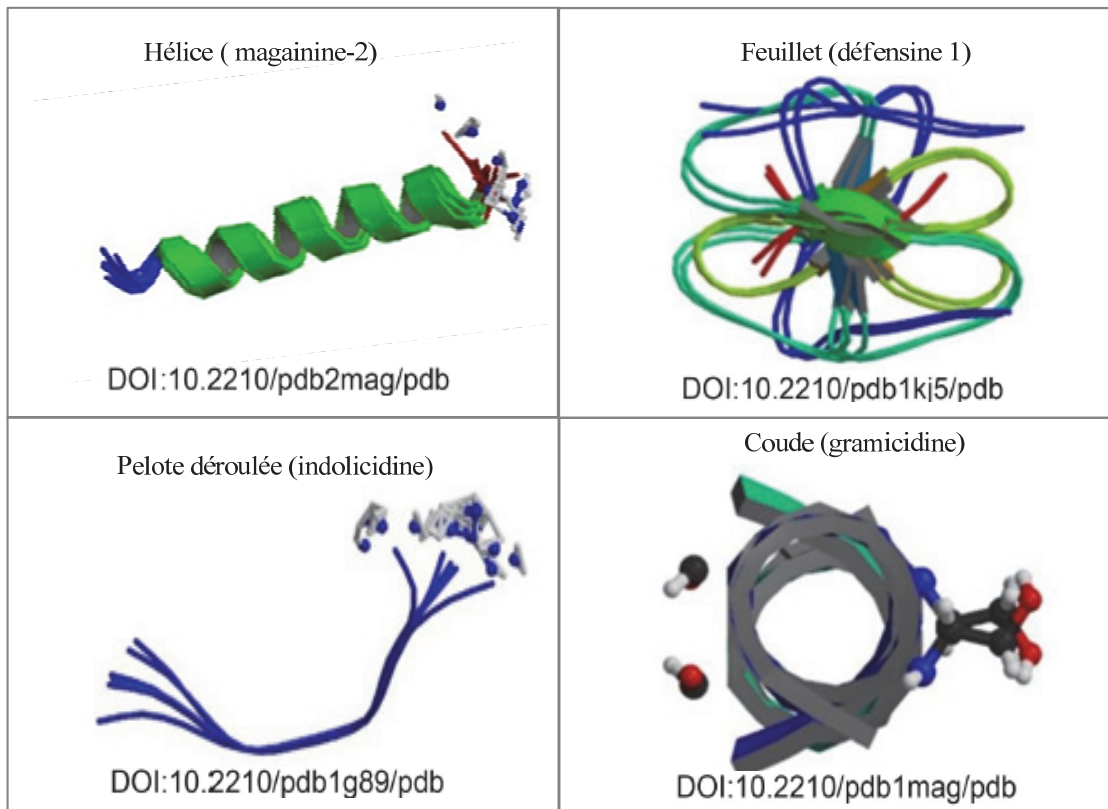


Figure 7 : Structures secondaires de quelques PAMs représentant les quatre types de repliement de base (Peters et al., 2010).

A : structure en hélice α de la magainine-2 ; B : structure en feuillet β de la défensine 1 ; C : structure en pelote déroulée de l'indolicidine ; D : structure en coude de la gramicidine (Peters et al., 2010). Ces structures sont représentées dans la base de données RCSB Protein Data Bank (PDB) et peuvent être retrouvées avec les numéros d'identification correspondant (DOI). Des informations complémentaires y sont également disponibles.

V- Les activités biologiques des peptides antimicrobiens

De nombreuses études ont porté sur l'implication des PAMs dans la défense des organismes. Les PAMs peuvent agir directement sur les bactéries, les virus, les champignons, les cellules tumorales, afin de les éliminer ou moduler la réponse en recrutant et en activant les cellules immunitaires (Hancock et Sahl, 2006). Ils interviennent également dans diverses pathologies. C'est le cas par exemple LL-37 qui est surexprimée ou inhibée dans différents cas décrits plus loin (Chapitre II, V-4). Leur spectre d'action est si vaste qu'un nouveau terme se développe, celui de HDP, *Host Defense Peptides*, pour remplacer le terme plus restrictif de PAMs car ils sont impliqués dans plusieurs mécanismes de défense de l'hôte (Yu et al., 2007 ; Yeung et al., 2011). La figure 8 résume la quasi-totalité des activités de défense portées par les PAMs (Yeung et al., 2011).

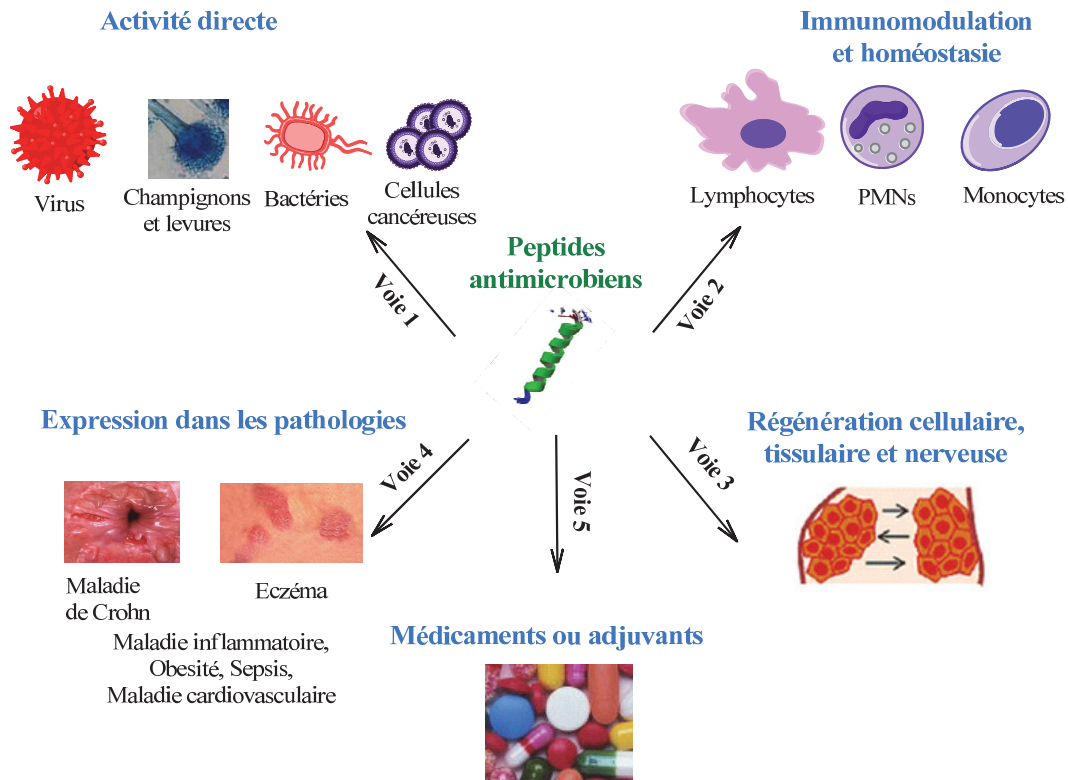


Figure 8 : Activités des peptides antimicrobiens (adapté de Yeung, 2011).

V-1- L'activité directe des peptides antimicrobiens

Les PAMs peuvent agir directement pour détruire leurs cibles (Figure 8, Voie 1). Cette action directe met en jeu la déstabilisation de la membrane des pathogènes et est observée dans les activités antibactériennes et antifongiques. Les PAMs sont également efficaces sur les virus à ADN, ARN et les adénovirus par diverses voies comme par exemple l'interaction avec l'héparane sulfate, importante pour l'adhésion des virus, inhibant ainsi l'entrée virale. C'est le cas de la lactoferricine (Jenssen et al., 2006) ou de la défensine α NP-1 du lapin qui inhibe la propagation des virus aux cellules avoisinantes (Sinha et al., 2003). Les PAMs agissent aussi par translocation à travers la membrane cytoplasmique des bactéries pour inhiber de multiples cibles telles que l'ADN, l'ARN, la synthèse des protéines ou de la paroi cellulaire, la division cellulaire, la traduction (Boman et al., 1993 ; Zasloff, 2002). A titre d'exemple, la catestatine et la chromofungine, peptides dérivés de la chromogranine A, inhibent la calcineurine qui est indispensable à la croissance des champignons (Lugardon et al., 2001). Les PAMs agissent aussi sur les parasites par l'inhibition d'une des voies de synthèse d'une protéine indispensable au pathogène comme la catestatine qui est un inhibiteur de la plasmepsine nécessaire à la croissance de *Plasmodium falciparum* dans l'hôte (Akaddar et al., 2010).

❖ Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est la mieux étudiée pour les PAMs. Les PAMs possèdent souvent un large spectre d'activité et les mécanismes d'action sont décrits et illustrés plus loin (Chapitre II, VI). Cette activité résulte principalement de l'interaction des peptides avec la membrane des pathogènes. Il faut souligner que l'activité des PAMs peut être modifiée en présence de NaCl, de carbonate ou de chlorure (Diamond et al., 2009).

❖ Activité anti-cancéreuse

Certains PAMs interviennent sur les cellules tumorales de deux manières : soit en agissant sur les cellules cancéreuses, soit en agissant sur les cellules normales et les cellules cancéreuses. La toxicité sélective des PAMs pour les cellules cancéreuses peut s'expliquer par le fait que les cellules cancéreuses sont chargées négativement à cause de la présence de molécules anioniques comme la phosphatidylsérine (Utsugi et al., 1991 ; Dobrzynska et al., 2004) ou de mucines O-glycosylées riches en saccharides chargés négativement (Burdick et al., 1997 ; Yoon et al., 1997). Les cellules cancéreuses ont une surface plus grande que les cellules normales ce qui leur permet d'interagir avec une quantité plus importante de peptides que les cellules normales (Chan et al., 1998). Des revues décrivent plus en détail l'activité des PAMs anticancéreux (Hoskin et Ramamoorthy, 2008 ; Schweizer, 2009).

❖ Autres activités

Les peptides à activité antifongique agissent le plus souvent en perméabilisant la membrane des champignons (Jenssen et al., 2006). Les peptides antiviraux agissent par inhibition de l'entrée virale, interaction avec l'héparane sulfate, interaction avec les récepteurs cellulaires ou les glycoprotéines virales, par interaction avec l'enveloppe virale ou encore blocage de la propagation des virus dans les cellules avoisinantes (Sinha et al., 2003 ; Bowdish et Hancock, 2005 ; Jenssen et al., 2006).

V-2- Les peptides antimicrobiens dans l'immunomodulation

La Figure 8, Voie 2 met en exergue l'implication des PAMs dans l'immunomodulation. En effet, les PAMs sont étroitement impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Ils favorisent le recrutement de cellules effectrices comme les neutrophiles, les cellules dendritiques immatures, les mastocytes et les cellules T vers le site de l'infection. Les PAMs sont capables d'améliorer de manière sélective la réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en induisant le chimiotactisme des leucocytes, l'induction de chimiokines et de cytokines comme la LL-37 humaine, la libération des hormones par dégranulation des phagocytes dans les sites d'infection. Par exemple, LL-37 attire les neutrophiles, les monocytes, les

lymphocytes T, les mastocytes en utilisant les récepteurs couplés aux protéines G (De et al., 2000) ou encore la catestatine, une molécule chimiotactique, provoque le recrutement des PMNs au site d'inflammation (Shooshtarizadeh et al., 2010). Les PAMs participent aussi à l'homéostasie de l'organisme en régulant les réponses inflammatoires excessives. A titre d'exemple les propriétés anti-endotoxines de la LL-37 et de l'indolicidine peuvent être citées (Bowdish et Hancock, 2005 ; Mookherjee et al., 2006). En effet, lors de la défense de l'organisme, la lyse des cellules bactériennes libère des endotoxines. Celles-ci engendrent des réponses inflammatoires excessives. Ces peptides interviennent pour réduire ces réactions inflammatoires et inhibent également l'expression des gènes inflammatoires induite par l'endotoxine et la sécrétion des médiateurs inflammatoires (TNF- α).

V-3- Les peptides antimicrobiens dans la régénération nerveuse et tissulaire

Les PAMs sont également impliqués dans l'angiogenèse et la cicatrisation des plaies (Figure 8, Voie 3). C'est le cas de la LL-37 qui active les cellules épidermiques et les fibroblastes pour former un tissu de granulation et qui a un effet chimiotactique sur les macrophages et les fibroblastes dans la cicatrisation (Sorensen et al., 2003 ; Steinstraesser et al., 2008). La LL-37 stimule l'expression de facteurs de croissance et des cytokines telles qu'IL-18 dans les cellules épithéliales et les kératinocytes, provoquant ainsi la guérison des plaies et joue un rôle important dans l'angiogenèse et l'arthériogenèse (Koczulla et al., 2003). Diverses études ont également montré son rôle protecteur dans les infections invasives bactériennes cutanées causées par *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les streptocoques du groupe A (Braff et al., 2005 ; Dorschner et al., 2001). Les PAMs sont également impliqués dans la régénération nerveuse (Schikorski et al., 2008).

V-4- L'expression des peptides antimicrobiens dans les pathologies

L'expression des certains PAMs peut être modifiée dans certaines maladies inflammatoires humaines telles que la maladie de Crohn, le psoriasis, les maladies cardiovasculaires (Figure 8, Voie 4). Le tableau VI montre quelques exemples de peptides dont l'expression est modifiée dans certaines pathologies. D'autres données portant sur l'expression des PAMs dans les maladies inflammatoires sont regroupés dans différentes revues parues en 2007 (Zaiou, 2007 ; Steinstraesser et al., 2011).

Les peptides antimicrobiens peuvent également servir de marqueur pour le diagnostic des pathologies à l'exemple de la LL-37 qui est surexprimée chez les patients atteints de tuberculose (Yamshchikov et al., 2010).

Tableau VI : Exemples de quelques peptides antimicrobiens et de leurs implications dans différentes maladies.

Expression du peptide	Maladies	Effets	Références
Défaut d'expression de la LL-37 et de HNP 1-3	Syndrome de Kostmann	Infections orales fréquentes et parodontite	(Putsep et al., 2002)
Défaut d'expression de la LL-37 et de la β défensines hBD-2	Eczéma	Lésions cutanées	(Gambichler et al., 2006)
Surexpression de la LL-37 et hBD-2	Psoriasis	Lésions cutanées ; infection à <i>S.aureus</i>	(Ong et al., 2002)
Diminution de l'expression des HD-5 et HD-6 (mutation du gène CARD15/Nod2)	Maladie de Crohn	Inflammation chronique et infections	(Wehkamp et al., 2005)
Surexpression de HD-5	Protocolectomie après pouchite chronique	Infections par <i>Clostridiaceae</i>	(Scarpa et al., 2011)
Surexpression de la LL-37	Syndrome métabolique	Obésité (femme) et maladies cardiovasculaires (homme)	(Benachour et al., 2009)

V-5- Les peptides antimicrobiens dans les médicaments

Les PAMs peuvent être considérés comme des médicaments ou des adjuvants (Figure 8, Voie 5). Une revue parue récemment discute de l'implication des PAMs dans le traitement des sepsis (Brandenburg et al., 2011) et les résultats obtenus ces dernières années démontrent leurs potentiels (Bradshaw, 2003). Plusieurs PAMs sont en phase clinique d'expérimentation et sont prometteurs. De plus, pour pallier à certains de leurs inconvénients, tels que le coût de leur synthèse, leur stabilité, leur biodisponibilité, un nouveau concept a vu le jour, il s'agit des peptides "*drug designed*" qui sont des peptides modifiés pour améliorer leurs potentialités. Ce concept sera expliqué en détail dans la dernière partie de ce chapitre. Les PAMs interviennent aussi en tant que *Cell Penetrating peptides* (CPPs) pour faciliter l'interaction avec les cellules des pathogènes et permettre la pénétration de certaines drogues dans leur cible sans perméabilisation préalable ou en tant que transporteur (Oren et Shai, 1998 ; Zhang et al., 2010 ; Splith et Neundorf, 2011). Ils peuvent aussi être utilisés comme adjuvant à certaines drogues ou vaccins (Lillard et al., 1999 ; Tani et al., 2000). Cette propriété de CPPs a été retrouvée pour la catestatine et la chromofungine (Zhang et al., 2009).

VI- Les mécanismes d'action des peptides antimicrobiens

Les peptides cationiques à hélice α possèdent différents modes d'action en fonction de leurs cibles cellulaires et de leurs activités. Ils peuvent se résumer en deux groupes : les mécanismes d'action membranaire (activité directe) et les mécanismes d'action intracellulaire (pour les autres activités) (Figure 9).

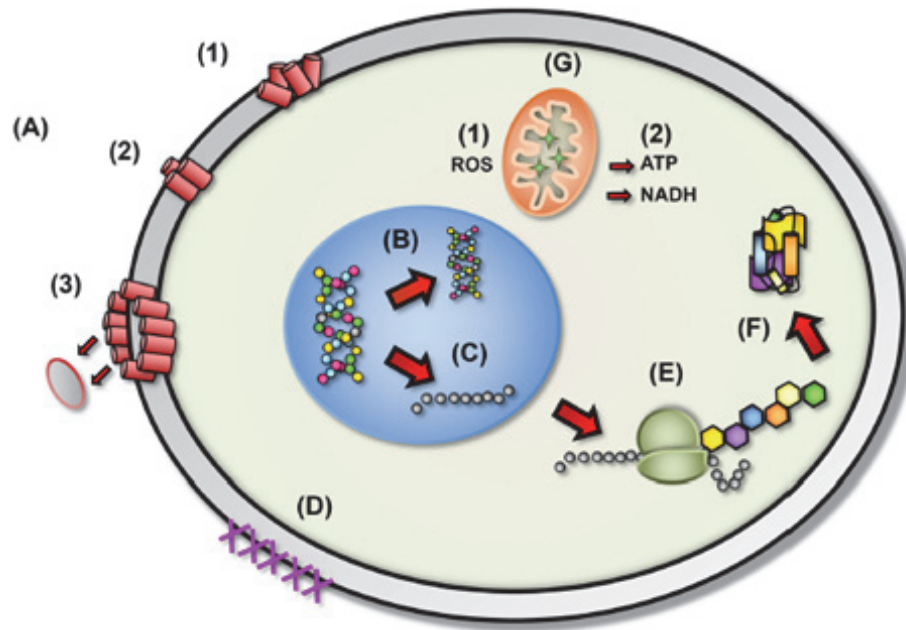


Figure 9 : Illustration du mode d'action des peptides antimicrobiens (Peters et al., 2010).

(A) Phase initiale d'attraction et d'attachement : perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire puis insertion des PAMs dans la cellule par les pores en tapis (1), pores toroïdaux (2) ou pores en douves (3). Ils peuvent alors pénétrer dans le cytoplasme et inhiber la synthèse des ADN (B) ou bloquer les ARN (C) ou des enzymes nécessaire à la synthèse de protéines intervenant dans l'ancrage des cellules étrangères à la paroi de l'hôte (D), inhiber l'activité ribosomale et la synthèse protéique (E) ou des protéines chaperonnes nécessaire pour le pliage des protéines (F). Les PAMs peuvent également bloquer la voie mitochondriale (G) par inhibition de la respiration cellulaire et formation d'espèces réactives de l'oxygène ou rupture des membranes par efflux d'ATP et de NADH (Peters et al., 2010).

La compréhension du mécanisme de perméabilisation de la membrane est cruciale pour le développement de PAMs exploitables en thérapeutique.

VI-1- Les mécanismes d'action membranaire

Les PAMs possèdent la capacité de se replier de manière à former des domaines qui seront basiques et hydrophobes. Leur mécanisme d'action est intimement lié au caractère amphipatique de leur structure secondaire. L'amphipathie est la distribution relative des résidus hydrophobes et hydrophiles dans une protéine.

Diamond et ses collègues différencient trois étapes dans le mécanisme d'action (Diamond et al., 2009) : l'attraction entre le peptide et le pathogène, l'attachement du peptide à la surface du pathogène et la pénétration du peptide à l'intérieur du pathogène.

Au cours de la première étape (l'attraction), les PAMs cationiques (la grande majorité) sont attirés par interaction électrostatique avec les membranes des bactéries ou champignons chargées négativement du fait du lipopolysaccharide ou de l'acide téichoïque ou encore du phosphomannane (Nizet, 2006).

La deuxième étape (l'attachement) met en jeu l'interaction électrostatique qui engendre une déstabilisation de la membrane externe.

La troisième étape est l'insertion. Un facteur important pour la pénétration est le caractère amphipathique du peptide permettant son insertion dans la membrane des pathogènes. Le peptide pénètre dans la cellule et peut interagir avec les cibles cytoplasmiques. Les trois modèles d'insertion habituellement proposés sont représentés à la Figure 10.

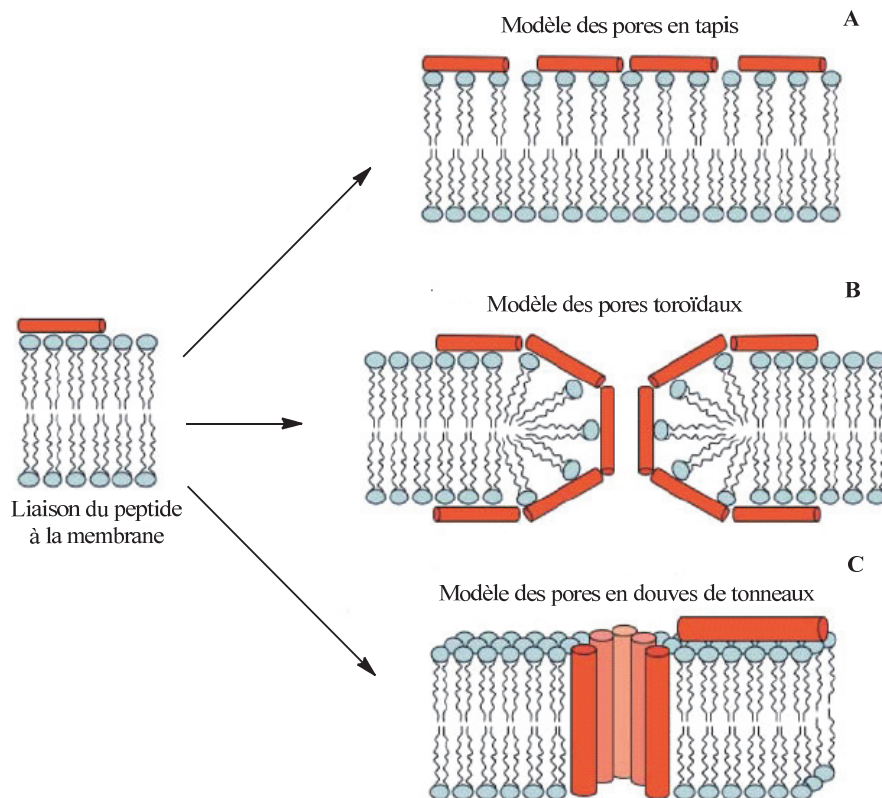


Figure 10 : Modèle d'insertion membranaire des PAMs dans les cellules
(Sanderson, 2005).

- ❖ Modèle de déstabilisation en tapis ou *Carpet-like*

Les peptides s'accumulent sur la membrane et forment un tapis qui va écarter les têtes hydrophiles des phospholipides et provoquer des perturbations entraînant la rupture de la membrane. C'est le modèle observé pour des concentrations élevées de magainine (Mor et al., 1994) ou pour la cécropine (Jenssen et al., 2006) (Figure 10A).

❖ Le modèle des pores toroïdaux ou *Wormhole*

Dans ce modèle, les peptides se déposent parallèlement à la membrane et sont fixés solidement par leurs domaines hydrophobes. Les peptides pénètrent entre les phospholipides et vont s'orienter perpendiculairement à la membrane à partir d'une certaine concentration. Ce modèle est essentiellement connu pour les hélices α . Le peptide, par son caractère amphiphile possède un domaine positif qui pourra interagir avec les têtes polaires des phospholipides à travers la membrane des microorganismes (Hirsh et al., 1996). Le complexe peptide-phospholipide forme alors des pores (Matsuzaki et al., 1996 ; Yeaman et Yount, 2003) qui lorsqu'ils se désintègrent, permettent la translocation des PAMs à l'intérieur du cytoplasme (Figure 10B). Il a été observé pour des peptides comme la magainine (Matsuzaki et al., 1996), la melittine (Lee et al., 2004), la LL-37 (Henzler-Wildman et al., 2004 ; Brogden, 2005), la protégrine-1 (Yamaguchi et al., 2002).

Une variante du modèle des pores toroïdaux est nommée "modèle par agrégat" (Jenssen et al., 2006) ou pores toroïdaux désordonnés (Melo et al., 2009) dans lesquels les peptides n'adoptent pas une conformation perpendiculaire. C'est le modèle adopté par les peptides MG-H2, un analogue de la magainine (Leontiadou et al., 2006).

❖ Le modèle de pores en douve de tonneaux ou *Barrel-stave model*

Dans ce modèle, les peptides forment un amas à l'aspect de tonneaux dans la membrane. Les peptides se fixent sur la membrane et écartent les têtes hydrophiles externes des phospholipides, puis ils pénètrent par leurs pôles hydrophobes en repoussant les phospholipides. Ils s'assemblent avec les chaînes carbonées des phospholipides laissant libres leurs domaines hydrophiles qui formeront la paroi des pores. Ce modèle illustré par la figure 10C, est décrit par exemple pour l'alaméthicine, un peptide isolé du champignon, *Trichoderma viride* (Bechinger, 1999).

Cependant, ces modèles de mécanisme d'action ne sont pas être exclusifs. Nguyen et ses collaborateurs en dégagent quelques autres, illustrés sur la figure 11. Ce sont l'insertion par formation d'un cluster lipidique, l'électroporation, le transport d'anion... (Nguyen et al., 2011 ; Wimley et Hristova, 2011).

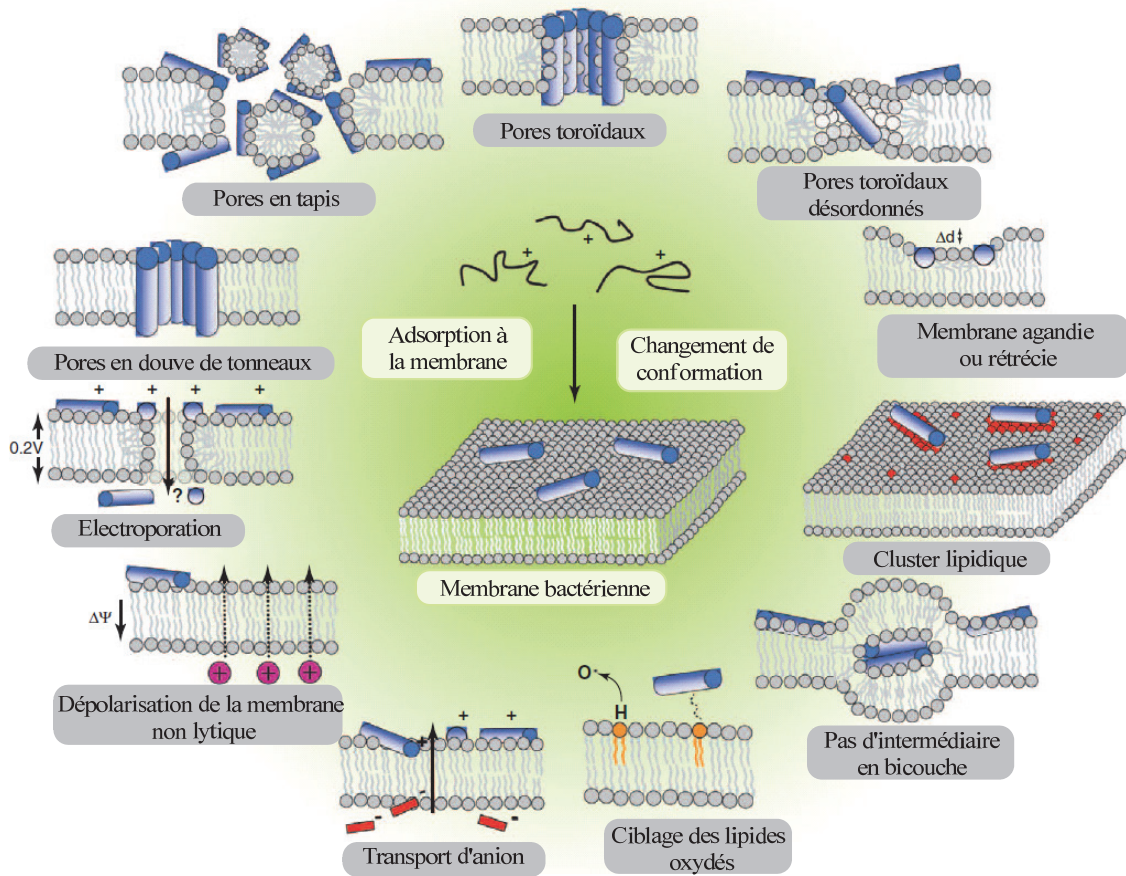


Figure 11 : Autres modèles d'insertion membranaire (Nguyen et al 2011).

VI-2- Les mécanismes d'action intracellulaire

En plus des peptides transloqués par désintégration des membranes, les PAMs peuvent être des CPPs qui pénètrent dans les cellules de l'hôte et vont retrouver dans le cytoplasme. Les CPPs sont des peptides de petites tailles qui facilitent l'absorption des molécules et leur acheminement vers leur site d'action (Poillot et De Waard, 2011). A l'intérieur du cytoplasme, plusieurs cibles peuvent être visées : les voies de synthèse métabolique des pathogènes, la synthèse des acides nucléiques, la synthèse des protéines, l'activité enzymatique et la synthèse de la paroi (Brogden et al., 2003 ; Brogden, 2005 ; Jenssen et al., 2006). Tous ces mécanismes sont résumés sur la figure 12.

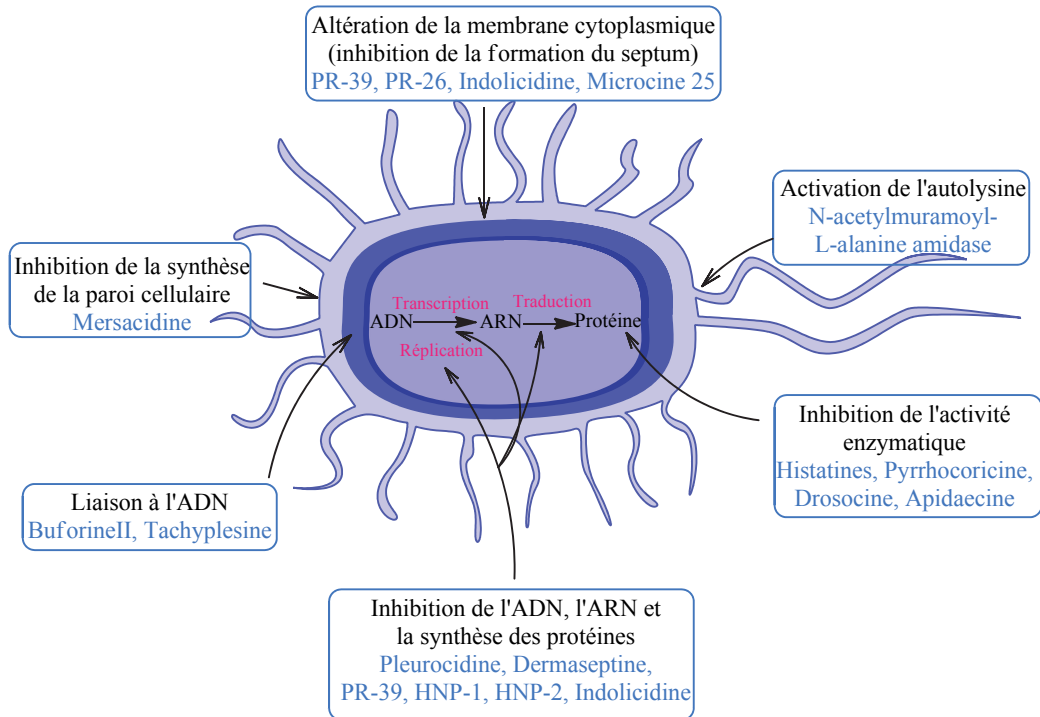


Figure 12 : Mécanisme d'action intracellulaire des PAMs (Brodgen, 2005).

VII- La résistance des microorganismes aux peptides antimicrobiens

Les microorganismes développent également des résistances contre les PAMs. Même si ces résistances sont moindres et moins connues que celles aux antibiotiques, il est important de ne pas les ignorer afin de prévenir l'apparition de nouvelles souches microbiennes résistantes.

Ces résistances sont induites en premier lieu, parce que les microorganismes d'une niche écologique donnée, sont capables de résister à des concentrations élevées de peptides endogènes (Kraus et Peschel, 2006). D'autres causes engendrent ces résistances. Quatre types de mécanismes se dégagent essentiellement (Figure 13) : la dégradation protéolytique, les mécanismes de piégeage, le transport actif utilisant les pompes à efflux, les modifications des propriétés membranaires (charge du peptide ou de la membrane et modifications des récepteurs-cibles) (Peschel et Sahl, 2006).

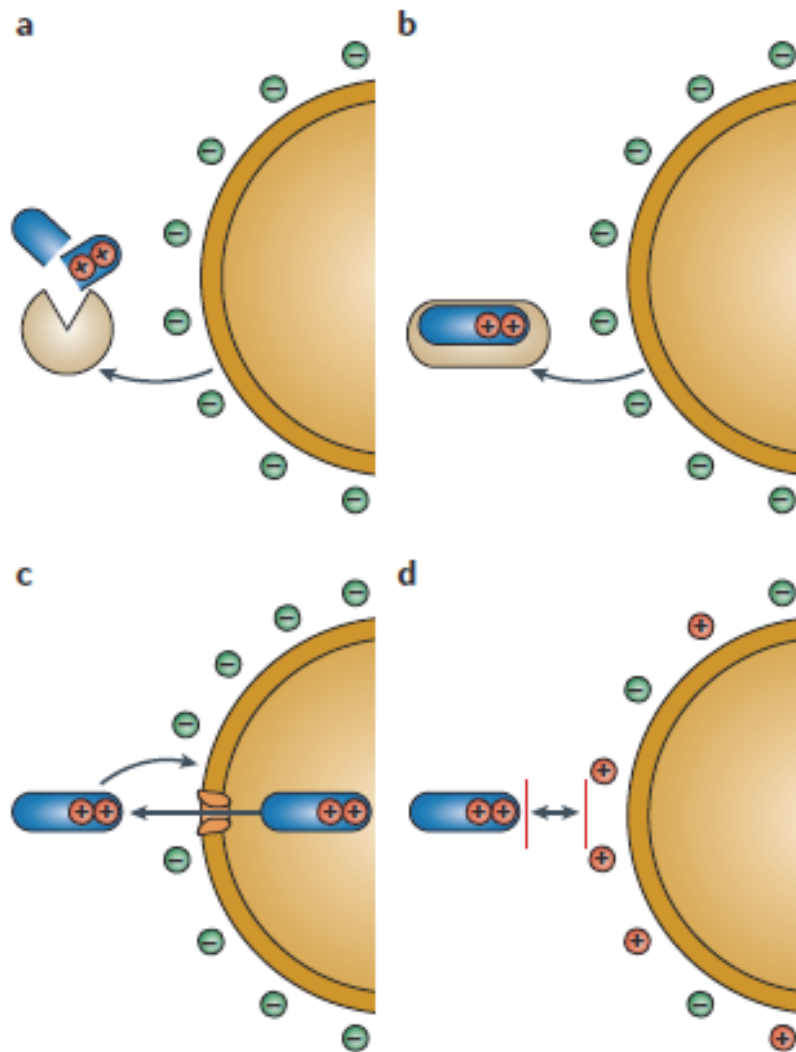


Figure 13 : Mécanisme de résistance des bactéries aux PAMs (Peschel et Sahl, 2006).

a) La dégradation protéolytique ; b) Les mécanismes de piégeage du peptide ; c) Le transport actif utilisant les pompes à efflux ; d) altérations de la charge du peptide ou de la membrane des microorganismes (Peschel et Sahl, 2006).

VII-1- La dégradation protéolytique

Les bactéries produisent des protéases qui vont dégrader les PAMs actifs en peptides inactifs. Ces mécanismes ont fait l'objet de plusieurs études portant par exemple sur l'effet de l'auréolysine et de la protéase Glu-C de *Staphylococcus aureus* sur la LL-37 (Sieprawska-Lupa et al., 2004).

VII-2- Les mécanismes de piégeage

Certains pathogènes sont capables de reconnaître les PAMs et d'inhiber leur action en limitant leur accès à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de molécules de piégeage. Cette limitation peut-être directe par action de protéines de surface ou de protéines sécrétées comme la staphylokinase de *S.aureus* (Jin et al., 2004) ou indirecte et par sécrétion de molécules qui vont lier les PAMs à l'exemple de la dermatane sulfate qui lie les α défensines humaines et les inactiver (Schmidtchen et al., 2001).

VII-3- Le transport actif des PAMs utilisant des pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des protéines membranaires retrouvées dans la membrane de certaines bactéries. Ces pompes participent au transport actif vers l'extérieur de la cellule et sont alimentées en énergie par l'ATP (Cattoir, 2004). Elles sont capables d'expulser le peptide de la cellule. *Neisseria gonorrhoeae* possède un tel système nommé MtrCDE qui expulse la cathélicidine LL-37 et la protégrine-1 (Shafer et al., 1998).

VII-4- Les modifications des propriétés membranaires

Les variations de séquence d'acides aminés lorsqu'elles touchent des acides aminés importants par leur caractère cationique ou amphipathique altèrent l'activité du peptide (Peschel, 2002 ; Peschel et Collins, 2001). De nombreuses bactéries peuvent par ailleurs réduire leur charge négative et acquérir ainsi une protection contre les activités lytiques des PAMs (Neuhaus et Baddiley, 2003).

VIII- Les nouvelles approches thérapeutiques basées sur les peptides antimicrobiens

Des méthodes simples comme l'insertion de résidus proline, l'amidation de l'extrémité C- terminale, l'utilisation de D-acides aminés, de tryptophane ou encore l'augmentation de la rigidité du peptide grâce à des ponts disulfures permettent de contrer les mécanismes de résistance des microorganismes aux PAMs. En plus de celles-ci, de nouvelles approches thérapeutiques basées sur le *drug design* des PAMs sont en plein essor. Le *drug design* est une méthode de conception de médicaments basée sur l'augmentation de la liaison des PAMs à leurs cibles cellulaires. Pour ce faire, on agit sur la relation structure-fonction en modifiant la structure primaire ou secondaire des peptides. Ces peptides *designed* peuvent être classés en différents groupes (Giuliani et Rinaldi, 2011).

VIII-1- Les peptides antimicrobiens combinés

Afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques, plusieurs études tendent à utiliser les peptides antibiotiques, non pas comme des agents thérapeutiques mais plutôt comme des adjuvants permettant de réduire les doses efficaces d'antibiotiques. L'objectif de cette approche est de potentialiser l'effet des antibiotiques et de permettre leur entrée rapide dans les cellules et sur les sites d'action. Ainsi, les PAMs sont combinés à des antibiotiques. Des études ont montré l'efficacité de combinaison cryptidine-ampicilline sur des salmonelles (Rishi et al., 2011) ou colistine-minocycline sur *Acinetobacter baumannii* (Liang et al., 2011). Les PAMs sont aussi associés avec des huiles essentielles extraites de plantes. C'est le cas de la nisine combinée avec l'huile essentielle de *Mentha longifolia* qui permet de tuer les formes végétatives de *Bacillus spp* (Pajohi et al., 2011).

VIII-2- Les peptides multimériques ou peptides branchés

Les peptides multimériques sont des peptides obtenus par synthèse chimique en couplant différents peptides ou un même peptide sur un multimère. Ces peptides multimériques ont une activité plus importante que le peptide seul ou combiné. C'est le cas de l'ubigranine, un peptide obtenu par couplage entre l'ubifungine et la chromofungine. Ce peptide branché est trois fois plus efficace que chacun des peptides pris séparément et deux fois plus que celui de l'association des deux peptides sur *Neurospora crassa* (Shooshtarizadeh et al., 2010). Un exemple de peptide multimérique obtenu à partir d'un même peptide est celui de SB 041 provenant du couplage de 4 peptides pyrEKKIRVRLSA sur une lysine (Bruschi et al., 2010).

VIII-3- Les peptides mimant des épitopes

Cette approche est basée sur la conception de molécules synthétiques qui miment les épitopes fonctionnellement importants des peptides biologiquement actifs (Robinson, 2008 ; Robinson, 2009). L'épitope est transféré *via* un échafaudage qui permet de construire une structure combinatoire parallèle. Une structure souvent utilisée est la boucle. Elle fait appel à l'utilisation d'une structure possédant cette boucle. La plus utilisée est la structure β -hairpin qui possède deux brins beta. Cette technologie a été utilisée notamment dans la synthèse de l'Iseganane qui est une protéine dérivant de la protéine I. La construction d'un peptide mimant l'épitope est illustrée (Figure 14).

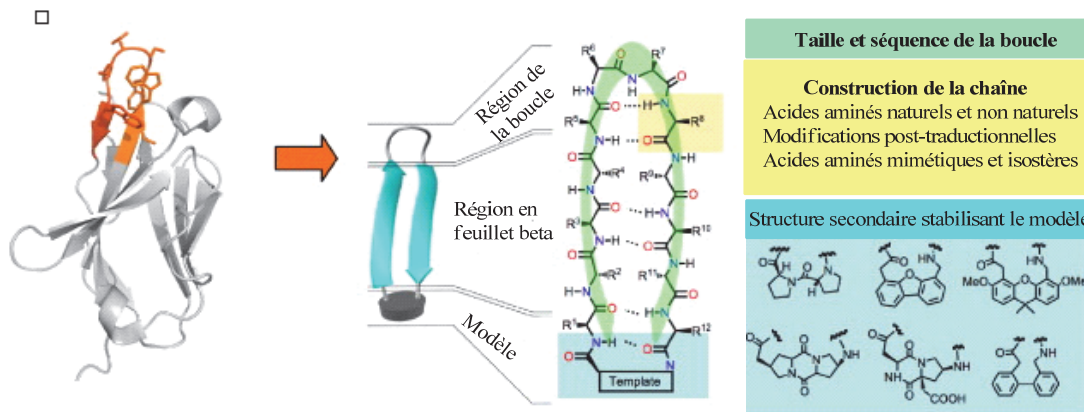


Figure 14 : Construction d'un peptide mimant des épitopes à partir d'une boucle β -hairpin (Robinson et al., 2008).

VIII-4-Les oligoacyllysines

Les oligoacyllysines (OAKs) sont une classe de copolymères antimicrobiens composés de répétitions en tandem d'acyllysines (Figure 15), conçus pour imiter la structure primaire et la fonction des PAMs naturels. Le principe de ce mécanisme est le contrôle de l'hydrophobicité et des charges positives en changeant la longueur de la chaîne acyl-lysine. Les OAKs sont censés limiter la formation de structures secondaires (Radzishovsky et al., 2007). Ils ont montré des activités antibactériennes et antiplasmodiales (Radzishovsky et al., 2007 ; Sarig et al., 2008).

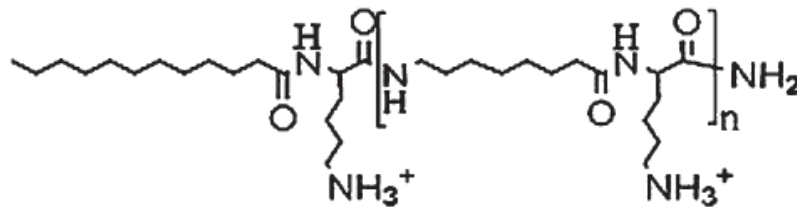


Figure 15 : Structure générale d'un oligoacyllysine (OAK).
La valeur de n varie souvent de 4 à 12 (Epanand et Epanand, 2010).

VIII -5- Les céragénines

Les céragénines sont des PAMs synthétiques obtenus par synthèse des stéroïdes avec des groupements aminés. Etant chargés positivement, ils interagissent avec les LPS des membranes bactériennes. Les céragénines CSA-8 ou CSA-13 (Figure 16) ont une activité antimicrobienne sur des souches résistantes, telles que les staphylocoques résistants à la vancomycine (Chin et al., 2007) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Chin et al., 2008).

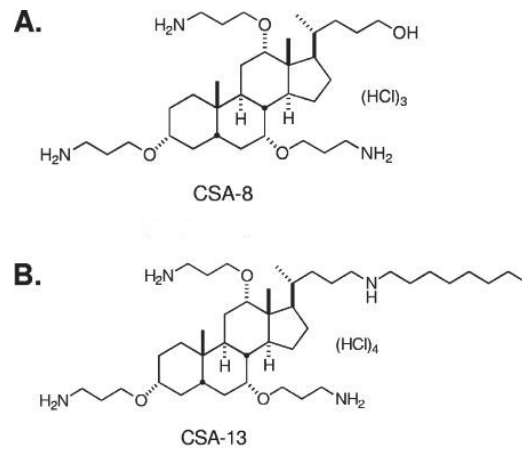


Figure 16 : Exemple de ceragénines : CSA-8 et CSA-13 (Epanand et al., 2007).

VIII -6- Les peptides synthétiques mimétiques des peptides antimicrobiens

Afin de pallier au coût relativement élevé des PAMs, le concept des peptides antimicrobiens mimétiques (PAMMs) a vu le jour. Il consiste à introduire dans des oligomères peu coûteux, les propriétés structurales et biologiques des PAMs (Findlay et al., 2011). Les structures des PAMMs sont prédites grâce à la bioinformatique (Wang et al., 2011). Des groupements latéraux sont fixés sur une structure rigide en diverses positions. La figure 17 illustre l'obtention d'un PAMM à partir d'un PAM. La PMX-30063 appartenant à ce groupe est proposée dans le traitement des infections à SARM et est en phase 1 d'expérimentation clinique (Giuliani et Rinaldi, 2011).

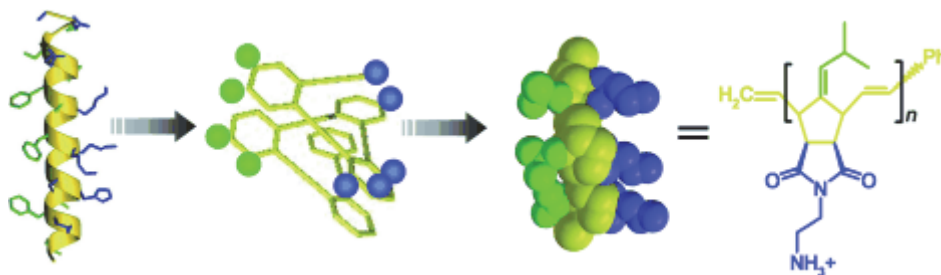


Figure 17 : Synthèse d'un PAMM à partir d'un PAM naturel (à gauche : magainine) par l'intermédiaire d'une structure rigide (Lienkamp et Tew, 2009).

VIII -7- Les lipopeptides

Les peptides synthétiques lipidés ou lipopeptides sont obtenus à partir du greffage d'une chaîne lipidique sur les peptides synthétiques. En effet, plusieurs études ont montré qu'en greffant une partie lipidique sur les PAMs, leurs activités sont augmentées. Les lipopeptides se mettent sous forme amphipatique et agissent comme des détergents en créant des pores dans la membrane bactérienne (pores

toroïdaux) (Mangoni et Shai, 2011). Des études ont montré l'efficacité de C16-KGGK par exemple sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Makovitzki et al., 2006) ou d'autres bactéries et champignons (Brotman et al., 2009 ; Makovitzki et al., 2007). Des lipopeptides naturels, tel que la daptomycine, sont retrouvés chez les organismes vivants.

VIII-8- Les peptoïdes

Les peptoïdes sont des enchaînements de résidus glycine poly-N-substitué (Simon et al., 1992 ; Zuckermann, 2011) (Figure 18) qui leur confère une bonne résistance aux protéases. Ces peptoïdes ont des activités antimicrobiennes et hémolytiques. Ils sont plus stables que les PAMs et peuvent être utilisés comme produits pharmaceutiques ou insérés dans les biomatériaux en raison de leur grande stabilité, de leur biodisponibilité et de la variabilité de leur chaîne latérale (Giuliani et Rinaldi, 2011). Les peptoïdes peuvent perturber la membrane et avoir des effets intracellulaires et intranucléaires (Uchida et al., 2009).

En plus des α -peptoïdes et des β -peptoïdes il existe des peptides-peptoïdes qui sont des structures hybrides présentant également de bonnes propriétés antimicrobiennes (Shuey et al., 2006 ; Olsen et al., 2007) et des hydrazino-azapeptoïdes (Sarma et al., 2011).

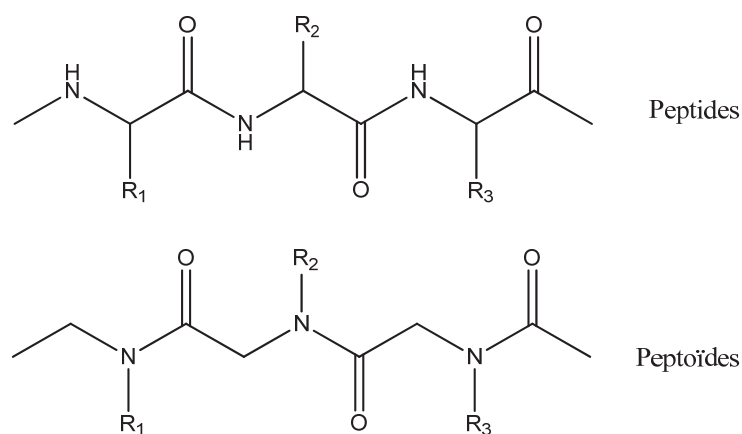


Figure 18 : Structure d'un peptoïde comparée à celle d'un peptide.

VIII -9-Les copolymères à séquence aléatoire

Le concept des copolymères à séquence aléatoire est basé sur le fait que l'activité des PAMs repose sur la répartition des charges plutôt que sur un type précis de conformation (Mowery et al., 2009). Ce sont des polymères issus de la copolymérisation d'au moins deux types de monomères, chimiquement différents, appelés co-monomères (Figure 19).

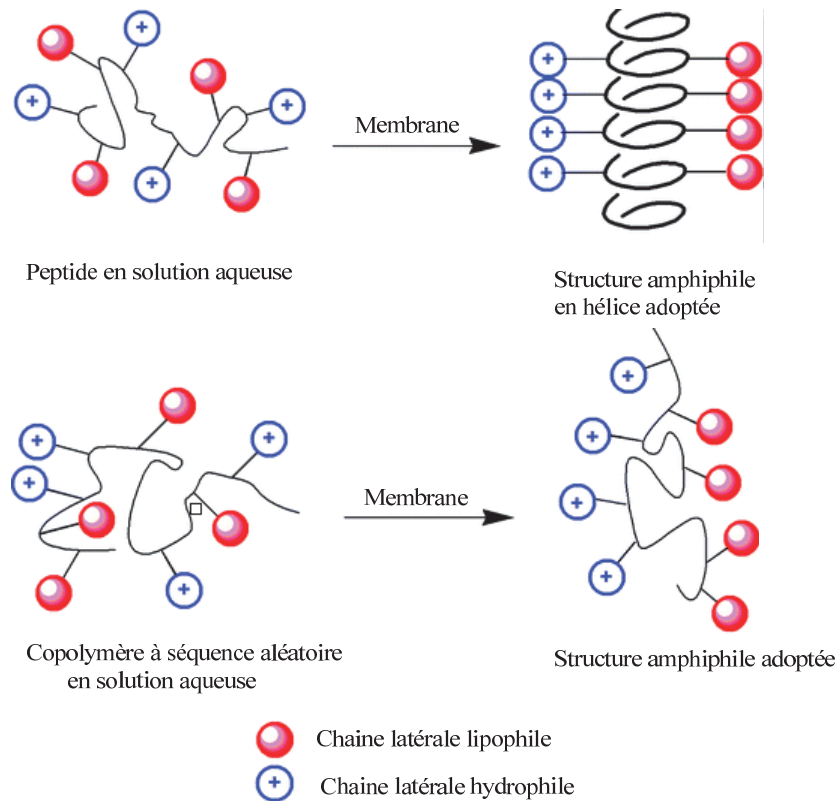


Figure 19 : Conformation d'un copolymère à séquence aléatoire par rapport à un peptide antimicrobien (Mowery et al., 2009).

Le peptide antimicrobien lorsqu'il rencontre la membrane d'un pathogène adopte une structure amphiphile structurée (exemple de l'hélice). Le copolymère n'adopte que la structure amphiphile (Mowery et al., 2009).

Les copolymères à enchaînement aléatoire, alterné et statistique sont des matériaux homogènes qui comprennent des sous-unités cationiques et lipophiles, comme le nylon-3, copolymère amphiphile généré *via* l'ouverture de cycle de polymérisation des β -lactames (Mowery et al., 2007 ; Epanand et al., 2008). Le polymère 3₆₀ est deux fois plus efficace que la magainine-Ala₃ sur *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecium*, et a une efficacité identique à cette dernière sur *Staphylococcus aureus* (Mowery et al., 2007).

Ces peptides élaborés par *drug design* (peptidomimétiques) sont plus stables que les PAMs classiques et peuvent agir comme des hormones et molécules sur le système nerveux central et le système immunitaire. Ils peuvent intervenir dans l'activité cellulaire, la digestion, la reproduction et la sensibilité à la douleur. Ils agissent sur la membrane mais peuvent également intervenir au niveau intracellulaire. Certains de ces peptidomimétiques sont en phase clinique d'expérimentation. Quelques-uns sont cités dans le tableau VII.

Tableau I :

Tableau VII : Peptidomimétiques en phase clinique d'expérimentation et applications thérapeutiques (Yeung et al., 2011).

Peptide ou peptidomimétique	Description	Applications	Phase clinique
IMX942	HDP cationique synthétique de la défense innée régulateur de peptide IDR1 (<i>Innate defense regulator</i>) et bacténecine	Infections nosocomiales, neutropénie fébrile	Ia
hLF1-11	Peptide cationique humain fragment de lactoferricine	Infections fongiques et bactériémies chez les immunodéprimés et les transplantés de cellules souches hématopoïétiques	I/II
Omiganan (MX-222/MBI-226)	Peptide synthétique cationique dérivé de l'indolicidine	Antiseptique topique, prévention des infections liées aux cathéters, anti-inflammatoires dans l'acné et la rosacée papulo-pustuleuse	III & II
Opebacan	Dérivé du peptide bactéricide 21-mer/ augmentant la perméabilité des protéines	Endotoxémie chez les receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques	I/II
XOMA-629	9-mer dérivé bactéricide augmentation de la perméabilité des protéines	Impétigo	IIa
Delmitide (RDP58)	Décapeptide semi-synthétique D-acides aminés à partir de molécules HLA de classe I B2702	Maladies inflammatoires de l'intestin	Post II
PAC-113	Synthétique 12-mer dérivé de l'histatine	Antifongique	II
PMX-30063	Structure non peptidique mimétique de la défensine, petites molécules / copolymères	Antibiotiques	Ib
HB-1345	Lipohexapeptide	Acné	I
Pexiganan acetate (MSI-78)	22-mer synthétique dérivé de la magainine	Antibiotique topique	III
Iseganan (IB-367)	17-mer synthétique dérivé de la Protégrine-1	Mucosite buccale chez les patients en radiothérapie	III
AP-214	Dérivé synthétique du HDP α -mélantropine, hormone fusionnée à hexalysine en C-terminal	Septicémie et défaillance d'organe post-chirurgicale	II
CD-NP	37-mer chimérique, dérivé de la combinaison de deux peptides natriurétiques ; activité hémodynamique absente	Défaillance d'un organe	II
Heptapeptide-7	7-Mer dérivé du prototype HB-107 (lui-même dérivé de la cécropine B)	Cicatrisation, régénération de la peau	I
OP-145	24-mer synthétique dérivé de la LL-37 pour liaison LTA et LPS	Otite moyenne chronique bactérienne	II
CZEN-002	8-Mer synthétique provenant de α -mélantropine	Candidose vulvo-vaginale	IIb

Chapitre III : Les granines

Les PAMs de la famille des granines sont étudiés dans notre laboratoire depuis plusieurs années. Les granines sont des glycophosphoprotéines acides (180 à 700 résidus), thermostables, présentes dans les granules de sécrétion des cellules nerveuses endocrines neuroendocrines et immunitaires (Huttner et al., 1991 ; Metz-Boutigue et al., 1998). Elles sont stockées dans les vésicules de grandes tailles appelées vésicules à cœur dense (LDCV, *Large dense Core Vesicule*) (Winkler et Fischer-Colbrie, 1992) des neurones et sont secrétées par les cellules chromaffines de la médullosurrénale.

Après une brève description de la glande surrénale et la médullosurrénale, l'organe du stress, riche en cellules chromaffines, nous présenterons la chromogranine A et deux de ses peptides dérivés, la catestatine (CAT) et la chromofungine (CHR), que nous avons étudié dans le cadre de notre thèse.

I- Les glandes surrénales

Les glandes surrénales sont deux glandes endocrines triangulaires situées au-dessus des reins chez les mammifères (Figure 20).

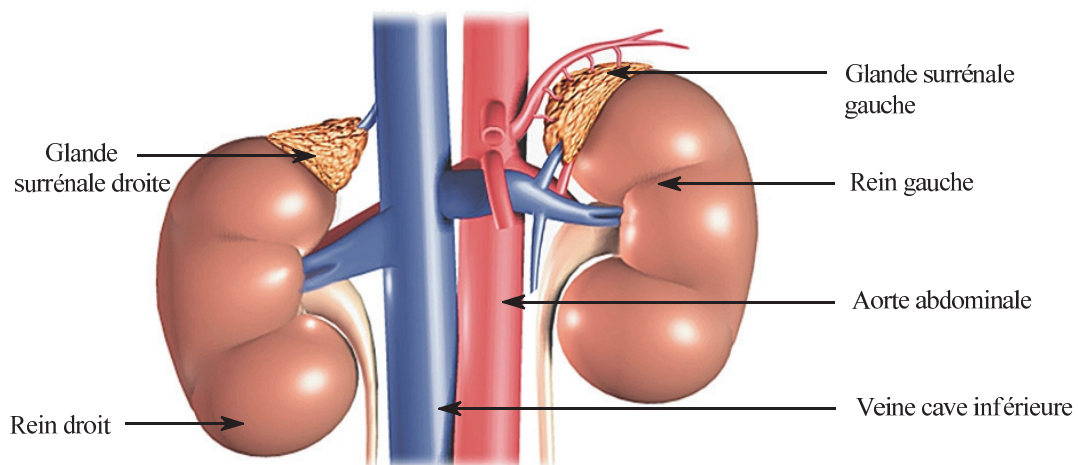


Figure 20 : Localisation des glandes surrénales (www.larousse.fr/encyclopedie).

Les glandes surrénales sont situées sur la partie supérieure des reins et sont irriguées par les artères diaphragmatiques de l'aorte abdominale.

Elles sont situées au niveau de la 12^{ème} vertèbre dorsale et pèsent entre 4-10 grammes, selon l'âge et l'état physiologique des personnes. Les glandes surrénales sont composées de deux parties : le cortex et la médulla (Figure 21). Elles sont principalement responsables de la gestion des situations de stress (*via* la synthèse et

la libération de corticoïdes et de catécholamines) et de l'homéostasie hydro-sodée (*via* l'aldostérone).

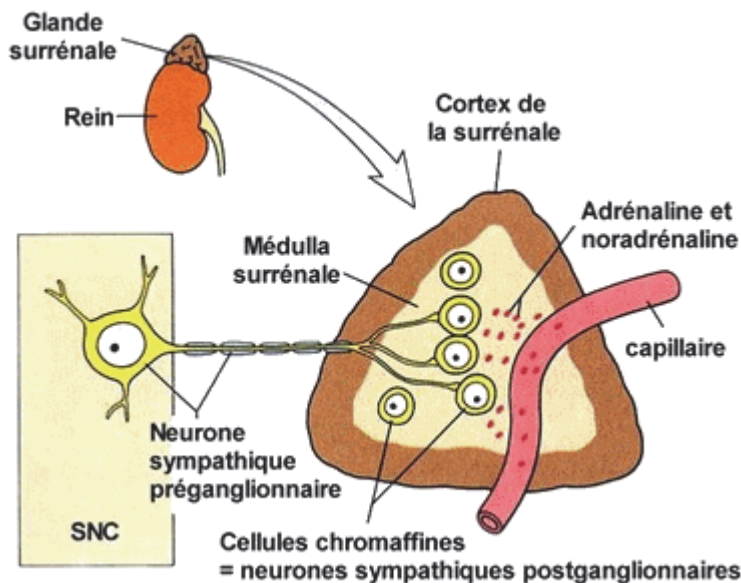


Figure 21 : Représentation schématique de la médullosurrénale
(<http://pages.infinet.net/wave/stress.htm> 05 Juillet 2012).

I-1- Le cortex

Le cortex, encore appelé zone corticale, cortex surrénalien ou corticosurrénale, est la partie périphérique de la glande surrénale. Il représente 90% de la surrénale (Epstein et al., 1999) et est composé de trois couches concentriques : la zone glomérulée sous-capsulaire, la zone moyenne fasciculée et la zone réticulée qui est en contact avec la médullosurrénale. D'origine mésodermique, il sécrète des glucocorticoïdes (cortisol), des minéralo-corticoïdes (aldostérone) et des androgènes. La corticosurrénale est régulée par l'hypophyse grâce à l'adrénocorticotrophine (ACTH) et par une commande humorale régulant l'aldostérone qui varie en fonction du taux de sodium, de potassium, du volume sanguin et de la pression artérielle.

I-2- La médullosurrénale

La médullosurrénale est la partie centrale (10%) de la glande surrénale. D'origine neuro-ectodermique, elle est innervée par le nerf sympathique *via* le nerf splanchnique. Elle est constituée très majoritairement de cellules chromaffines sécrétant les catécholamines (noradrénaline et adrénaline) à partir d'un précurseur, la dopamine, des enzymes protéolytiques (comme les prohormones convertases), de la

morphine ou encore des protéines (proenképhaline 1, chromogranine A) et de nombreux peptides (Goumon et al., 1996 ; Metz-Boutigue et al., 1998).

I-2-1- Les cellules chromaffines

Les cellules chromaffines sont ainsi appelées parce qu'elles se colorent en brun en présence de sels de chrome (Ogata et Ogata, 1917). Au cours de l'embryogénèse, les cellules de la crête neurale migrent jusqu'au niveau des ganglions sympathiques pour former les cellules chromaffines ou jusqu'au niveau de l'espace péritonéal pour générer les cellules entérochromaffines. Elles sont innervées par les fibres sympathiques préganglionnaires.

Les cellules chromaffines sont riches en granules de sécrétion (Figure 22) et constituent un modèle d'étude pour l'analyse des mécanismes moléculaires de l'exocytose (Aunis, 1998).

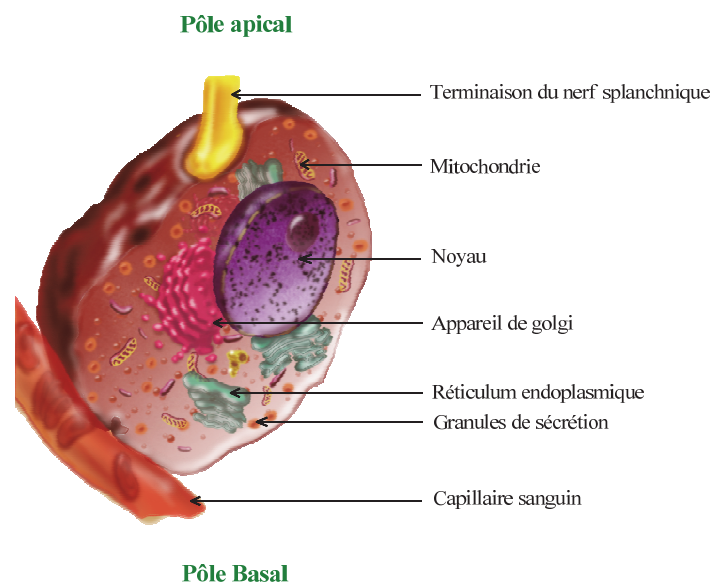


Figure 22 : Représentation schématique d'une cellule chromaffine.

I-2-2- Les granules de sécrétion des cellules chromaffines

Les granules de sécrétion sont les organelles de stockage des catécholamines (Blaschko et Welch, 1953 ; Hillarp et Hokfelt, 1953) et de nombreuses espèces moléculaires. L'analyse protéomique réalisée par Wegrzyn a permis d'identifier toutes ces espèces moléculaires dont huit des neuf membres de la famille des granines ont été retrouvés (sauf HISL-19) (Wegrzyn et al., 2007). Elles ont été classées en différentes catégories fonctionnelles dont quelques exemples sont cités :

- les protéines intervenant dans la production de prohormones (CGA, CGB, SG II, SG III, SG V, NESP 55 VGF, Pro-SAAS), d'enzymes, de neurotransmetteurs et de transporteurs (tyrosine -3-hydroxylase), de protéases (cathepsine, prohormone convertase 1 et 2, cystatine C)...
- les protéines intervenant dans le trafic intragranulaire : protéines de fixation et transduction des signaux (protéines RAS et Rho), de l'exocytose (synaptogamine 1 et 7), protéines impliquées dans la régulation du calcium (annexine)
- les protéines intervenant dans l'environnement intragranulaire : facteurs redox (cytochrome C), ATPases pour la régulation des protéines, synthèse de protéines
- et pour finir, les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et des protéines structurales (actine, tubuline, cadhérine...)

La figure 23 rassemble les espèces moléculaires identifiées dans les cellules chromaffines et les fonctions qui leur sont attribuées (Wegrzyn et al., 2007).

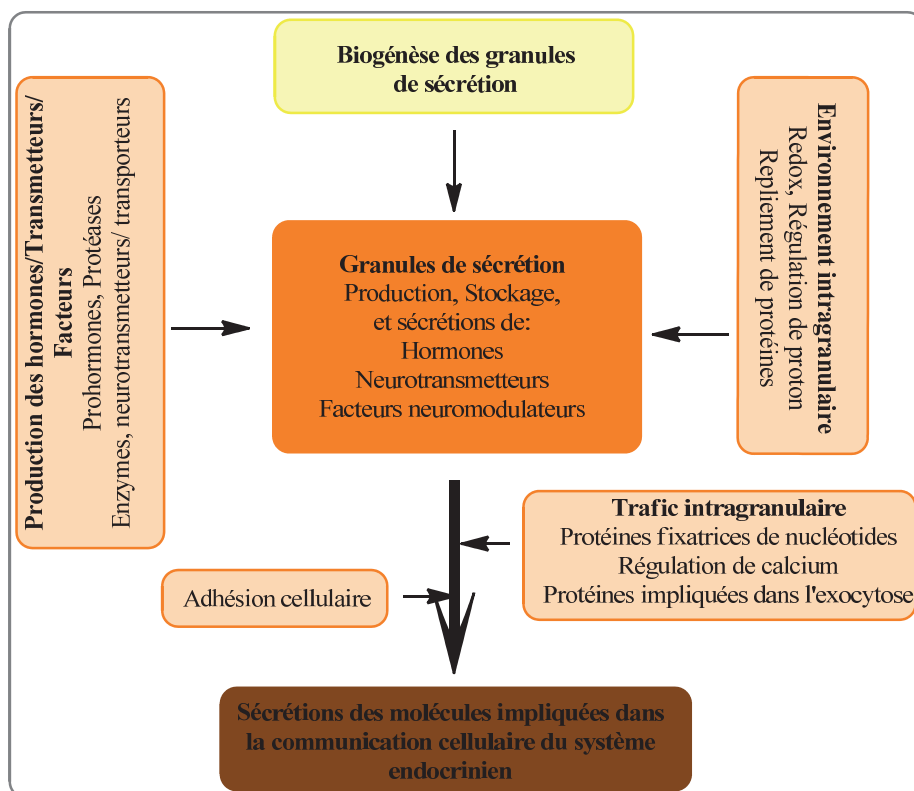


Figure 23 : Fonctions biologiques des constituants des granules de sécrétion des cellules chromaffines (Wegrzyn, 2007).

Les protéines présentes dans les granules de sécrétion sont libérées par les faces latérales des cellules chromaffines, permettant ainsi la communication paracrine ou

autocrine entre les cellules. Cette libération est obtenue par exocytose (fusion complète des granules avec la membrane plasmique) (Aunis, 1998) ou par le mécanisme du *Kiss and Run* (Henkel et al., 2001) (ouverture transitoire d'un pore de fusion).

II- La famille des granines

II-1-Les chromogranines et les sécrétogranines

Les protéines solubles des granules de sécrétion ont été découvertes en 1958 (Hillarp, 1958). C'est en 1965 que Banks découvre la CGA, premier membre de cette famille de protéines, qui est libérée en même temps que les catécholamines lors de l'exocytose (Banks et Helle, 1965) mais ce n'est qu'en 1967, qu'elle reçoit ce nom (Blaschko et al., 1967). Plus tard, d'autres protéines ont été découvertes et intégrées dans la famille des granines qui comporte à présent 9 membres (Helle, 2004 ; Chakraborty et al., 2006 ; Bartolomucci et al., 2011) se répartissant en deux groupes : les chromogranines (CGs) et les sécrétogranines (SGs) (Tableau VIII).

Tableau VIII : Les 9 membres de la famille des granines et les principaux auteurs ayant conduit à leur découverte

	Granines	Auteurs
Chromogranines	Protéines solubles	(Hillarp, 1958)
	Chromogranine A	(Banks et Helle, 1965 ; Blaschko et al., 1967)
	Chromogranine B ou Sécrétogranine I	(Falkensammer et al., 1985 ; Fischer-Colbrie et al., 1985 ; Benedum et al., 1987)
Sécrétogranines	Chromogranine C ou Sécrétogranine II	(Rosa et Zanini, 1981 ; Cozzi et Zanini, 1986 ; Fischer-Colbrie et al., 1986 ; Lassmann et al., 1986 ; Rindi et al., 1986 ; Rundle et al., 1986)
	Sécrétogranine III ou Antigène 1 β 1075	(Ottiger et al., 1990 ; Sigafos et al., 1991 ; Dopazo et al., 1993)
	Sécrétogranine IV ou HISL-19	(Srikanta et al., 1986 ; Krisch et al., 1988)
	Sécrétogranine V ou Protéine 7 β 2	(Hsi et al., 1982 ; Iguchi et al., 1984)
	Neuroendocrine Secretary peptides NESP 55	(Eiden, 1987 ; Ischia et al., 1997)
	Vaccina growth factor VGF or nerve growth factor inducible protein VGF	(Twardzik et al., 1985 ; Helle, 2004)
	Pro-SAAS	(Fricker et al., 2000)

Les granines présentent des propriétés biologiques, moléculaires et cellulaires décrites dans différentes revues (Huttner et al., 1991 ; Taupenot et al., 2003 ; Helle,

2004 ; Aunis, 2009). Elles sont capables de se lier au calcium et interviennent dans la genèse des granules de sécrétion (Kim et al., 2001 ; Huh et al., 2003 ; Beuret et al., 2004). Les granines sont des marqueurs de tumeurs neuroendocrines (Bartolomucci et al., 2010) et de gravité (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome* et sepsis) (Zhang et al., 2008). Une revue de Willis (Willis et al., 2011) détaille l'implication des granines dans les pathologies neurologiques (la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaque). La concentration des CGs est augmentée dans la rétinopathie diabétique (Fournier et al., 2010). La CGA est impliquée dans les maladies inflammatoires (Helle, 2010 ; Sciola et al., 2009), les maladies chroniques du foie, les tumeurs hépatocellulaire (Massironi et al., 2009) et dans les cardiopathies (Corti et al., 2000 ; Ceconi et al., 2002 ; Pieroni et al., 2007 ; Tota et al., 2010). La CGB y est également impliquée (Rosjo et al., 2010) ainsi dans la maladie de Creutzfeldt-Jacob (Rangon et al., 2003). Le tableau ci-dessous décrit la variation du taux de CGA sanguin dans différentes pathologies (Glinicki et Jeske, 2010).

Tableau IX : Variation du niveau de CGA dans différentes pathologies (Glinicki et Jeske, 2010).

Forte variation du taux de CGA	Faible variation du taux de CGA
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibiteurs de pompes à proton • Blocage des récepteurs d'histamine H2 • Gastrite • Altération de la fonction rénale • Polyarthrite rhumatoïde • Effet néphrotoxique ou insuffisance rénale causée par des traitements de chimiothérapie • Cancer de la prostate et hyperplasie bénigne de la prostate 	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Crohn et rectocolite hémorragique) • hypertension artérielle • Syndrome coronarien aigu • Insuffisance cardiaque • Artérite à cellules géantes • Détérioration de la fonction hépatique (cirrhose, insuffisance hépatique chronique) • Adénocarcinome pancréatique • Syndrome de l'intestin irritable • Carcinome hépatocellulaire • Hyperthyroïdie • Hyperparathyroïdie • Obstruction des voies respiratoires chez les fumeurs • Polyarthrite rhumatoïde systémique • Maladie de Parkinson • Grossesse • Tumeurs non-endocrines (cancer du sein, cancer du poumon, cancer de l'intestin, cancer de l'utérus, cancer génito-urinaire, cancer hématologique, cancer de la tête et du cou)

Les granines sont des pré-proprotéines qui comportent de nombreux sites de clivage par les endopeptidases telles les serine protéases, les plasmines (Dillen et al.,

1993 ; Eskeland et al., 1996), les prohormones convertases (dans les granules de sécrétion), la kallikréine au moment de l'exocytose (Metz-Boutigue et al., 1993), dans la circulation sanguine (Helle, 2004) et la cathepsine L dans les granules de formation (Biswas et al., 2009). Les peptides obtenus possèdent des effets autocrines, paracrines et endocrines (Eiden, 1987 ; Fischer-Colbrie et al., 1995 ; Taupenot et al., 2003).

Les rôles biologiques des peptides dérivés des granines ont été identifiés dans plusieurs études. Les plus connus sont les peptides dérivés de la chromogranine A. Quelques-unes de ses fonctions sont décrites dans le tableau X.

Les chromogranines sont produites et stockées dans les cellules hypophysaires, les cellules C de la thyroïde, les cellules de la parathyroïde, les cellules chromaffines et les cellules neuroendocrines du tractus intestinal et pulmonaire (Montero-Hadjadje et al., 2008). Les chromogranines ont été retrouvées dans de nombreuses espèces : Humain, Bovin, Rat, Souris, Poisson, Batracien. La proportion relative des différentes chromogranines varie d'une espèce à une autre. Ainsi dans les cellules chromaffines du bœuf, la CGA est plus importante que dans celle du mouton et du cheval tandis que chez l'homme, c'est la CGB qui domine de même que chez le rat et la souris (Fischer-Colbrie et Schober, 1987). Bien que ce soit la CGB qui est majoritaire chez l'homme, c'est la CGA qui a été la mieux étudiée car plus accessible à partir des surrénales de bœuf. Ces études ont montré que la CGA peut subir des modifications post-traductionnelles : formation d'un pont disulfure et N-glycosylation (dans le réticulum endoplasmique rugueux), O-glycosylation, phosphorylation, et sulfatation (dans l'appareil de Golgi), oxydation (dans l'appareil de Golgi et dans la matrice des granules possédant un système redox), amidation C-terminale et cyclisation N-terminale pour les fragments générés au cours de la maturation intragranulaire. Les CGs possèdent des sites potentiels de clivage protéolytique dibasique et tribasique qui permettent l'obtention de nombreux peptides dérivés (Metz-Boutigue et al., 1993).

Tableau X : Fonctions des CGs et de leurs peptides dérivés.

(Taupenot et al., 2003 ; Shimizu et al., 2002 ; Helle, 2004 ; Koshimizu et al., 2011 ; Koshimizu et al., 2011 ; Angelone et al., 2010 ; Guerin et al., 2011).

Granines et peptides	Activités biologiques
CGA₁₋₄₀ bovine	Augmentation de la relaxation de la calcitonine et de l'expression des gènes liés à la calcitonine dans les cellules tumorales du poumon, inhibition de la vasoconstriction, inhibition de la sécrétion des hormones parathyroïdiennes
CGA₄₋₁₆	Inhibition de la motilité intestinale et modulation de la douleur
Chromofungine bovine CGA₄₇₋₆₆	Activité antifongique, modulation de la douleur
CGA₁₋₆₄ rat	Lusitropie et inotropie négative
Vasostatine bovine CGA₁₋₇₆	Inhibition de la vasoconstriction, contribution à l'adhésion des fibroblastes, inhibition de la sécrétion des hormones parathyroïdiennes, activation des cellules microgliales médiant l'apoptose des neurones et les activités antimicrobiennes
Vasostatine bovine II CGA₁₋₁₁₃	Inhibition de la vasoconstriction et de la sécrétion des hormones parathyroïdiennes
Prochromacine bovine CGA₇₉₋₄₃₁	Activité bactériolytique et antifongique
Chromacine I et II bovine CGA₁₇₃₋₁₉₄ et CGA₁₉₅₋₂₂₁	Activité bactériolytique et antifongique
Pancréastatine porcine CGA₂₄₀₋₂₈₈	Inhibition de la libération d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques ; augmentation de la glycogénolyse hépatique, diminution de la synthèse de l'insuline induite par le glycogène dans les myocytes squelettiques, hépatocytes et adipocytes, stimulation de la libération d'amylase à partir du pancréas ; diminution de la libération gastrique de cellules pariétales, mobilisation du glucose nécessaire aux muscles
Catestatine bovine CGA₃₄₄₋₃₆₄ ou humaine CGA₃₅₂₋₃₇₂	Inhibition de la sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines, antibactérien, attraction des monocytes, antiplasmodiale
Parastatine porcine CGA₃₄₇₋₄₁₉	Inhibition de la sécrétion des hormones parathyroïdiennes
Serpinine CGA₄₀₃₋₄₂₈	Effet anti-apoptotique important dans la neuroprotection des neurones du système nerveux central et des cellules hypophysaires, régulation autocrine de la biogénèse des granules de sécrétion
Chromogranine B	
CGB₁₋₄₁ bovine	Inhibition de la sécrétion des hormones parathyroïdiennes
Chrombacine bovine CGB₅₆₄₋₆₂₆	Activité bactériolytique
CGB₁₋₆₅₇ souris	Activité bactériolytique
Sécrétogranine II	
Secrétoeurine rat SGII 154-186	Stimulation de la libération de dopamine par les neurones du striatum central et des noyaux gris centraux, stimulation de la sécrétion des gonadotrophines II par l'hypophyse, inhibition de la sérotonine et sécrétion de mélatonine par les pinélocytes, activation de l'activité chimiotactique des éosinophiles monocytes et les fibroblastes, stimulation de la prolifération et de la migration des cellules vascularisées des muscles lisses, stimulation de la migration et inhibition de la prolifération des cellules endothéliales, stimulation de la migration transendothéliale des monocytes ; activation des cellules endothéliales et adhésion des neutrophiles

Tableau X : Fonctions des CGs et de leurs peptides dérivés (suite)

Granines et peptides dérivés	Activités biologiques
Sécrétogranine III	
Sécrétogranine III ou antigène 1β1075	Association à la CGB dans la membrane des granules pour réguler la voie de la CGA par liaison à CGA ₄₈₋₁₁₁
Sécrétogranine IV	
Sécrétogranine IV ou HISL-19	Marqueur spécifique des tumeurs neuroendocrines
Sécrétogranine V	
Protéine 7B2 humaine SG V₁₋₁₃₅ (N terminale)	Activation et transport de la pré-prohormone convertase 2
Protéine 7B2 humaine SG V₁₅₅₋₁₈₅ (C terminale)	Inhibition de la prohormone convertase 2
Sécrétogranine VI	
Sécrétogranine bovine VI : SGIV₁₅₉₋₁₆₂	Antagoniste des récepteurs 5-HT _{1B} sérotoninergiques
Sécrétogranine VII	
Sécrétogranine VII ou VGF (<i>Vaccina growth factor</i>)	Rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie énergétique
ProSAAS	
ProSAAS	Précurseur de plusieurs peptides intervenant dans l'obésité, inhibition de la prohormone convertase-1

II-2-La chromogranine A

La chromogranine A (CGA) est une protéine acide composée de 439 résidus (457 avec la séquence signal) chez l'homme, 431 (449 avec la séquence signal) chez le bœuf. Le gène responsable est localisé sur différents chromosomes en fonction des espèces ; respectivement les chromosomes 14 et 21 pour les espèces précitées. La masse moléculaire apparente de la CGA est de 49 kDa chez l'homme et 48 kDa chez le bœuf mais sur un gel SDS-PAGE, elle est détectée à 70 kDa du fait des modifications post-traductionnelles et des charges négatives qui retardent la migration électrophorétique.

Le tableau XI résume les principales caractéristiques de la chromogranine bovine et de la chromogranine humaine (www.uniprot.org/uniprot/P10645 ; www.uniprot.org/uniprot/P05059).

Tableau XI : Caractéristiques et propriétés de la CGA humaine et bovine.

	CGA humaine	CGA bovine
Chromosome	14	21
Séquence protéique (nombre de résidus)	439	431
Séquence signal (nombre de résidus)	18	18
Masse moléculaire (kDa)	49	48
Point isoélectrique	4,5	4,7
Points de clivage	77, 115, 209, 273, 373, 395	77, 114, 314, 330, 364, 392, 401
Principaux peptides naturels	Vasostatine I et II, prochromacine, pancréastatine, WE-14 et catestatine	Vasostatine I et II, prochromacine, parastatine, pancréastatine, WE-14 et catestatine
O-Glycosylation	Thréonine 163, 165 et 233	Sérine 167, 186 et thréonine 231
Phosphorylation	Sérine 84, 95, 118, 124, 185, 200, 252, 282, 304, 315, 384,	Sérine 81, 124, 297, 372, 376 Tyrosine 173
Amidation	Glycine 301, Arginine 438	Glycine 294 (Probable)

Les figures 24 et 25 illustrent les CGA humaine et bovine, leurs peptides dérivés et les modifications post-traductionnelles pouvant intervenir.

La comparaison des séquences de la CGA chez les vertébrés, révèle que les domaines N- et C-terminaux (CGA₁₋₇₆ et CGA₃₄₄₋₃₇₇) sont très conservés au long de l'évolution, suggérant leur rôle important dans l'activité biologique de la protéine (Montero-Hadjadje et al., 2008) (Tableau XII).

Tableau XII : Conservation des séquences primaires des parties N- et C -terminales de la CGA au cours de l'évolution.

	Espèces	Séquence
Chromofungine	Humain, Bovin, Cheval	RILSILRHQNLLKELQDLAL
	Rat	RVLSILRHQNLLKELQDLAL
Catestatine	Humain	RSMRLSFRARGYGFRGPGLQL
	Bovin	SSMKLSFRARAYGFRGPGPQL
	Cheval	RSMKLSFRARAYGFRGPGLQL
	Rat	RSMKLSFRARAYGFRDPGPQL

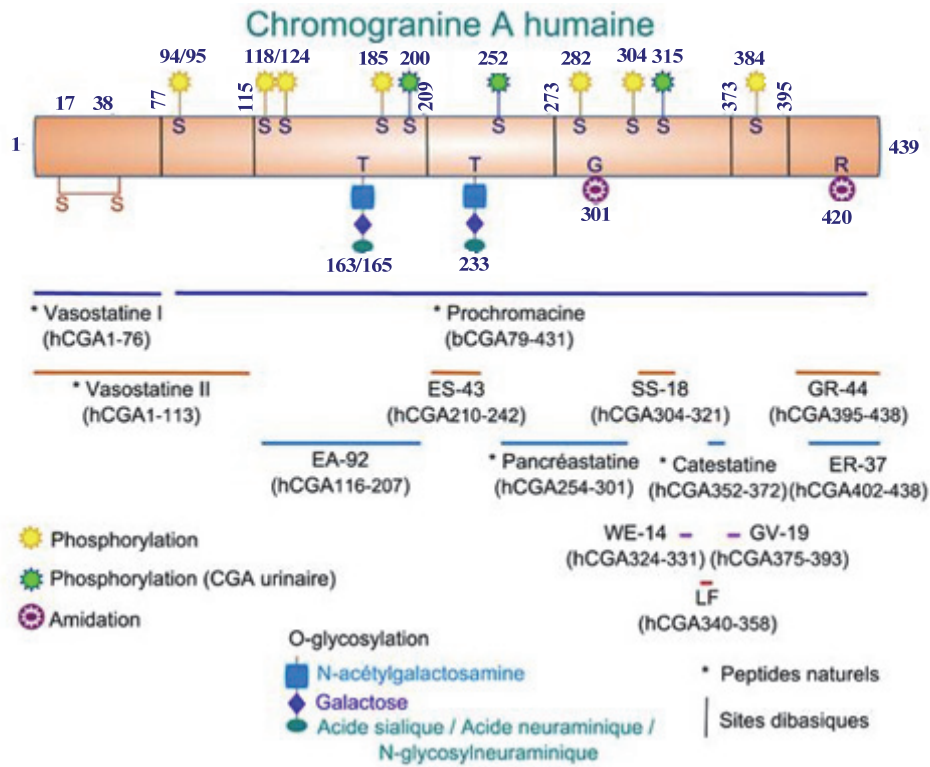


Figure 24 : Localisation sur la séquence de la CGA humaine des points de clivage et des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés (Konecki et al., 1987 ; Gadroy et al., 1998 ; Orr et al., 2002 ; Beranova-Giorgianni et al., 2006).

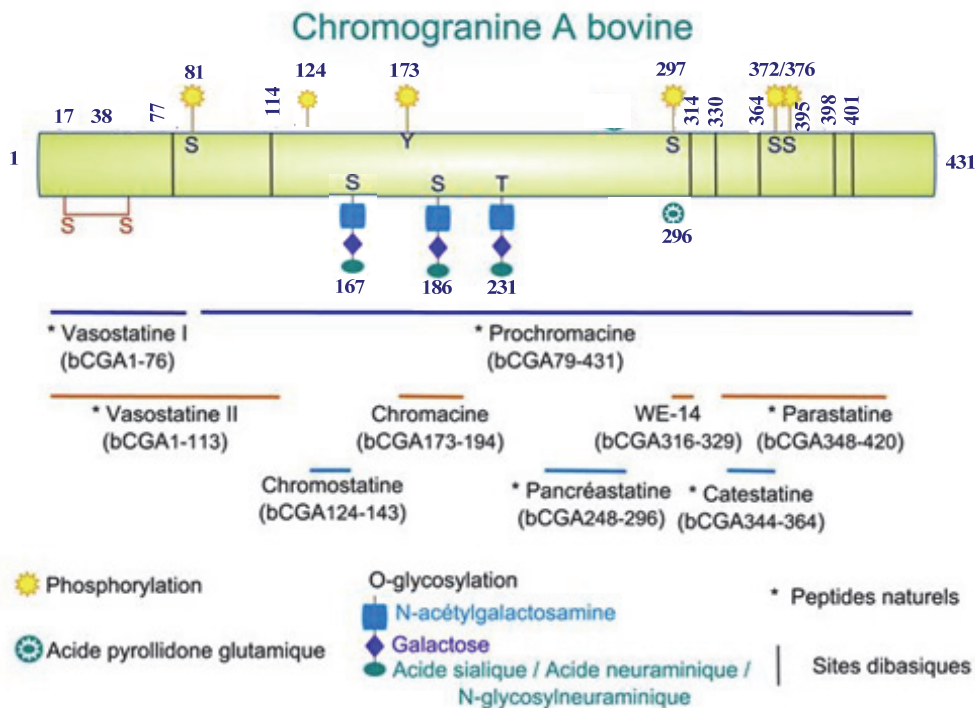


Figure 25 : Localisation sur la séquence de la CGA bovine des points de clivage et des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés (Kang et Yoo, 1997 ; Nakano et al., 1989 ; Strub et al., 1997 ; Lee et al., 2003).

II-2-1-La catestatine

La catestatine (CAT) a été citée pour la première fois par Mahata en 1997. C'est un peptide naturel, inhibiteur non compétitif de la nicotine, obtenu par clivage protéolytique de la CGA (hCGA₃₅₂₋₃₇₂ et bCGA₃₄₄₋₃₆₄). Elle exerce un rétrocontrôle sur la libération des catécholamines par les cellules chromaffines de la médullosurrénale (Mahata et al., 1997). Trois variantes humaines ont été identifiées : Gly364Ser, Pro370Leu et Arg374Gln. Elles jouent le même rôle que la catestatine de type sauvage dans l'inhibition du processus nicotinique : Pro370Leu > type sauvage > Gly364Ser > Arg374Gln (Mahata et al., 2004) et la baisse de la pression artérielle (Rao et al., 2007). La catestatine présente également un effet vasodilatateur (Kennedy et al., 1998) et elle est diminuée chez les sujets hypertendus (O'Connor et al., 2002) mais dernièrement, des travaux ont montré que les taux plasmatiques de noradrénaline et de catestatine sont significativement plus élevés chez les patients présentant une hypertension essentielle que chez les témoins sains (Meng et al., 2011). Elle intervient dans la régulation de l'activité cardiovasculaire (Helle, 2004) et peut servir de marqueur dans les tumeurs carcinoïdes de l'appendice (Prommegger et al., 2003).

La catestatine est une hormone pléiotrope (Theurl et al., 2010). Son rôle antimicrobien a été montré sur des bactéries, des champignons et des levures (Briolat et al., 2005). Les expériences d'Egger en 2008 montrent que la catestatine joue un rôle chimioattracteur sur les monocytes, comparable à celui du peptide Met-Leu-Leu qui est un bon chimioattracteur et suggère ainsi qu'elle est une cytokine inflammatoire (Egger et al., 2008).

La catestatine provoque également un influx de calcium dans les PMNs (Zhang et al., 2009). Elle inhibe également la croissance des souches de *Plasmodium* chloroquino-résistante (Akaddar et al., 2010), par inhibition de la plasmepsine nécessaire au parasite pour son développement.

Elle stimule également la production d'interleukine-8 par les kératinocytes humains *via* l'activation des protéines kinases par les mitogènes (Aung et al., 2011) et induit la dégranulation des mastocytes entraînant la libération des histamines au site d'inflammation (Kruger et al., 2003). Elle contribue à la cicatrisation des plaies en augmentant la migration et la prolifération des kératinocytes au site de la plaie. De plus, elle augmente la mobilisation intracellulaire de Ca²⁺ (Hoq et al., 2011).

La forme raccourcie de la catestatine bovine, la cateslytine bCGA₃₄₄₋₃₅₈ est la partie active de la catestatine. Elle présente également des propriétés antimicrobiennes de l'ordre du micromolaire sur des champignons, des bactéries, des levures et n'est pas lytique pour les cellules de l'hôte (Briolat et al., 2005). Les études de Jean-François et collaborateurs ont montré que la cateslytine est un peptide pléiomorphe non structuré dans l'eau qui adopte une structure en feuillet β

au contact des membranes bactériennes (Jean-Francois et al., 2007 ; Jean-Francois et al., 2008a). La cateslytine induit également la formation de pores dans les membranes des champignons (Jean-Francois et al., 2008b). Sur des membranes mimant *Candida albicans* et riches en ergostérol, la cateslytine induit une rigidité membranaire. Cette rigidité est liée à un feuillet β antiparallèle stabilisé par les interactions électrostatiques π (Jean-Francois et al., 2009).

La structure de la catestatine bovine a été déterminée par modélisation moléculaire par homologie avec des structures connues. Sa structure en feuillet β -boucle-feuillet β la stabilise du fait des liaisons hydrophobes entre les feuilletts beta. Les trois résidus d'arginine de la catestatine ont leur chaîne latérale électropositive et forment l'extrémité de la structure ce qui donne lieu à une asymétrie importante (Tsigelny et al., 1998). Le figure 26 illustre la régulation autocrine et paracrine de la catestatine dans différents organes humains (Mahata et al., 2010).

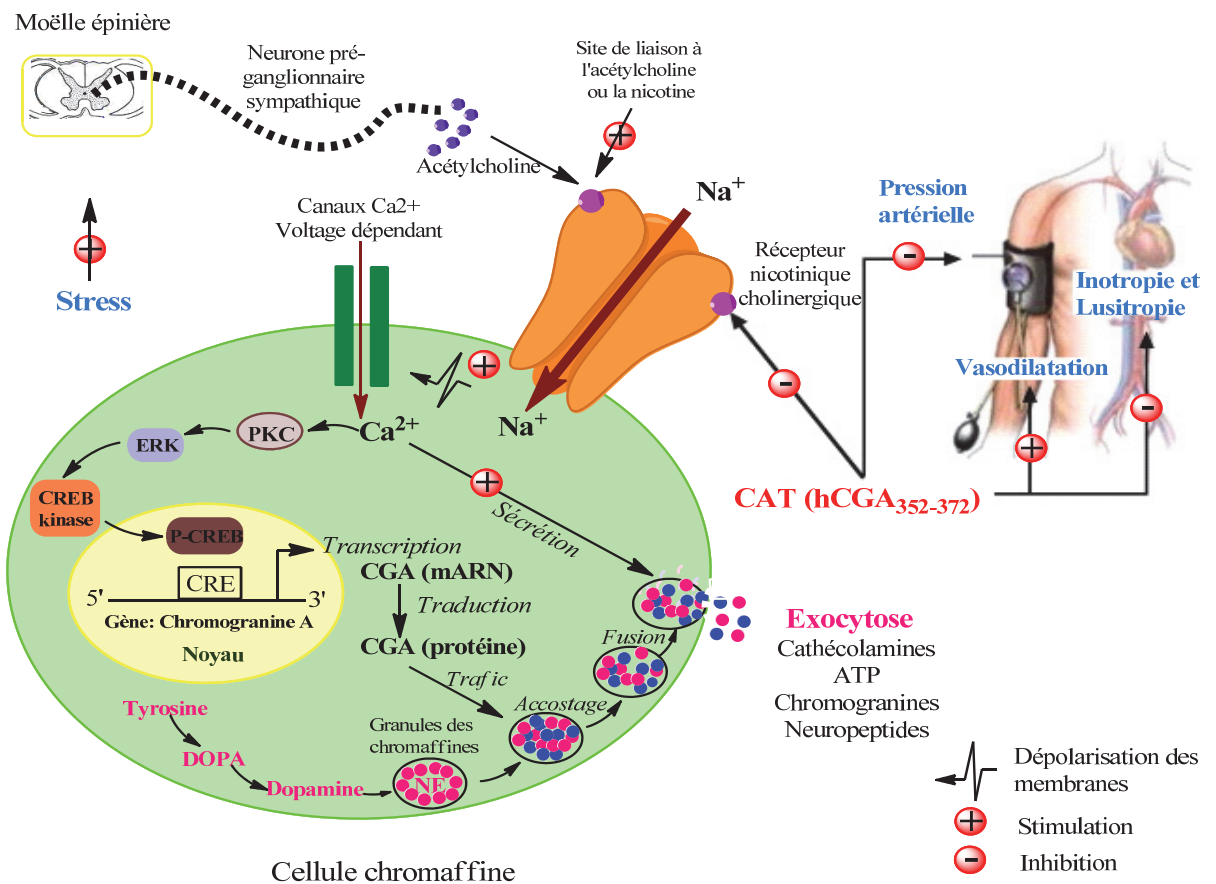


Figure 26 : Régulation autocrine et paracrine de la catestatine (Mahata et al, 2010).

II-2-2-La chromofungine

La chromofungine est également une séquence très conservée de la CGA. Elle est identique chez l'humain et le bovin. Elle possède des propriétés antifongiques et des propriétés antibactériennes (Lugardon et al., 2001). Elle adopte une structure hélicoïdale et pénètre dans les monocouches lipidiques. Insérée dans des films de multicouches de polyélectrolytes, elle conserve son activité en inhibant la croissance fongique (Etienne et al., 2005). La chromofungine agit également sur les cibles intracellulaires et interagit avec la calmoduline. Elle provoque l'influx de calcium dans les PMNs (Zhang et al., 2009). Des expériences chez le rat ont montré que la chromofungine a un rôle anti-nociceptif ou pro-nociceptif en fonction de la concentration de peptide utilisé (Ghia et al., 2004). En effet la chromofungine injectée avant l'induction d'une inflammation à l'acide acétique empêche l'inflammation et diminue la perception de la douleur.

Chapitre IV : Les plantes médicinales

I- Généralités sur les plantes médicinales

La phytothérapie, du grec *phyton* pour plante et *therapein* pour soigner, est l'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique. L'usage des plantes en thérapeutique est séculaire. En effet, les plus vieux écrits retrouvés datent de -5000 ans avant J.C. Ils ont été découverts en 1948 sur les tablettes de Nippur et concernent environ 250 espèces végétales (Clarac et Ternaux, 2008), attestant ainsi que les plantes médicinales sont utilisées depuis des millénaires. D'autres arguments plaident également pour attester un recours très ancien à la phytothérapie. En effet, des chercheurs ont retrouvé des traces de pollen de 8 plantes médicinales dans des sépultures de l'époque néandertalienne (-60000 ans). Dans de nombreuses civilisations, des traces écrites ont également été retrouvées. Le tableau XIII retrace une chronologie de quelques traces écrites de la médecine traditionnelle qui ont été retrouvées dans les différentes civilisations avant notre ère.

Tableau XIII : Tableau chronologique récapitulatif de preuves écrites de phytothérapie dans différentes civilisations.

Civilisations	Date	Ecrit
Sumérienne	-5000 ans	Tablette de Nippur
Chine	-2900 ans	Shennong Bencao Jing
Egypte	-1600 ans	Papyrus d'Ebers
Inde antique	-1500 ans	Sushruta et Charaka (âyurveda)
Grèce antique	-500 ans	Corpus Hippocratique (Hippocrate)
Grèce antique	-300 ans	<i>Historia plantarum</i> (Théophraste)
Grèce	+60 ans	<i>De materia medica</i> (Dioscoride)

En Afrique, les plantes sont également utilisées de manière ancestrale. Malheureusement, très peu de traces sont retrouvées du fait de la transmission orale des savoirs pendant longtemps. Cependant, ces savoirs traditionnels ont traversé les siècles et continuent d'être utilisés.

Aujourd'hui, face à l'émergence de nouvelles maladies infectieuses et neurologiques et de nombreuses souches résistantes de pathogènes, les plantes médicinales constituent une alternative. Ainsi, de plus en plus de scientifiques s'intéressent aux plantes et tentent d'en isoler les principes actifs.

Les propriétés médicinales des plantes, dues à leur composition chimique, peuvent s'expliquer par le fait que les plantes synthétisent des métabolites primaires (protéines, lipides, hydrate de carbone) pour leur existence et celles des organismes qui s'en nourrissent ainsi que des métabolites secondaires destinés à les protéger contre les agressions causées par les champignons, les bactéries, les animaux ou

d'autres plantes. C'est dans ce second groupe de métabolites que sont retrouvées les molécules actives (Cox, 1994).

Plusieurs arguments plaident pour l'usage des plantes médicinales : leur faible coût, la résistance accrue des pathogènes aux antibiotiques classiques, les limites de la médecine moderne, la richesse médicinale des plantes.

Au Bénin, différentes plantes sont utilisées dans le traitement des maladies liées à l'intestin. Pour la grande majorité de ces plantes, leur usage et leur efficacité ne sont pas validés scientifiquement et les principes actifs responsables de l'activité sont inconnus.

II- Les grandes familles de principes actifs

Les principes actifs des plantes dérivent de leur métabolisme primaire et de leur métabolisme secondaire.

Le métabolisme primaire aboutit à la synthèse de molécules indispensables à la plante telles que les sucres, les protéines, les lipides, les vitamines, les macroéléments et les oligoéléments. C'est dans ce groupe que sont en général tirés les compléments alimentaires et les alicaments.

Le métabolisme secondaire consiste en la production de molécules permettant à la plante de s'adapter à son biotope. On y retrouve des molécules appartenant aux familles des alcaloïdes, des polyphénols, des saponosides, des coumarines, des stéroïdes, des terpènes. Ces molécules sont souvent responsables des propriétés médicinales des plantes.

Ces molécules ont souvent des activités biologiques bénéfiques, mais il existe aussi dans les plantes beaucoup de molécules toxiques ou dont la toxicité est liée à la dose. Dans ce chapitre, nous nous sommes plus intéressés aux avantages liés à ces molécules. Les principes actifs des plantes et les activités qui leur sont associées sont décrits et classés d'après Morel (Morel, 2008).

II-1- Les sucres

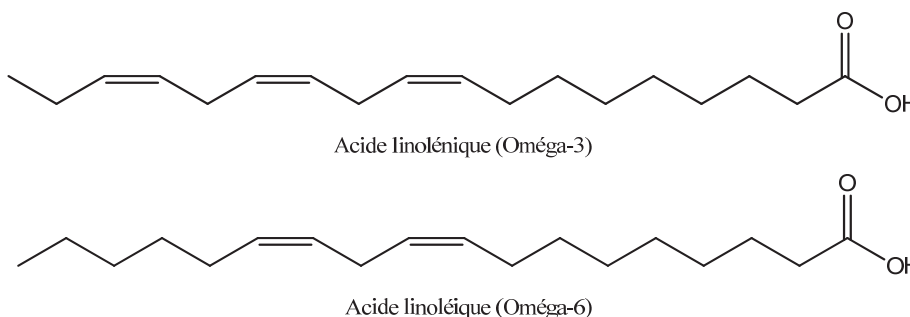
Ce sont les sucres simples comme le glucose, le fructose, le galactose, l'arabinose, le fucose ou les polyosides du genre des polysaccharides. Ils assurent un stockage d'énergie, et entrent dans la composition de la paroi cellulaire. En nutrition, ils sont utilisés comme source d'hydrates de carbone. En médecine, ils sont utilisés comme gastroprotecteur et participent à la formulation galénique de certains médicaments. Ce sont également des prébiotiques, adoucissants, anti-inflammatoires, antitussifs, épaississants et constipants. Les polysaccharides stimulent l'hématopoïèse, l'augmentation de la teneur en certaines macroglobulines du plasma, (Sychev et al., 2006).

II-2- Les lipides

Les lipides végétaux sont généralement des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. En alimentation, les acides gras polyinsaturés sont les sources d'acides gras essentiels (Oméga-3 et oméga-6), car ils ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères.

Dans la famille des oméga-6, le précurseur, l'acide linoléique est transformé en acide arachidonique, puis en acide docosapentaénoïque.

Dans la famille des oméga-3, l'alpha-linolénique est transformé en acide eicosapentaénoïque et en acide docosahexaénoïque.



II-3- les vitamines

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires aux métabolismes. L'homme est incapable de les synthétiser donc elles doivent lui être apportées par l'alimentation. Les fruits et légumes constituent les principales sources d'apport. Les vitamines sont des coenzymes (Ettlinger et al., 1961 ; Remesy et al., 1996), indispensables pour l'homme car la déficience en vitamines peut causer de nombreuses pathologies (scorbut, rachitisme, troubles neurologiques, anémies).

II-4- Les macroéléments et les microéléments

Ce sont des éléments minéraux purs nécessaires à la vie des organismes mais présents en très faibles quantités (macroéléments : sodium, magnésium, potassium, calcium, phosphore, silicium, chlore, soufre) ou sous forme de traces (microéléments : cobalt, nickel, manganèse, cuivre, zinc, iode, molybdène, sélénium, bore, fluor). Ils sont apportés à l'homme par l'alimentation et participent comme métalloprotéine, cofacteur ou hormone à de nombreuses fonctions métaboliques (fer : formation de l'hémoglobine, iode : synthèse des hormones thyroïdiennes).

II-5- Les protéines

Ils sont la source d'acides aminés essentiels mais aussi d'enzymes protéolytiques telles que la papaïne intervenant dans la digestion ou la bromélaïne qui est un anti-œdémateux.

II-6- Les composés phénoliques

Les composés possédant au moins un noyau phénolique ont souvent de puissantes propriétés antimicrobiennes liées à cette fonction. Consommés régulièrement, ils sont associés à une réduction du risque de maladies coronariennes, préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité, inhibent l'agrégation plaquettaire. Dans ce groupe sont retrouvés les tanins, les flavonoïdes et les lignanes.

Les tanins sont utilisés pour fixer les protéines des membranes biologiques (tannage des peaux en cuir). Ils possèdent des propriétés antiseptiques, astringents, anti-diarrhéiques, protecteurs et asséchants cutanés, vasoconstricteurs, protecteurs vasculaires, hémostatiques, piègeurs de radicaux libres, protecteurs des membranes cellulaires vis-à-vis de la fixation des virus, inhibiteurs enzymatiques.

Plus de 9000 flavonoïdes ont été retrouvés dans les plantes (Wang et al., 2011). Les flavonoïdes assurent la protection vasculaire, la protection des vaisseaux rétiniens microscopiques (les anthocyanes), sont des modulateurs de récepteurs oestrogéniques (isoflavones), anti-inflammatoires, antispasmodiques, diurétiques, hépatoprotecteurs, hypotenseurs, antiallergiques, antibactériens, antioxydants, protection membranaire, antiviraux (Nijveldt et al., 2001 ; Fowler et Koffas, 2009). Les flavonoïdes sont composés de différentes classes de composés : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les anthocyanidines, les chalcones et auronnes. La voie de biosynthèse des flavonoïdes est illustrée sur la figure 27.

Les lignanes sont antitumoraux, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, antioxydants et antiviraux (Hirano et al., 1994 ; Saleem et al., 2005 ; Pan et al., 2009). La podophyllotoxine traite les condylomes génitaux et ses dérivés hémisynthétiques sont utilisés en chimiothérapie infectieuse. C'est un pigment responsable de la coloration des végétaux.

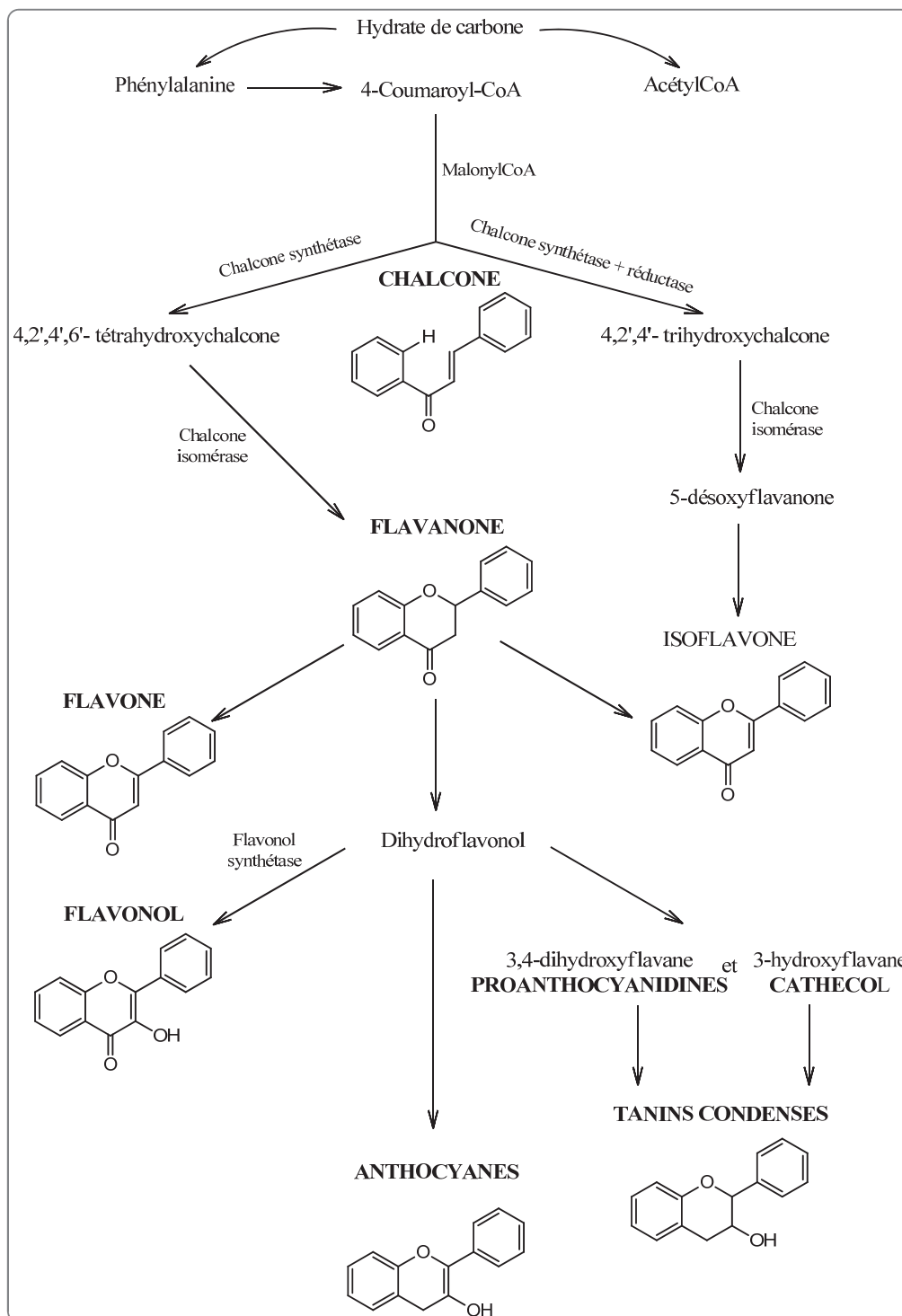
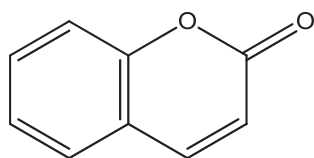


Figure 27 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996).

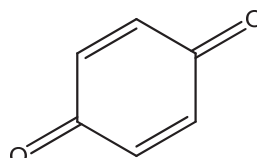
II-7- Les composés phénoliques oxygénés

On y classe les coumarines et les quinones. Les coumarines sont anti-inflammatoires et antioxydantes (Fylaktakidou et al., 2004) , anticancéreuses (Lacy et O'Kennedy, 2004), inhibitrices de protéases à sérine (Pochet et al., 2004). Leurs

dérivés, les dicoumarols sont des anticoagulants. Les quinones sont anticancéreuses, antioxydants et anti-inflammatoires (Dandawate et al., 2010 ; Lemos et al., 2007).



Coumarine



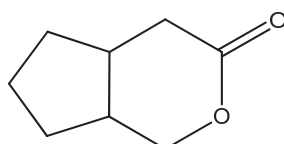
Quinone

II-8- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés aromatiques volatiles contenus dans la plante. Ils sont obtenus à partir de la biosynthèse des terpènes (isoprène) ou des phénylpropanes (acide salicylique) principalement. Ils sont antimicrobiens, mucolytiques, anti-infectieux antispasmodiques, analgiques, calmants en fonction des plantes dans lesquelles elles sont isolées.

II-9- Les iridoïdes

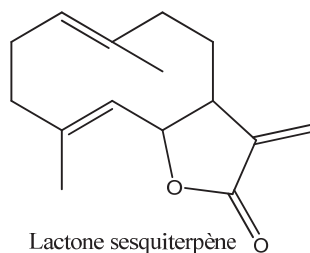
Ces métabolites secondaires sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentane. Ce sont de petites molécules pouvant traverser la barrière cutanée et sont donc souvent incorporées dans les préparations galéniques à usage cutané (crèmes, lotions et gels). Ce sont des tranquillisants, hypotensifs, stimulants. Ils sont également anti-purgatifs et immunoprotecteurs (Tundis et al., 2008), antibactériens et antifongiques (Dinda et al., 2009).

Iridoïde
Iridomyrmicine

II-10- Les lactones sesquiterpènes et diterpènes

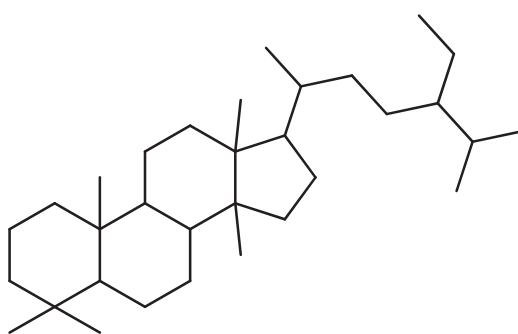
Les lactones sont des dérivés en C15 des sesquiterpènes. Elles donnent le goût amer de certaines plantes. Elles stimulent l'activité enzymatique hépatique et rénale et sont des anti-inflammatoires, antimigraineux, antipaludéens, antiprolifératifs (Pan et al., 2011), spasmolytiques et antiulcéreux (Repetto et Llesuy, 2002).

Les lactones diterpènes sont des dérivés des diterpènes en C20. Ils sont cholérétiques, mucolytiques, expectorants, analgésiques, antagonistes de la sérotonine.



II-11- Les structures stéroïdiennes

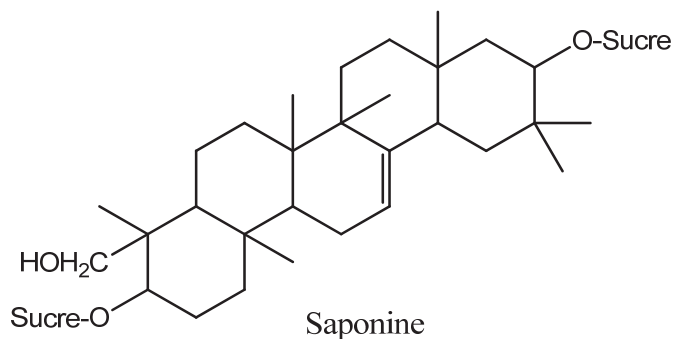
Ce sont des dérivés triterpéniques à trente atomes de carbone. Ils ont un rôle protecteur vis-à-vis des microorganismes, une activité anti-inflammatoire, antivirale et tonocardiaque.



Stéroïde

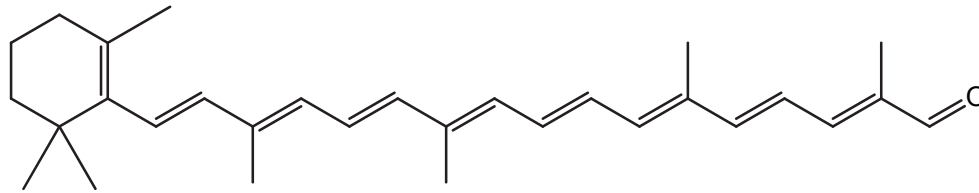
II-12- Les saponosides

Les saponosides ou saponines confèrent aux plantes des propriétés moussantes. Ils ont de multiples propriétés : tensioactifs, antibiotiques, antifongiques, antiviraux, expectorants, immunostimulants, antispasmodiques, anti-inflammatoires, anti-œdémateux, anti-exsudatifs, stimulants, hypocholestérolémiants, cicatrisants, adaptogènes et entrent dans la synthèse des hormones stéroïdiennes (Guclu-Ustundag et Mazza, 2007 ; Osbourn et al., 2011).



II-13- Les caroténoïdes

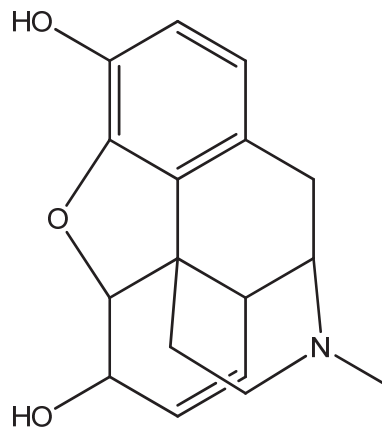
Ce sont des pigments végétaux intervenant en tant que ; molécules photoprotectrices et possèdent des propriétés préventives dans certains cancers (Walter et Strack, 2011). Les capsaïcinoïdes leur sont apparentés et jouent un rôle analgésique au niveau des récepteurs de la nociception.



Caroténoïde
Apocaroténal

II-14- Les alcaloïdes

Ils sont considérés comme les molécules les plus actives du monde végétal. Ce sont des composés organiques azotés (morphine, éphédrine, strychnine, scopolamine, nicotine) qui servent à la défense du végétal et sont souvent responsables de la toxicité de la plante. Ils interviennent au niveau du système nerveux central, sont anesthésiants, curarisants, hypertenseurs, antihypertenseurs, antipaludéens, anticancéreux, anxiolytiques, sédatifs, antispasmodiques. Certains alcaloïdes pyrrolizidiniques sont hépatotoxiques, et cancérigènes.



Alcaloïde
Morphine

III- Les plantes médicinales testées sur des bactéries intestinales

Quatorze plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise ont été étudiées. Elles sont illustrées sur la figure 28 et le tableau XIV résume les familles auxquelles elles appartiennent, la partie de la plante utilisée dans cette étude et quelques-unes de leurs indications thérapeutiques.

Tableau XIV : Plantes étudiées, leurs familles, la partie utilisée dans cette étude ainsi qu'une liste non-exhaustive des principales indications thérapeutiques.

Nom de la plante	Famille	Partie utilisée	Quelques indications
<i>Boerhavia diffusa</i>	NYCTAGINACEAE	Ecorces	Diurétique, laxative, antimycotique
<i>Boswellia dalzielii</i>	BURSERACEAE	Ecorces	Antischistosomes, multiusage
<i>Chromolaena odorata</i>	ASTERACEAE	Feuilles	Gastroentérite, multiples usages
<i>Crateva religiosa</i>	CAPPERACEAE	Feuilles	Pathologies digestives,
<i>Croton lobatus</i>	EUPHORBIACEAE	Feuilles	Antipaludéen,
<i>Delonix regia</i>	CAESALPINIACEAE	Ecorces	Gastroentérite,
<i>Ficus exasperata</i>	MORACEAE	Ecorces	Pathologies gastrointestinales
<i>Flacourtia flavescens</i>	FLACOURTIACEAE	Feuilles	Anémies, diarrhées, troubles psychiques, maux de dents
<i>Lantana camara</i>	VERBENACEAE	Feuilles	Jaunisse, fièvre, blessure
<i>Nauclea latifolia</i>	RUBIACEAE	Feuilles	Arthrite, malaria
<i>Schrankia leptocarpa</i>	MIMOSACEAE	Feuilles	Paludisme, hypertension
<i>Thalia geniculata</i>	MARANTACEAE	Feuilles	Paludisme
<i>Vernonia amygdalina</i>	ASTERACEAE	Feuilles	Toux, maladies de la peau, asthme
<i>Voacanga africana</i>	APOCYNACEAE	Ecorces	Caries, toux



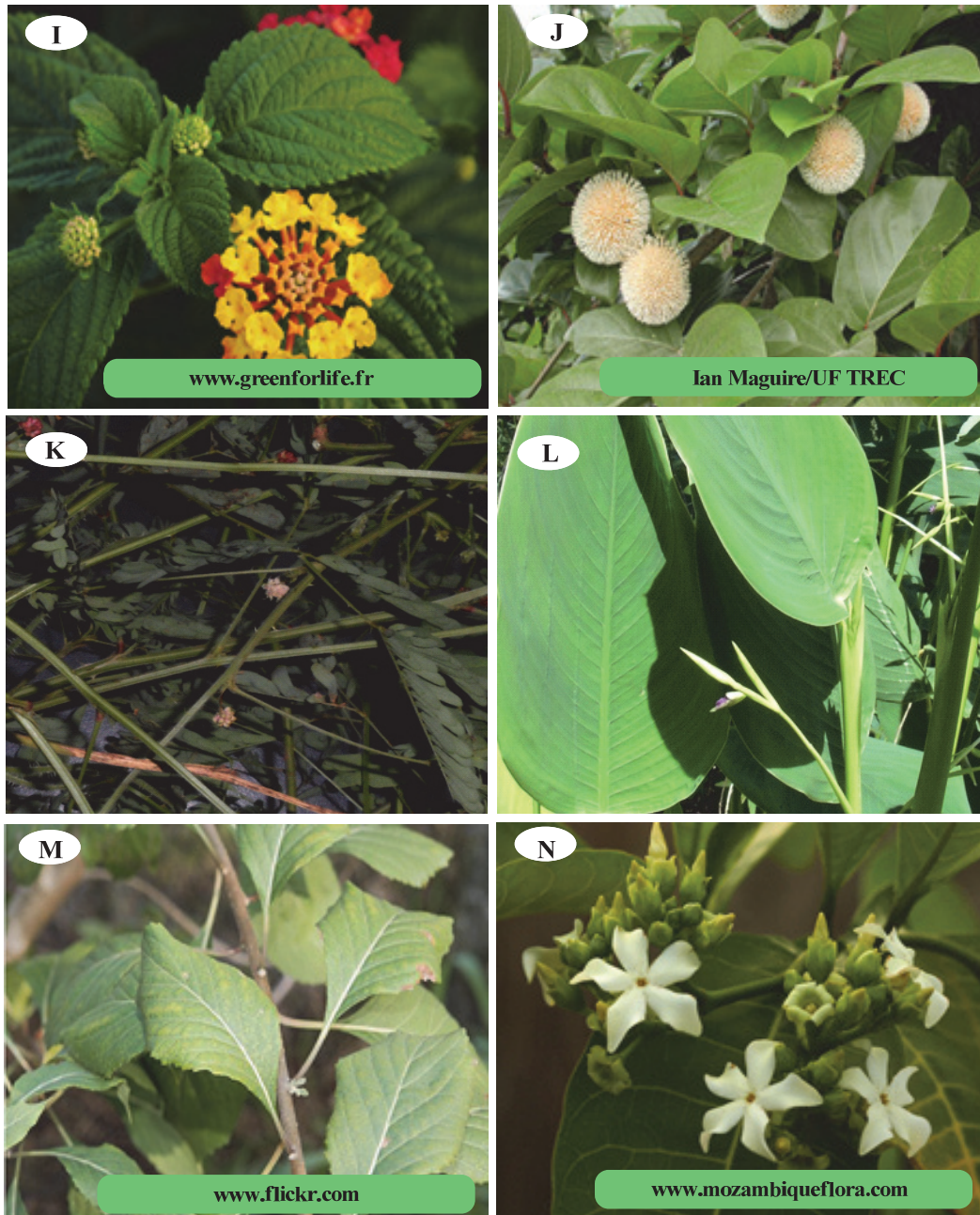


Figure 28 : Quelques plantes médicinales utilisées dans le traitement de pathologies intestinales.

A : *Boerhavia diffusa* ; **B** : *Boswellia dalzielii* ; **C** : *Chromolaena odorata* ; **D** : *Crateva religiosa* ; **E** : *Croton lobatus* ; **F** : *Delonix regia* ; **G** : *Ficus exasperata* ; **H** : *Flacourtia flaversens* ; **I** : *Lantana camara* ; **J** : *Nauclea latifolia* ; **K** : *Schrankia leptocarpa* ; **L** : *Thalia geniculata* ; **M** : *Vernonia amygdalina* ; **N** : *Voacanga africana*

- ***Boerhavia diffusa* Linn 1753**

Elle appartient à la famille des nyctaginacées et est citée comme diurétique, anti-inflammatoire, cardiotonique, laxative (Schmelzer et al., 2008). De nombreux travaux ont porté sur l'étude des propriétés thérapeutiques de *Boerhavia* et ont montré qu'elle possède une activité antiurologique, un effet antiprolifératif, anti-oestrogénique et est susceptible d'être utilisée dans le traitement des cancers du sein (Sreeja et Sreeja, 2009). Elle a également des activités antifongiques sur des champignons responsables d'infections dermatologiques. Un alcaloïde isolé de *Boerhavia*, la punarnavine, a montré un effet antimétastatique et des effets immunomodulateurs (Manu et Kuttan, 2009).

- ***Boswellia dalzielii* Hutch**

C'est un arbre de la famille des burseracées présent en Afrique sahélienne et en Asie principalement. *Boswellia* est cité pour de multiples usages parmi lesquelles les maladies gastro-intestinales, la syphilis, la fièvre (Arbonnier, 2009). Des études de Mwingli montrent que *Boswellia* réduit la motilité intestinale (Nwinyi et al., 2004). Cette activité serait probablement due à la présence de flavonoïdes, de tanins et de saponines qui sont des antagonistes des récepteurs muscariniques et histaminiques (Hassan et al., 2009). D'autres études ont montré que *Boswellia* ne présente pas d'activité antimicrobienne sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, pour des concentrations inférieures ou égales à 2 mg/ml (Nwinyi et al., 2004), mais un effet laxatif et une activité antibactérienne ont été retrouvés sur *E. coli* pour une CMI de 0,5 mg/ml (Kubmarawa et al., 2006) et sur les souches de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de l'ordre de 2,5 mg/ml (Anago et al., 2011). Une autre étude a montré que *Boswellia* possède des propriétés toxiques importantes pour des doses répétitives de 2700 mg/ml chez les rats *in vivo*.

- ***Chromolaena odorata* L. (King et Robinson)**

C'est une herbe appartenant à la famille des astéracées. En médecine traditionnelle, elle est citée pour de multiples usages. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires (Owoyele et al., 2005), antifongiques (Ngono Ngane et al., 2006), immunomodulatrices (Taleb-Contini et al., 2006), antiradicalaires et antioxydantes, (Weniger et al., 2004 ; Akinmoladun et al., 2007 ; Srinivasa Rao et al., 2009) et les fleurs de *Chromolaena* ont une activité antimycobactérienne sur *Mycobacterium tuberculosis* et cytotoxique sur des cellules cancéreuses humaines (Suksamrarn et al., 2004). D'autres études ont montré que *Chromolaena odorata* a également une activité cytotoxique sur des cellules tumorales *in vitro* (Hung et al., 2011).

- ***Crateva religiosa* Forst 1786**

Elle appartient à la famille des capparacées. Elle est traditionnellement utilisée pour soigner les maladies intestinales. Elle est également citée pour être un hypotenseur, déparasitant, anti-douleur et anti-infectueux. Des travaux ont montré son activité antifongique sur des espèces de *Candida* avec des concentrations inhibitrices allant de 0.062 mg à 0,5 mg par diffusion sur gélose (Sahoo et al., 2008). Un composé isolé de *Crateva religiosa*, le lupéol, un triterpénoïde est impliqué dans l'immunité par son action sur les lymphocytes T (Bani et al., 2006).

- ***Croton lobatus* Linn**

C'est une euphorbiacée utilisée en médecine traditionnelle pour de multiples maladies entre autres dans les ulcères, les maladies de la peau, les maux de tête, pour les risques d'avortement, comme purgatif (Schmelzer et al., 2008). Peu d'études portent sur *Croton lobatus*. Elle présente aussi une activité antiplasmodiale (Weniger et al., 2004).

- ***Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf., 1837**

C'est un arbre de la famille des Césalpinacées universellement connu sous le nom de flamboyant. Il est utilisé comme, vermifuge, dans le traitement de la fièvre et des douleurs (Arbonnier, 2009). Des études ont montré que c'est un inhibiteur de protéases à sérine (Pando et al., 2001).

- ***Ficus exasperata* Vahl**

Elle appartient à la famille des moracées. Elle est utilisée comme vermifuge, dans le traitement des maux d'estomac, des infections urinaires, des affections de la peau (www. Prota.org). Des tests ont montré son activité antiarthritique et antioxydant (Abotsi et al., 2010) et son potentiel dans le traitement dans des ulcères.

- ***Flacourtia flavescens* Willd**

Elle appartient à la famille des flacourtiacées ; elle est utilisée dans le traitement des diarrhées et la dysenterie (plants.jstor.org). Son activité antiplasmodiale a été démontrée *in vitro* (Agassounon Djikpo-Tchibozo et al., 2010), ainsi que son activité antibactérienne sur des souches de référence de *E. faecalis*, *S. aureus* et *E. coli* (Anago et al., 2011).

- ***Lantana camara* linn 1753**

L. camara appartient à la famille des verbénacées. Elle est traditionnellement utilisée dans les cas de pneumopathie, de fièvre et les maladies de la peau. Son activité antibactérienne a été étudiée (Barreto et al., 2010), ainsi que ses propriétés

anticancéreuses (Bisi-Johnson et al., 2011) et son implication dans le traitement des ulcères gastriques et duodénaux (Sathish et al., 2011).

- ***Nauclea latifolia* Smith**

De la famille des rubiacées, elle est utilisée en tradithérapie pour le traitement du paludisme, en tant qu'anti-parasitaire et en usage externe (www.africa.plants). Ses propriétés anti-diarrhéiques ont été étudiées (Owolabi et al., 2010), ainsi que son activité antipyrétique, et antinociceptif (Taiwe et al., 2011) et anti-malarique (Abbah et al., 2010).

- ***Schrankia leptocarpa* DC**

C'est une mimosacée utilisée dans le traitement de la fièvre, du paludisme. Des études ont montré son activité anti-malarique (Weniger et al., 2004).

- ***Thalia geniculata* Linn**

C'est une marantacée surtout utilisée dans le traitement du paludisme. Peu de travaux portent sur *Thalia*.

- ***Vernonia amygdalina* Delile**

C'est un arbuste de la famille des astéracées. Il est très utilisé en médecine traditionnelle notamment pour le traitement des vers intestinaux, des colites, des hépatites et du paludisme (Boullard, 2001). Il a été également montré des propriétés antioxydantes (Farombi et Owoeye, 2011), anti-helminthiques (Ademola et Eloff, 2011) et anticancéreuses (Muraina et al., 2010).

- ***Voacanga africana* Stapf**

Voacanga africana une apocynacée citée dans les cas de diarrhées, d'ulcères d'estomac et de vers intestinaux. Des études ont montré ses propriétés anticonvulsives (Bum et al., 2009) et anticancéreuses (Tan et Nyasse, 2000) probablement par l'inhibition des récepteurs H2 de l'histamine.

Chapitre V : Les maladies intestinales

Ce chapitre porte sur la physiopathologie intestinale. Après une brève description anatomique de l'intestin, nous présenterons le système immunitaire intestinal et les pathologies intestinales, les souches bactériennes utilisées dans notre étude et les cellules BON qui dérivent des tumeurs carcinoïdes de l'intestin et représentent le modèle d'étude cellulaire que nous avons utilisé. La dernière partie portera sur les traitements actuels des maladies intestinales infectieuses et leurs limites.

I- L'intestin

L'intestin est un organe très important. Au plan anatomique, le tube digestif comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) puis le gros intestin (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde puis le rectum) comme le montre la figure 29. Chez l'Homme, l'intestin est la partie du tube digestif qui est située entre l'estomac et l'anus et se compose de deux parties : le gros intestin et l'intestin grêle.

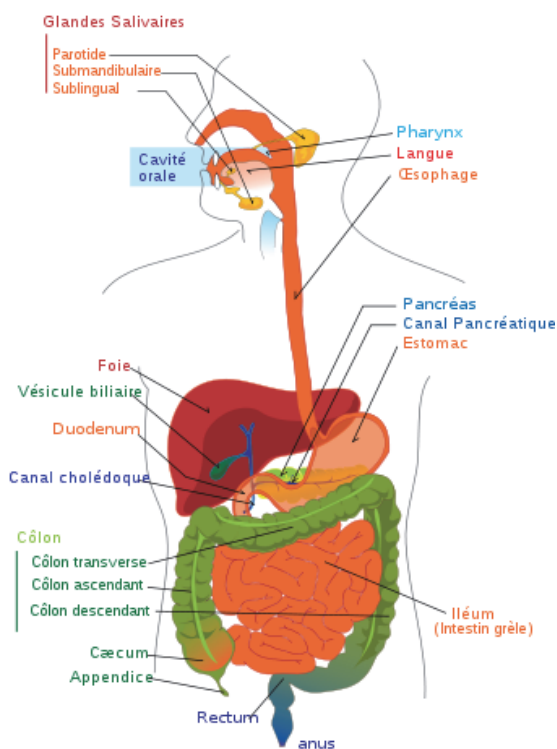


Figure 29 : Schéma de l'appareil digestif humain (Wikipedia.org).

L'observation histologique de l'intestin montre qu'il est composé de 4 couches concentriques représentées sur la figure 30.

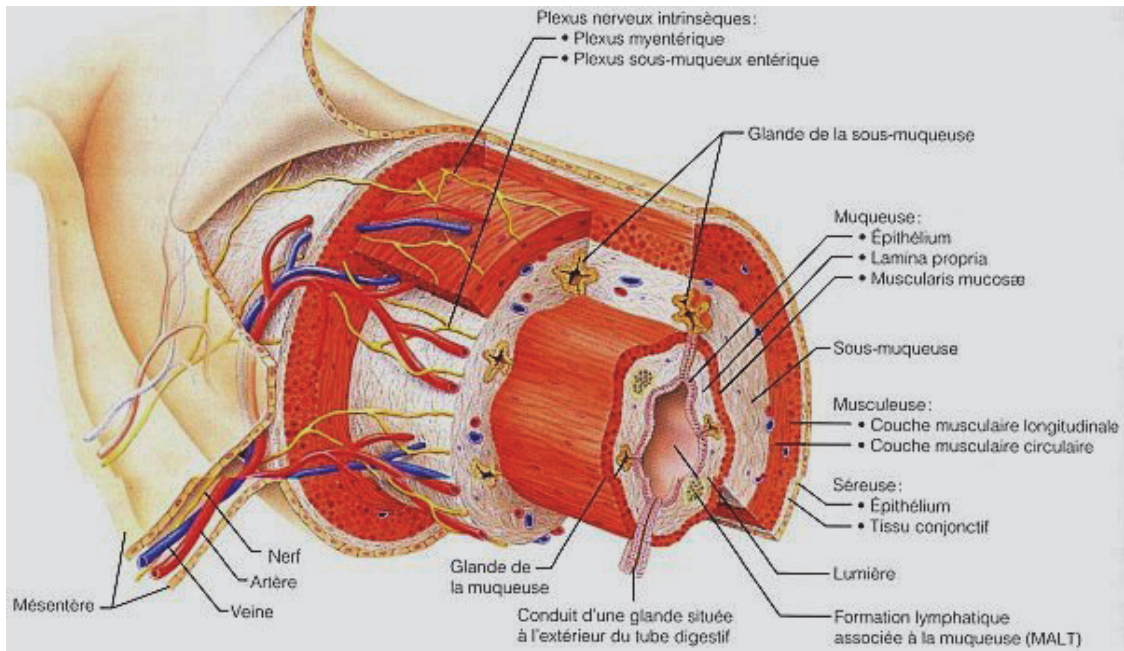


Figure 30 : Structure de la paroi du tube digestif.

De l'extérieur vers l'intérieur, 4 couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (<http://app-asap.over-blog.com/>).

- La muqueuse

Elle se compose d'un épithélium de revêtement, du chorion et de la muqueuse musculaire. Elle est recouverte d'une couche de mucus qui protège l'épithélium de l'érosion mécanique des aliments et de l'action destructrice des enzymes hydrolytiques du suc gastrique. L'épithélium de revêtement s'invagine pour former les glandes qui transportent les sécrétions du foie au pancréas à travers la paroi du tube digestif jusqu'à la lumière intestinale. Le chorion ou *lamina propria* est formé d'îlots lymphoïdes et de cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes, les plasmocytes et les macrophages. C'est un site important pour les réactions immunitaires. La musculuse muqueuse est une fine couche de muscles lisses contrôlée par le système nerveux.

- ❖ La sous-muqueuse

Elle se caractérise par la présence d'un tissu conjonctif lâche qui contient des follicules lymphatiques individuels et des follicules lymphatiques agrégés, les plaques de Peyer qui sont responsables de la tolérance immunitaire et de la défense contre les pathogènes (Jung et al., 2010).

- ❖ La musculuse

Elle est constituée d'une couche circulaire interne et d'une couche longitudinale externe et est responsable de la segmentation et du mouvement du contenu de l'intestin grêle (Kierszenbaum, 2006).

❖ la séreuse ou adventice

C'est la couche intestinale la plus périphérique. Elle est recouverte du péritoine viscéral.

I-1-L'intestin grêle

L'intestin grêle se compose du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. Il dispose d'une grande surface d'absorption des nutriments, évaluée à plus de 200 m², qui est augmentée par les de plis circulaires, les villosités intestinales, les microvillosités et les glandes qui recouvrent ses parois (Figure 31).

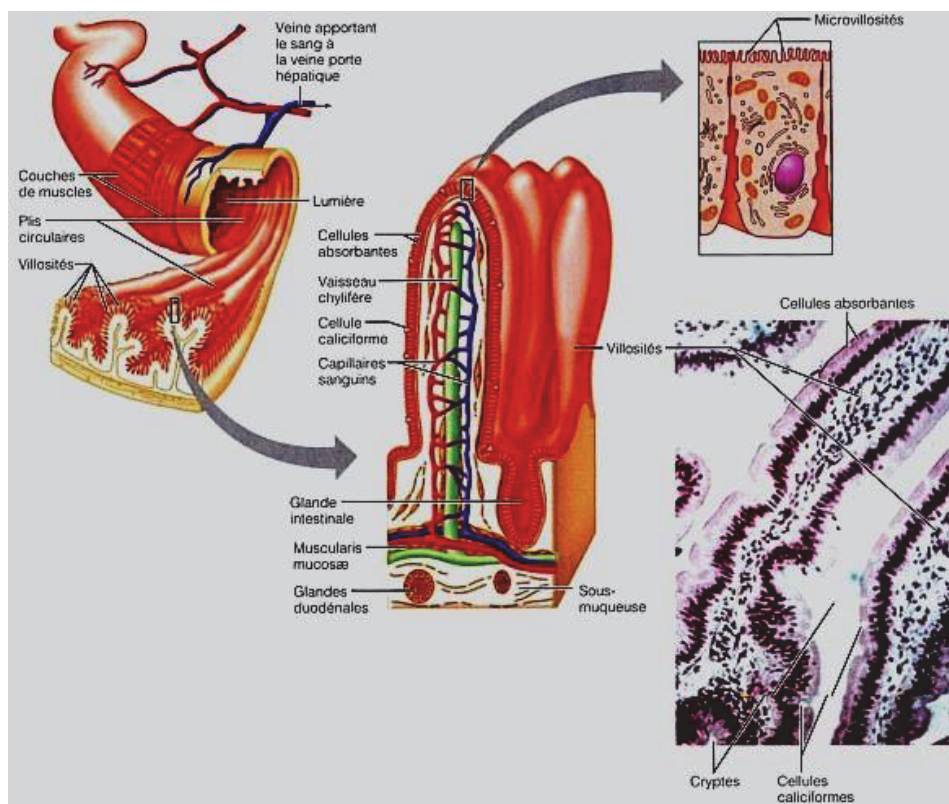


Figure 31 : Structure des modifications de la paroi de l'intestin.

Les plis, villosités, microvillosités et glandes augmentent la surface d'absorption de l'intestin (<http://app-asap.over-blog.com/>).

- ❖ Les plis circulaires observés à l'intérieur de l'intestin grêle se composent de replis profonds et permanents de la muqueuse. Ces replis circulaires contribuent à l'absorption totale des nutriments par la muqueuse intestinale.
- ❖ Les villosités intestinales présentent un grand nombre de capillaires sanguins et de capillaires lymphatiques.
- ❖ Les microvillosités sont de minuscules structures en forme de saillie, constituées par la membrane plasmique des cellules permettant l'absorption

des micronutriments. Ces microvillosités portent le nom de bordure en brosse. Elles augmentent la surface d'absorption et jouent un rôle dans la régulation du système de signalisation à la périphérie des cellules riches en protéines membranaires (Lange, 2011).

❖ Les glandes intestinales

- Les glandes de Lieberkühn : elles sont situées à la surface de la muqueuse de l'intestin grêle. Elles sécrètent le suc intestinal servant à transporter les micronutriments. Au fond des glandes se retrouvent les cellules de Paneth qui libèrent le lysozyme, protéine antibactérienne protégeant l'intestin grêle contre les infections (Peeters et Vantrappen, 1975).
- Les glandes de Brunner se localisent au niveau du duodénum. Elles sont riches en bicarbonate utile pour combattre l'acidité.

Les glandes augmentent la capacité sécrétoire de la muqueuse et des cellules constituant les villosités qui augmentent la capacité d'absorption du tube digestif. Elles produisent un gel visquo-élastique qui lubrifie la muqueuse du tractus intestinal proximal. Ce gel se compose d'un mucus riche en mucines, des glycoprotéines riches en bicarbonate ayant pour rôle de protéger l'intestin contre l'acidité gastrique, les enzymes pancréatiques et autres agents tensio-actifs (Krause, 2000).

I-2-Le gros intestin

Le gros intestin est composé du cæcum, du côlon (côlon transverse, gauche et sigmoïde) et du rectum. Le côlon qui produit les matières fécales, contient une très grande quantité de bactéries, la flore bactérienne naturelle à majorité anaérobie (10¹⁴ bactéries de 400 à 500 espèces différentes) (Good, 1953 ; Simon et Gorbach, 1984). Le côlon peut-être le siège de nombreuses pathologies comme les diarrhées, les colites, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, le cancer du côlon...

Tout comme l'intestin grêle, le gros intestin est recouvert de l'épithélium intestinal qui se renouvelle tous les 4 à 5 jours chez l'Homme. Le gros intestin ne comporte pas de villosités contrairement à l'intestin grêle, mais uniquement des invaginations profondes appelées cryptes du gros intestin.

L'intestin grêle et le gros intestin contiennent plusieurs types de cellules illustrées à la Figure 32. Ces cellules jouent également un rôle dans le système immunitaire intestinal.

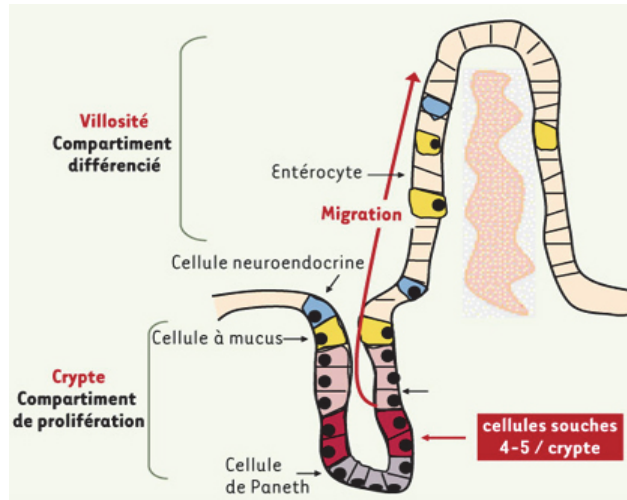


Figure 32 : Cellules de l'intestin grêle (Andreu et al., 2006).

II- Le système immunitaire intestinal

II-1- les cellules de l'intestin

- Les cellules souches

Elles sont localisées dans le fond des cryptes au-dessus des cellules de Paneth (Cheng, 1974 ; Freeman, 2008). Ce sont des cellules pluripotentes à l'origine des différents types cellulaires présents dans l'épithélium et participent au renouvellement des cellules de l'épithélium. Les cellules filles issues des cellules souches activées, lors de leur migration le long des cryptes, deviennent matures et acquièrent ainsi leurs fonctionnalités.

- Les entérocytes

Ce sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium (80%). Elles limitent l'entrée des grosses molécules et assurent l'absorption. Sur le pôle apical des entérocytes, on observe des microvillosités qui sont recouvertes de glycoprotéines membranaires, le glycocalyx, de nombreuses enzymes hydrolytiques et qui constituent la bordure en brosse (Horiuchi et al., 2005). Les entérocytes sont également capables de produire des cytokines comme IL-6,7 ou 8, TNF- α et des peptides antimicrobiens comme les β -défensines.

- Les cellules de Paneth

Elles sont localisées à la base des cryptes et ont un renouvellement lent. Les cellules de Paneth possèdent une activité sécrétoire intense de produits à activité antimicrobienne comme le lysozyme ou les défensines (Porter et al., 2002). Ces sécrétions interviennent dans l'immunité innée en contrôlant la flore bactérienne

naturelle et pathogène. Les fonctions des cellules de Paneth dans le maintien de la flore microbienne naturelle de l'intestin, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou la défense contre les microorganismes pathogènes sont explicitées dans une revue (Bevins et Salzman, 2011).

- Les cellules M (Microfold cells)

Ce sont des cellules spécialisées qui recouvrent les îlots lymphoïdes et les plaques de Peyer. Elles ont un rôle essentiellement immunitaire car elles transportent les antigènes endoluminaux par endocytose et les transfèrent aux cellules immunitaires qui vont les présenter aux lymphocytes B (Mowat, 2003). En 2007, une revue a résumé les connaissances sur les cellules M (Miller et al., 2007).

- Les cellules neuroendocrines ou entérochromaffines

Plusieurs types de cellules endocrines sont répartis tout au long du tube digestif. Elles expriment des marqueurs de différenciation neuronale. Exemple des cellules D sécrétant la somatostatine et des cellules G contenant la gastrine. Ces cellules sont très étudiées et sont impliquées dans la dérégulation hormonale observée dans de nombreuses maladies du tractus digestif (Spiller, 2008). Les cellules entérochromaffines sont disposées le long de l'épithélium et sont peu abondantes. Elles sont spécialisées dans la synthèse des médiateurs locaux tels que la sérotonine, la sécrétine, la neurotensine... et des protéines biologiquement actives (chromogranines, *Nerve Growth Factor*). Les produits de sécrétion sont stockés dans des granules et sont libérés par exocytose. Certains de ceux-ci comme les peptides obtenus par maturation de chromogranines interviennent dans les réactions immunitaires.

- Les cellules caliciformes

Elles sont encore appelées cellules en gobelet (*Goblet cells*) ou cellules à mucus. Ce sont des cellules fortement polarisées et disséminées entre les entérocytes. Ces cellules sécrètent un mucus (composé de mucine et de glycoprotéines) qui permet de maintenir la muqueuse lubrifiée et qui joue un rôle protecteur de la muqueuse intestinale (Kim et Ho, 2010). Les cellules caliciformes sécrètent également des peptides en forme de trèfle (*Trefoil peptides*). Ce sont des peptides qui possèdent trois ponts disulfures et qui résistent à l'action des enzymes gastriques comme la pepsine. Ils jouent un rôle important pour la réparation de l'épithélium gastrique et favorisent la migration des cellules de l'épithélium.

Les cellules caliciformes, neuroendocrines, les cellules M et les entérocytes sont également retrouvés dans les villosités intestinales.

II-2- Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin

Pour se défendre, l'organisme utilise le système immunitaire. Il existe également un système immunitaire intestinal spécifique de la défense de l'intestin. Ce système désigné par le nom de GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) est constitué des follicules, des plaques de Peyer et des lymphocytes T et B. Le GALT fonctionne comme une frontière immunitaire en dépendance étroite avec l'épithélium de recouvrement. Les lymphocytes T sécrètent des IgA, IgG, IgM et les lymphocytes B sécrètent une IgA spécifique de l'intestin. Les IgA interviennent dans la lutte contre les pathogènes et la tolérance immunitaire. Les IgE se fixent aux mastocytes et provoquent la libération d'histamine, de sérotonine et de bradykinine (Frexinos, 2004). La flore intestinale a une action importante sur le taux d'IgG et IgA mais elle n'influe pas sur le taux d'IgM (Wostmann et Pleasants, 1991). Les lymphocytes intra-épithéliaux assurent l'intégrité de l'épithélium intestinal en détruisant les entérocytes infectés et anormaux.

L'immunité intestinale met en jeu plusieurs lignes de défense (Figure 33).

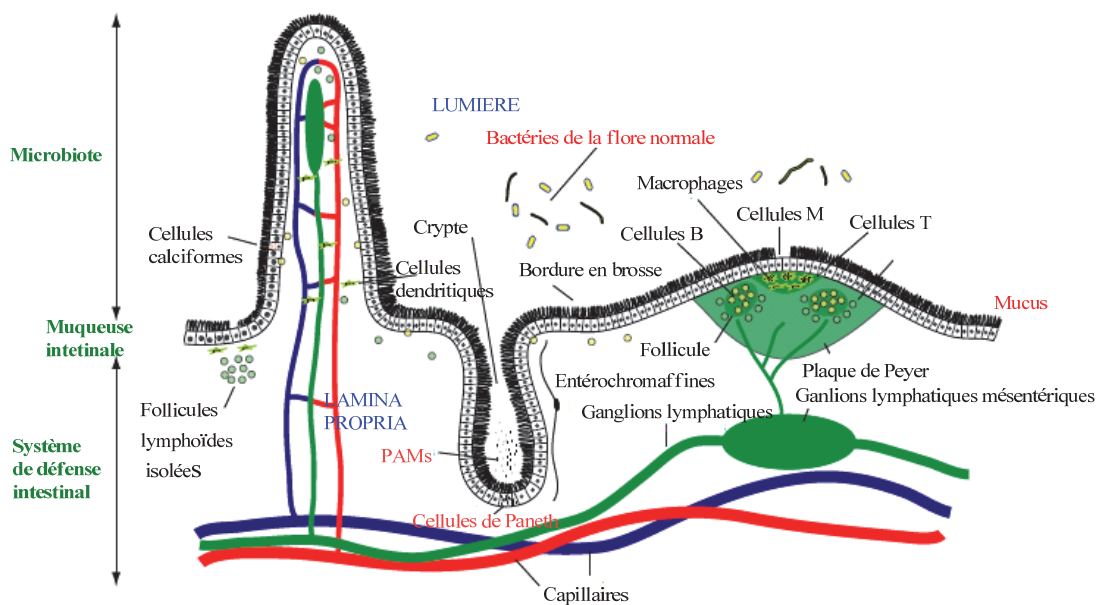


Figure 33 : Immunité innée intestinale (Metz-Boutigue et al., 2010).

Plusieurs acteurs interviennent : le mucus, les cellules de Paneth sécrétant des peptides antimicrobiens, la flore naturelle intestinale et les lymphocytes B et T (Metz-Boutigue et al., 2010).

Le mucus est une barrière anatomique qui empêche la pénétration des germes. De plus, les bactéries commensales sécrètent des protéines antibactériennes, les colicines et elles assurent des fonctions métaboliques comme la fermentation (Collier-Hyams et Neish, 2005), des fonctions trophiques sur la muqueuse intestinale par prolifération et différenciation et sur le développement du système immunitaire local (Van Gossum, 2007). Les cellules de Paneth sécrètent aussi des

protéines et peptides antibactériens en général cationiques telles que les défensines. Les lymphocytes T et B participent aux réactions immunitaires décrites dans le chapitre I.

Les cellules épithéliales intestinales en surface luminale ont peu de *Toll Like Receptors* (TLRs). Leur expression est déclenchée lorsque les pathogènes attaquent la cellule. Par l'intermédiaire des TLRs, les entérocytes reconnaissent les composants bactériens et activent la voie de signalisation des NFκB.

Une autre fonction du SII est la tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes et des composants bactériens présents de façon permanente dans le tube digestif, par la mise en place de réponses de suppression. Ces mécanismes protègent des réactions inflammatoires de la muqueuse et participent à l'homéostasie de l'intestin (Hill et Artis, 2010 ; Masuda et al., 2011).

Lorsqu'une de ces fonctions est inefficace, il y a apparition des pathologies intestinales.

III- Les pathologies intestinales infectieuses

Un grand nombre de pathologies concerne l'intestin (plus de 800 selon l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD)). Ses pathologies sont la première cause d'hospitalisation en France selon l'IMAD en 2009 et la troisième en Afrique selon l'OMS. Elles regroupent en grandes parties des maladies infectieuses et des des maladies inflammatoires pouvant conduire au cancer (Tableau XV).

Tableau XV : Exemple de quelques maladies de l'intestin

Maladies infectieuses et parasitaires	Maladies inflammatoires et cancer
Diarrhée, gastro-entérite, choléra, vers intestinaux, turista, amibiase	Rectocolite hémorragique, maladie de Crohn, Cancer du côlon

III-1- Les pathologies intestinales infectieuses

Dans le cadre de notre thèse sur les maladies intestinales infectieuses, nous avons étudié quatre souches de bactéries induisant des diarrhées.

III-1-1- Généralités sur les bactéries

❖ Caractérisation des bactéries intestinales

Le tube digestif héberge des microorganismes dans tous les compartiments qui le composent, mais la plus grande quantité est située dans le côlon.

L'étude de cette flore débute en 1885 avec la description des méthodes de culture sélective de *Bacterium coli communior* par Theodor Escherich (1857-1911). Mais, la

microbiologie digestive ne connaît son essor que dans les années 1970 avec la mise au point des conditions de culture en anaérobiose par les travaux de Hungate puis Freter (Hungate, 1967 ; Freter, 1974). Les techniques de microbiologie classique ne permettent d'identifier que la flore microbienne dominante. Cependant de nos jours, les techniques basées sur l'analyse moléculaire des ADN et ARN 16S ribosomiques et les études électrophorétiques ont permis de mettre à jour une immense diversité du monde microbien intestinal (Rambaud et al., 2004). La flore normale peut se définir comme l'ensemble des espèces présentes naturellement dans l'écosystème, assurant des relations symbiotiques avec l'hôte. La flore intestinale est très diversifiée et varie d'un individu à un autre. Cependant, elle est relativement stable chez un individu donné dans les conditions normales. Elle peut être influencée par l'alimentation ou par des traitements antibiotiques. On peut distinguer une flore endogène résidente ou autochtone et une flore de transit ou allochtone. Dans le duodénum et le jéjunum, la flore est de 10^4 à 10^6 UFC/g. Dans l'iléon elle est de 10^5 à 10^7 UFC/g (Unité formant colonie).

L'analyse morphologique des bactéries montre qu'elles sont composées de plusieurs structures (Figure 34).

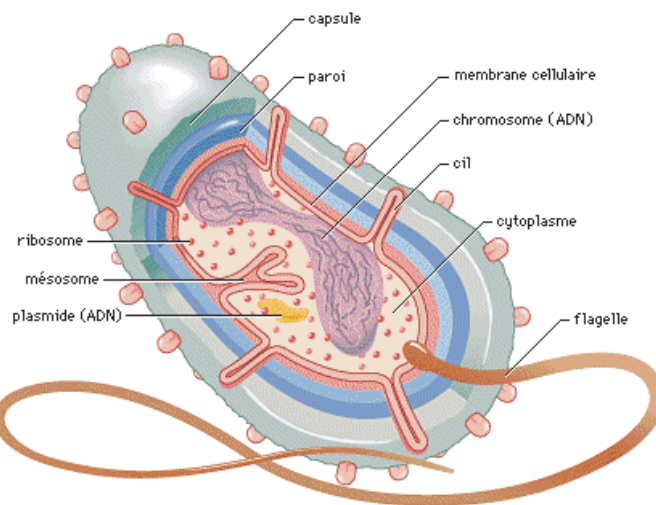


Figure 34 : Structure des bactéries (<http://croissbact.free.fr/bacterie.php> 5 juillet 2012).

- Le cytoplasme : contient les composés de réserve et les ribosomes qui sont les organelles de la synthèse protéique.
- La membrane cytoplasmique : elle est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées les protéines.
- La paroi cellulaire : elle protège les bactéries des agents nocifs, de la pression osmotique, donne sa forme à la bactérie et permet la communication avec le monde extérieur.
- La capsule : elle protège la bactérie de la phagocytose et est essentiellement composée de polysaccharides

- Les flagelles : permettent aux bactéries de se déplacer activement
- Les fimbriae sont des structures d'adhésion de la bactérie aux récepteurs des cellules hôtes
- Les pilis sexuels : chez les Gram-, elles relient les bactéries et participent aux transferts d'éléments génétiques.
- Les bactéries peuvent également former des spores qui sont des formes végétatives très résistantes aux agents nocifs ou des biofilms qui sont un ensemble de cellules enveloppées d'une matrice de polymères de monosaccharides glucidiques qu'elles produisent. Ce sont les glycocalyx.

Il existe quatre types de paroi bactérienne : la paroi des bactéries à Gram+, à Gram-, les mycobactéries et les spirochètes.

La paroi cellulaire est composée de la muréine. C'est un polymère de polysaccharides reliés par des peptides et elle englobe totalement la cellule. Chez les Gram- que nous étudions, elle est également composée d'une membrane externe qui joue le rôle d'une barrière. La paroi des Gram- est illustrée par la figure 35.

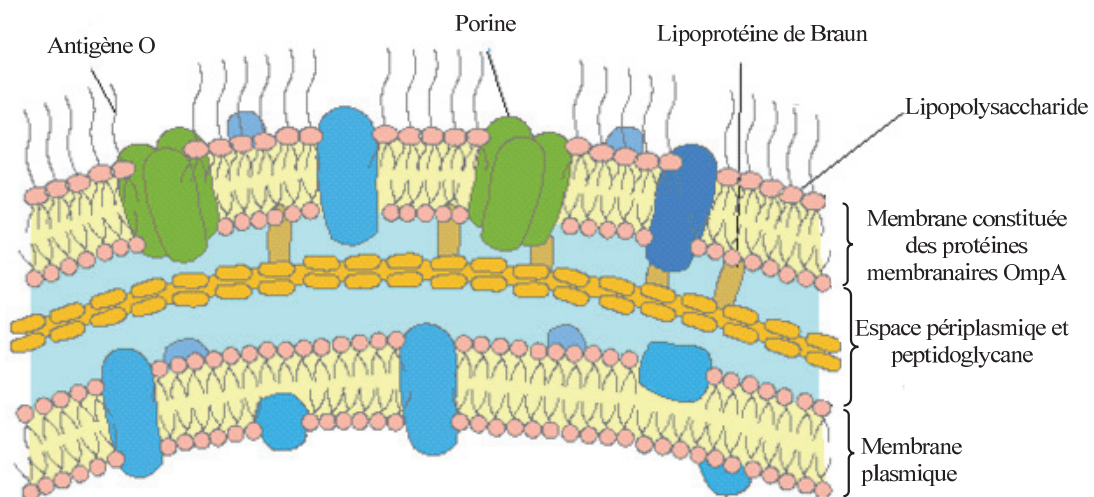


Figure 35 : Structure de la paroi des Gram négatifs.

Cette membrane externe est constituée par les protéines membranaires de l'OmpA (*Outer membrane protein*) et de la lipoprotéine de Braun reliant la membrane externe à la muréine, les Omps qui sont responsables du transport de l'extérieur vers l'intérieur, les protéines d'adhésion aux récepteurs des cellules hôtes, les porines permettant le passage de substances hydrophiles et de lipopolysaccharides.

Les lipopolysaccharides aussi appelées endotoxines, sont composés du lipide A (une partie hydrophobe et une partie hydrophile), responsable de l'activité toxique et stimulant la synthèse et la sécrétion des cytokines (Bishop et al., 2005) et de la

chaîne polysaccharide spécifique O ou antigène O, à l'origine des différents sérotypes pour un genre donné (Reeves, 1995).

❖ Implication des bactéries intestinales dans les pathologies infectieuses

Les bactéries de la flore normale sont en général bénéfiques pour l'hôte, mais un déséquilibre peut provoquer une invasion d'un type de bactéries ou laisser pénétrer des bactéries pathogènes.

Les bactéries pathogènes induisent chez l'hôte :

- La production d'enzymes lysosomiales qui détruisent la couche de peptidoglycane
- La production de protéines cationiques et le complément qui attaquent la membrane lipidique externe des Gram-
- La production d'anticorps

La plupart des bactéries possèdent un pouvoir d'invasion par la production des toxines (action locale) et des enzymes (facteur de diffusion) dégradant les tissus.

Dans certains cas, la diarrhée résulte de l'action des facteurs bactériens de virulence sur les cellules de l'hôte. Ces interactions ont pour résultat d'altérer la physiologie intestinale normale, provoquant une perte nette de liquide, soit par une déviation de l'équilibre du flux d'eau et des électrolytes au niveau de l'intestin grêle, soit par une altération, voire une destruction, de la muqueuse elle-même. Un pourcentage important de maladies diarrhéiques est dû à des bactéries entéropathogènes capables de coloniser ou d'envahir la muqueuse intestinale et éventuellement, d'y produire une ou plusieurs toxines (Demers et Sansonetti, 1997).

Dans notre étude, nous avons travaillé avec 4 souches bactériennes qui causent des diarrhées : *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera*. Ce sont des agents pathogènes qui ont été mis en évidence par examen microbiologique des selles de patients atteints de diarrhées à l'Hôpital Civil de Strasbourg, France ; ces bactéries sont une cause importante de mortalité dans les pays en développement (surtout chez les enfants) ainsi qu'un risque permanent dans les pays industrialisés.

III-1-2- Les bactéries étudiées

❖ *Klebsiella oxytoca*

C'est une entérobactérie Gram- aéro-anaérobie ubiquitaire présente dans le tube digestif des hommes et des animaux. Elle est responsable de colites, d'infections urinaires et respiratoires. Elle est naturellement résistante aux pénicillines du fait de la production d'une bêta-lactamase de classe A, mais elle est en général sensible aux

céphalosporines. Récemment, certaines souches de *K. oxytoca* isolées chez des patients en Ecosse ont montré la présence d'une β -lactamase qui hydrolyse la céfotaxime et la céftazidime qui sont des céphalosporines de troisième génération (Younes et al., 2011). Des souches résistantes aux fluoroquinolones ont également été identifiées en Tunisie (Khalifa et al., 2010). *Klebsiella* est impliquée dans la survenue des diarrhées post-antibiotiques (Gorkiewicz, 2009) et dans les maladies nosocomiales néonatales (Biran et al., 2010) ou chez les adultes (Ivanov et Egorov, 2008). Les infections à *Klebsiella* peuvent également être de nature communautaire (Tsakris et al., 2011). Par ailleurs, *Klebsiella oxytoca* a également été associée à des colites hémorragiques (Hoffmann et al., 2010) et à des colites intercurrentes dans la maladie de Crohn (Plessier et al., 2002).

❖ *Salmonella enterica*

Les salmonelles ont été découvertes en 1885 par Théobald Smith et nommé ainsi en l'honneur de Daniel Elmer Salmon qui dirigeait son travail (Dworkin et al., 2006 ; Zins et Balaton, 2010). Ce sont des entérobactéries Gram- largement répandues dans la nature et souvent responsables de toxi-infections alimentaires. Elles sont présentes dans le tube digestif des malades. La contamination est féco-orale.

Le lipopolysaccharide de *Salmonella* joue un rôle important dans sa virulence en interagissant avec le complément et en provoquant la sécrétion de cytokines. *Salmonella* sécrète également des sidérophores qui vont capter le fer et permettre à la bactérie de se multiplier dans les cellules phagocytaires en inhibant la formation des phagolysosomes. Une fois fixées dans les cellules de l'intestin, *Salmonella* provoque un gonflement des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes et elle sera englobée dans une vacuole. *Salmonella* détruit ensuite la cellule infectée et l'infection se poursuit par voie sanguine (septicémie) ou par voie lymphatique (fièvre typhoïde). *Salmonella* a également un pouvoir non spécifique causant les infections digestives. Les salmonelles sont sensibles aux β -lactamases comme le montrent des études de Xiong (Xiong et al., 2011) et elles sont aussi normalement sensibles à la ciprofloxacine et au céftriaxone. Cependant des phénomènes de résistance ont été rapportés aux USA pour la ciprofloxacine dans des études menées entre 1999-2008 (Medalla et al., 2011) et en Taïwan pour la céftriaxone (Su et al., 2011).

❖ *Shigella sonnei*

Les shigelles sont des entérobactéries Gram- spécifique à l'Homme. Ce sont des bactéries entéro-invasives qui causent des infections intestinales, dont la forme la plus grave est la dysenterie bacillaire (essentiellement due à *Shigella dysenteriae*). La transmission est féco-orale.

La pathogénie de *Shigella* suit deux modes :

- Production d'une toxine

Shigella sécrète la shiga toxine qui agit au niveau des ribosomes des cellules eucaryotes en inhibant la synthèse protéique. Cette toxine a des effets neurotoxiques, entérotoxiques et cytotoxiques (Louise et Obrig, 1992 ; Obata, 2010).

- Invasion

Shigella a également un pouvoir invasif. Les shigelles adhèrent aux cellules M de l'iléon et du côlon et arrivent par transcytose dans la muqueuse sous-séreuse. Elles lysent le phagosome et induisent l'apoptose des macrophages ce qui déstabilise l'épithélium de la barrière intestinale et facilite l'accès des bactéries. Les débris libérés par les macrophages tués sont pris en charge par les entérocytes. Elles atteignent ensuite le cytoplasme où elles fabriquent de l'actine les rendant capables de se mouvoir et d'atteindre les cellules voisines. A ce moment, elles ne sont plus en contact avec le milieu extracellulaire, ce qui implique que la bactérie est protégée des défenses immunitaires et finira par détruire les cellules envahies. Ce mécanisme est schématisé sur la figure 36.

Certaines souches de *Shigella* présentent des résistances aux antibiotiques. Une étude menée en Malaisie durant 9 ans a montré que 58,4% des souches étudiées étaient résistantes à la tétracycline et 53,8% à la trimétoprine-sulfaméthoxazole (Banga Singh et al., 2011). Une autre étude en Chine dans la province de Zhejiang révèle la résistance à de multiples antibiotiques tels que l'aztrénam (30,8%), l'ampicilline (92,3%), la pipéracilline (61,5%), la céftazidime (30,8%), la céfotaxime (30,8%), la gentamicine (53,8%).

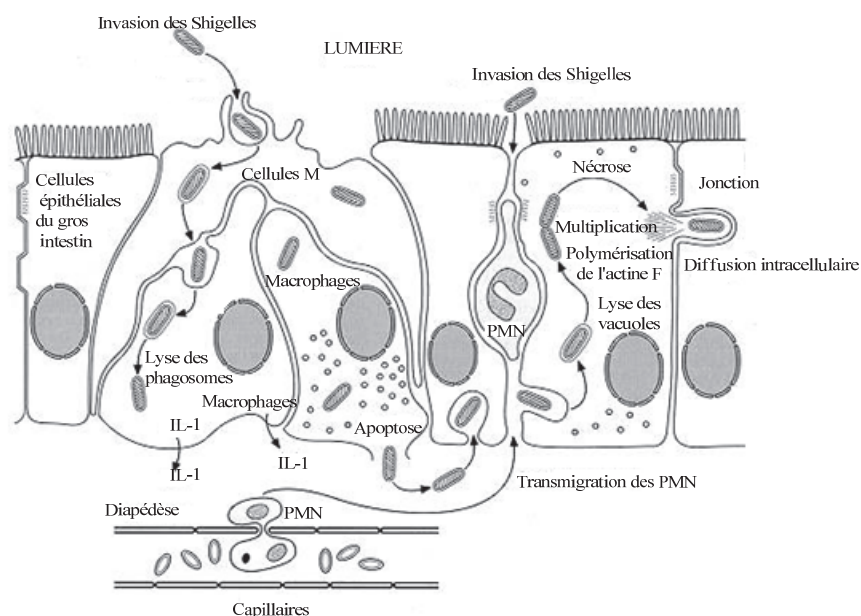


Figure 36 : Mode d'invasion des shigelles d'après Samuel Baron
(<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Shigella>).

❖ *Vibrio cholera non O1*

Vibrio cholerae a été pour la première fois isolé comme le responsable du choléra par l'anatomiste italien Filippo Pacini en 1854 (Bentivoglio et Pacini, 1995). Sa découverte resta toutefois ignorée pendant 30 ans jusqu' à la publication des résultats de Robert Koch. *Vibrio Cholera* est un bacille Gram négatif incurvé avec un flagelle monotriche. Il comprend deux sérovars : les souches O1 ou O 139 dont la membrane supporte l'antigène O et qui sont responsables du choléra et les souches non O1 ou non O 139 qui n'induisent pas le choléra.

Vibrio cholera n'est pas une bactérie invasive. La dose exigée pour l'infection est importante \geq à 10^8 , car de vibrions sont tués par le suc gastrique acide. *Vibrio* sécrète une mucinase qui lui permet de détruire le mucus et d'accéder aux cellules intestinales. Elle va se fixer aux entérocytes et sécréter des endotoxines. La toxine cholérique provoque l'inhibition de d'ions sodium (Na^+) et la sécrétion accrue d'ions chlorure (Cl^-) avec sortie massive d'eau. Elle se fixe sur les récepteurs des entérocytes et induit la production permanente d'AMPc par les adénylate cyclases, ce qui engendre une sécrétion massive d'électrolytes. Les pili corégulés permettent l'adhérence des bactéries aux muqueuses de l'intestin grêle proximal.

Une étude montre l'augmentation du taux de β -defensine-2 dans le duodénum de patients atteints du choléra par *V. cholera* O1 dans la phase aiguë de la maladie et des α -défensine 5 pendant la convalescence (Shirin et al., 2011).

Vibrio cholera développe également de multiples résistances contre les antibiotiques (Lamrani Alaoui et al., 2010).

Toutes ces bactéries causent de fortes réactions inflammatoires qui à la longue sont un facteur de risque de maladies inflammatoires chroniques et des tumeurs carcinoïdes de l'intestin.

III-2- Les maladies inflammatoires de l'intestin : étude d'un modèle, les cellules BON

Dans ce travail, nous avons étudié les cellules BON comme modèle cellulaire d'études de tumeurs carcinoïdes qui dérivent de l'intestin.

III-2-1- Les tumeurs carcinoïdes de l'intestin

Les tumeurs carcinoïdes peuvent se développer tout au long du tube digestif, dans le pancréas, les bronches, les ovaires et le thymus. La localisation la plus fréquente est l'appendice (40% des cas), puis l'intestin grêle (30%), le côlon (15%), les bronches (10%), l'œsophage, l'estomac ou les ovaires (d'Andon et al., 2004).

Les tumeurs carcinoïdes intestinales dérivent de cellules nerveuses digestives sécrétant des hormones ou des neurotransmetteurs tels que les chromogranines, la

sérotonine, l'histamine, etc. Leur caractère bénin ou malin est extrêmement difficile à apprécier en histologie. Les causes de ces tumeurs sont mal connues, mais les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, comme la maladie de Crohn pourraient à long terme générer ce type de tumeur.

Les carcinoïdes bénins ne se manifestent par aucun symptôme et sont découverts lors d'une intervention ou d'un examen effectué à l'occasion d'une autre maladie (appendicectomie ou endoscopie). Les carcinoïdes malins peuvent obstruer l'intestin et donner des métastases dans le foie et les ganglions abdominaux.

Le diagnostic de tumeur carcinoïde de l'intestin grêle repose sur les données cliniques (syndrome carcinoïde associant flush et diarrhée), biologiques (dosage urinaire du 5-HIAA), scintigraphiques et d'imagerie.

Les tumeurs carcinoïdes de l'intestin provoquent la sécrétion des substances vasoactives telles que la sérotonine, un neurotransmetteur qui augmente le péristaltisme intestinal, l'histamine, la kallikréine et la bradykinine. La sérotonine présente dans la muqueuse gastro-intestinale représente environ 80% de la sérotonine totale de l'organisme. L'histamine est produite dans les cellules entérochromaffines de la paroi de l'estomac, dites ECL, (*Enterochromaffin-Like Cells*). Ces cellules synthétisent et secrètent l'histamine lorsqu'elles sont stimulées par la gastrine et la protéine PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*).

Une grande majorité des tumeurs carcinoïdes de l'intestin grêle dérivent des cellules entérochromaffines de l'iléon distal (Zins et Balaton, 2010).

III-2-2- Etude d'un modèle cellulaire, les cellules BON

Les cellules BON sont des cellules de type entérochromaffines (Kim et Ho, 2010 ; Siddique et al., 2009 ; Wu et al., 2011), isolées d'une tumeur carcinoïde du pancréas (Evers et al., 1991). Elles possèdent des récepteurs de gastrine, de somatostatine (Lawrence et al., 1990) et synthétisent de la sérotonine (Tran et al., 2004) et de la CGA (Jeng et al., 1991). Les cellules BON constituent un bon modèle pour étudier le comportement biologique des tumeurs carcinoïdes et les effets *in vitro* d'agents thérapeutiques (Evers et al., 1994 ; Evers et al., 1991).

Elles sont encore peu étudiées, mais quelques études ont montré une inhibition de la croissance cellulaire des BON par différents produits et proposent ces derniers comme de nouvelles voies médicamenteuses des traitements des tumeurs carcinoïdes. C'est le cas de la MG-132 (N-benzyloxycarbonyl leucinylleucinylleucinal) (Chen et al., 2010), du lithium (Greenblatt et al., 2010), de l'hésperétine (Zarebczan et al., 2011). D'autres études ont montré que la régulation de certaines voies de signalisation pourrait également influencer sur la diminution des tumeurs endocrines. A titre d'exemple, la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase/Akt (Pitt et al., 2009 ; Silva et al., 2011) ou encore la cascade de signalisation Raf-1/MEK1/2/ERK1/2 (Ning et al., 2010).

IV- Les traitements actuels des maladies intestinales infectieuses

Les traitements actuels des maladies infectieuses de l'intestin dues aux bactéries que nous étudions sont des antibiotiques. Ces antibiotiques sont des substances chimiques organiques d'origine naturelle ou synthétique inhibant (bactériostatique) ou tuant (bactéricide) les bactéries pathogènes à faible concentration et possédant une toxicité sélective. Un grand nombre d'antibiotiques proviennent de molécules naturelles, isolées chez des microorganismes, champignons ou bactéries (Lu et al., 2010 ; Molinari, 2009 ; Pelaez, 2006). Ils agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape de leur prolifération. Leur classification tient compte de ce facteur et de leur structure chimique, de leur spectre d'activité et de leur pharmacocinétique.

IV-1- Classification des antibiotiques

Ainsi, on distingue plusieurs familles d'antibiotiques selon leurs cibles (Tableau XVI). Leurs modes d'action sont décrits dans différentes revues (Calvo et Martinez-Martinez, 2009 ; O'Grady, 1971).

Tableau XVI : Exemple de quelques antibiotiques en fonction de leur cible cellulaire et de leur spectre d'activité.

Cible	Famille de l'antibiotique (Activité)	Exemple et Spectre d'activité
Paroi bactérienne	B-lactamine <i>Bactéricide</i> Glycopeptides <i>Bactéricide</i> Fosfomycine <i>Bactéricide</i> Polymixine <i>Bactéricide</i>	Penicilline G : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ Amoxicilline : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ et certains bacilles Gram- Cefotaxime : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ et bacilles Gram-
Membrane	Gramicidine et tyrocidine <i>Bactéricide</i> Macrolides <i>Bactériostatique</i>	Colistine : Bacilles Gram- Bacitracine : Bacilles Gram+
Ribosomes	Aminoside <i>Bactéricide</i> Phénicol <i>Bactériostatique</i> Tétracycline <i>Bactériostatique</i> Fusidanine <i>Bactériostatique</i> Puromycine Oxazolidinone	Streptomycine : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ sauf Streptococcus Minocycline : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ Gram-, germes à développement intracellulaire (problème de résistance fréquent)
ADN	Quinolone et fluoroquinolone <i>Bactéricide</i> Rifamycine <i>Bactéricide</i> Nitrés	Linézolide Gram+ Ciprofloxacine : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ et bacilles Gram, mycobactéries
Acide folique	Sulfamide	Métromidazole : Anaérobies surtout gram + et - sporulés Sulfadiazine : Cocci gram+ et gram -, bacilles gram+ et bacilles Gram mais résistance fréquente

IV-1-1- Les antibiotiques agissant sur la paroi

Ils agissent sur des bactéries extracellulaires en bloquant la synthèse de la paroi. Ainsi, les cellules en croissance vont exploser sous l'effet de la pression osmotique. Dans cette famille, sont classés :

- les bétalactamines (pénams ou pénicilline, les pénems ou carbapénèmes, les céphems ou céphalosporines et les monobactames) agissent par fixation aux Protéines Liant la Pénicilline (PLP), par inhibition de la transpeptidation ou activation des autolysines (Drawz et Bonomo, 2010)
- les glycopeptides agissent par formation d'un complexe avec des précurseurs du peptidoglycane
- la fosfomycine agit sur la pyruvate-N- acétylglucosamine transférase, qui intervient dans la synthèse des peptidoglycans (Kahan et al., 1974).

IV-1-2- les antibiotiques agissant sur la membrane plasmique

Ils interagissent avec les lipides membranaires provoquant une désorganisation de la bicouche phospholipidique et détruisant ainsi l'intégrité de la membrane (Mogi et Kita, 2009). Ces antibiotiques sont de nature polypeptidique (les polymixines, les gramicidines et tyrocidines).

IV-1-3- Les antibiotiques agissant sur le ribosome

Ils empêchent la synthèse protéique à différentes étapes. Leur mode d'action est décrit dans différents articles dont la revue de Sutcliffe (Sutcliffe, 2005).

- Les aminosides : ils empêchent la traduction des ARNm en se fixant sur la sous-unité 30S (fixation au complexe d'initiation)
- les cyclines (tétracyclines) : elles se fixent de façon réversible sur la sous-unité 30S des ribosomes et empêchent l'attachement des amino-acyl ARNt au site A (Nelson et Levy, 2011)
- les macrolides, lincosamides et synergistines : ils inhibent la transpeptidation et la translocation de la chaîne peptidique en se fixant sur la sous unité 50S (site P)
- les phénicolés : ils se fixent sur la sous unité 50 S du ribosome (site A) et empêchent l'attachement des amino-acyl ARNt au site A
- les puromycines : ils bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en mimant l'extrémité d'un ARNt et provoquent la terminaison.
- l'acide fusidique
- les oxazolidinones.

IV-1-4- Les antibiotiques agissant sur l'ADN

Ce sont :

- les quinolones et fluoroquinolones : elles empêchent la réplication de l'ADN en fixant sur l'ADN gyrase. L'ADN gyrase est responsable de l'enroulement de l'ADN (Collin et al., 2011)
- les rifamycines : elles bloquent la transcription de l'ADN bactérien en ARNm par la fixation à la sous unité β de l'ARN-polymérase bactérienne
- les produits nitrés (oxyquinoléines, nitrofuranes, mitroimidazolés) : prodrogues dont certaines bactéries peuvent réduire le radical ($\cdot\text{NO}_2$), ce qui fait apparaître un dérivé toxique pour l'ADN par substitutions de bases ou cassures.

IV-1-5- Les antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

Ils inhibent ou inactivent des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide folique. Ce sont les sulfamides et la triméthoprine (Calvo et Martinez-Martinez, 2009).

IV-2- Les limites des traitements antibiotiques

Des études ont montré que les antibiotiques peuvent un facteur favorisant l'apparition des maladies intestinales inflammatoires car ils modifient la flore bactérienne naturelle et favorisent ainsi un déséquilibre pouvant conduire à celles-ci (Shaw et al., 2012). Ces dernières décennies, de plus en plus de souches bactériennes se sont révélées résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques conventionnels. Ces phénomènes de résistance ont des causes multiples : l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques pendant de nombreuses années, leur utilisation en agriculture et en élevage. La résistance peut être naturelle ou acquise. Dans la résistance acquise peut-être de nature chromosomique (due à une mutation spontanée dans le génome bactérien avec une fréquence d'apparition de 10^{-6} à 10^{-7}) ou plasmidique (due à l'acquisition de gènes de résistance).

Le transfert peut être vertical (même espèce) ou horizontal (différentes espèces) mais jamais Gram- vers Gram +). Il peut se faire par transduction, transformation, ou conjugaison par l'intermédiaire des plasmides, transposons et intégrons (Skurnik, 2009 ; Baltzer et Brown, 2011).

Pour résister aux antibiotiques, la bactérie utilise également différentes techniques telles que le brouillage, le camouflage, le blindage et l'esquive assimilables à celles décrites pour les PAMs au chapitre II.

Les bactéries développent des résistances contre les antibiotiques utilisées pour traiter les infections qu'elles induisent. Ceci constitue un véritable problème de santé publique. Il est urgent de trouver de nouvelles molécules actives pour pallier à ce

problème. Face à ses problèmes qui mettent à mal le traitement de personnes atteintes d'infections, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a déclaré depuis l'an 2000, la résistance aux antibiotiques comme un problème de santé publique et a fait de la recherche pour de nouveaux traitements, un enjeu prioritaire (WHO, 2000). C'est dans ce but que nous avons testé les peptides antimicrobiens de l'immunité innée et les extraits de plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise afin de les proposer comme nouvelles voies médicamenteuses.

De plus, à la longue, les infections intestinales peuvent déboucher sur des maladies inflammatoires (Karlinger et al., 2000 ; Hansen et al., 2010), qui elles peuvent aboutir à des tumeurs carcinoïdes (Itzkowitz et Yio, 2004 ; Ullman et Itzkowitz, 2011). La modification de la balance bactérienne suite à la prise d'antibiotiques peut également aboutir aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (rectocolite hémorragique et maladie de Crohn). Il est important de comprendre comment ces tumeurs peuvent être régulées. C'est dans ce but que nous étudierons l'effet de deux peptides dérivés de la chromogranine A, la catestatine bovine et la chromofungine sur notre modèle cellulaire, les cellules BON.



Partie 2 :



Stratégie expérimentale



I- Préparation du matériel biologique

I-1- Les extraits de plantes

I-1-1-Choix et récolte des plantes

Une enquête ethnopharmacologique a été réalisée auprès des tradithérapeutes et des vendeurs de plantes médicinales à Cotonou (Bénin) entre Mai 2009 et Juillet 2009. Cette enquête ainsi qu'une étude bibliographique approfondie a conduit à la sélection de 14 plantes sur la base de leur implication dans les pathologies intestinales.

Les plantes (2 à 5 Kg de matières fraîches) sont récoltées en saison pluvieuse dans diverses régions du Bénin. Elles sont séchées au laboratoire à l'abri de la lumière afin d'éviter la dégradation des principes actifs. Au cours du séchage, les plantes sont régulièrement aérées, afin d'éviter les contaminations par les moisissures et champignons que pourrait provoquer l'humidité. Une fois sèches, elles sont broyées à l'aide d'un Blender.

I-1-3- Extraction des molécules potentiellement antimicrobiennes

Le mode d'extraction utilisé est un fractionnement à température ambiante, sous agitation, par un gradient de solvants organiques à partir des solvants les plus apolaires vers les plus polaires : le cyclohexane (C_6H_{12}), le dichlorométhane (CH_2Cl_2), l'acétate d'éthyle ($C_4H_8O_2$), et le butanol ($C_4H_{10}O$). Le mode opératoire est illustré par la figure 37.

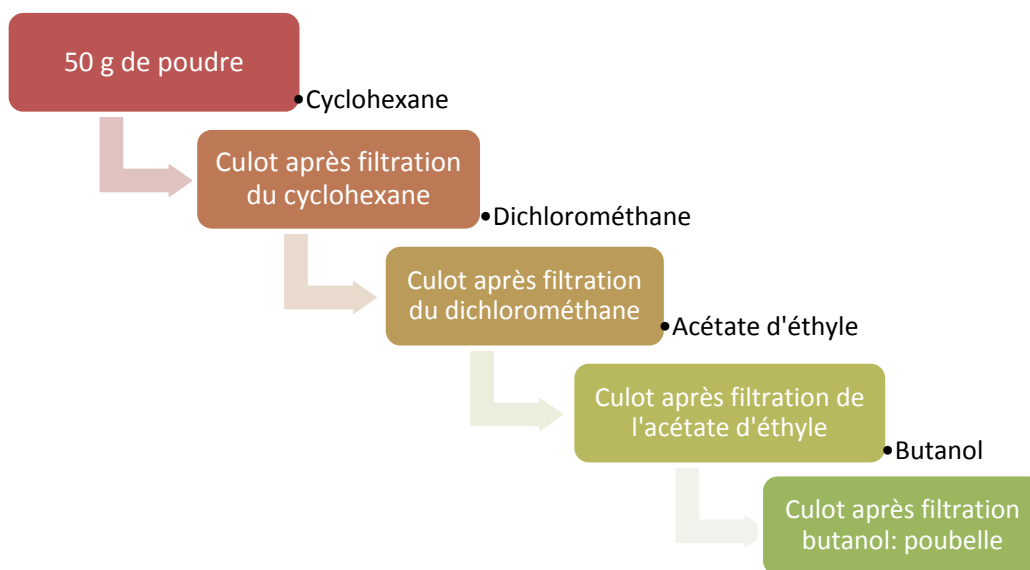


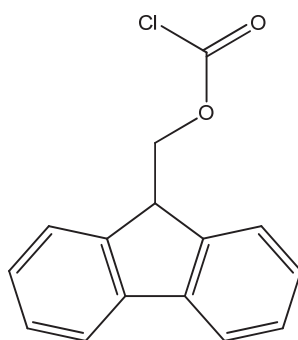
Figure 37 : Mode opératoire du fractionnement obtenue après broyage des plantes séchées.

50 g de poudre chaque plante sont pesés et mis sous agitation dans 150 ml de cyclohexane pendant 1 h à température ambiante puis la suspension est filtrée. L'opération est répétée deux fois. Le filtrat est séché au rotavapor et constitue l'extrait C₆H₁₂, tandis que le culot est séché sous la hotte et servira pour l'extraction au dichlorométhane. Les mêmes opérations sont répétées jusqu'à l'obtention des quatre extraits.

I-2- La synthèse peptidique

Tous les peptides utilisés dans cette étude ont été synthétisés par Bernard Guérold (Ingénieur d'Etude Inserm U977, Strasbourg, France) sur un synthétiseur Applied Biosystems 432A SYNERGY (Foster City, USA). Les acides aminés et réactifs utilisés pour la synthèse peptidique proviennent de Novabiochem (Novabiochem, Darmstadt, Germany). Une fois la synthèse terminée, les peptides sont purifiés par HPLC, analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et au séquençage automatique d'Edman.

La technique de synthèse utilisée est la technique de Merrifield qui consiste en une synthèse en phase solide de type Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl, Figure 38) (Merrifield, 1965).



9-fluorenylmethoxycarbonyl

Figure 38 : 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).

Le principe de la méthode de synthèse peptidique est basé sur la construction d'une chaîne d'acides aminés liés l'un à l'autre selon une séquence prédéterminée. La synthèse se fait de l'acide aminé -COOH terminal vers l'acide aminé -NH₂ terminal.

La résine Wang, ici utilisée, porte le premier acide aminé de la séquence à synthétiser fixé par le -COOH terminal sur la résine (support solide en polystyrène). Le groupement -NH₂ de ce premier acide aminé est protégé par le Fmoc (Figure 39). La synthèse peptidique est obtenue par le déroulement de 4 étapes successives. Le solvant utilisé est le N-méthylpyrrolidone (NMP) également utilisé pour dissoudre les aas-Fmoc en poudre.

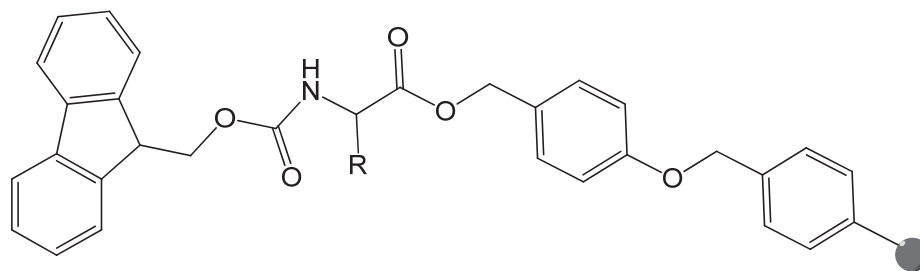


Figure 39 : Acide aminé n°1 lié en $-\text{NH}_2$ terminal par le groupement Fmoc et fixé en $-\text{COOH}$ terminal sur la résine Wang (paraméthylphénoxyéthyl polystyrène).

La synthèse peptidique comprend 4 étapes :

Etape 1 : Déprotection du $-\text{NH}_2$ l'acide aminé n° 1 (aa_1)

Afin que la réaction de synthèse se poursuive, le groupement Fmoc est éliminé par une solution de pipéridine entraînant ainsi la libération du $-\text{NH}_2$ de l'acide aminé n°1. La pipéridine rend également le milieu basique et en pH alcalin, les Fmoc et les protections latérales sont stables. Cette réaction est illustrée par la figure 40.

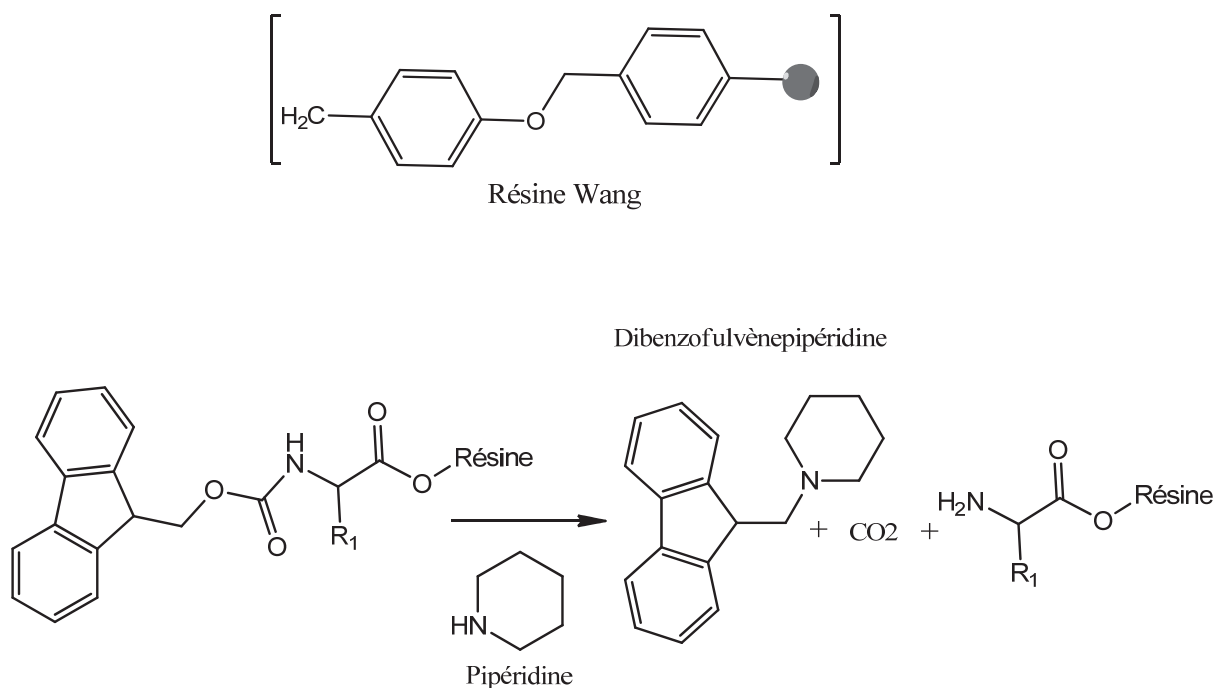


Figure 40 : Etape 1 de la synthèse peptidique. Déprotection du $-\text{NH}_2$ de l'acide aminé n°1 par élimination du groupement Fmoc.

Etape 2 : Activation du $-\text{COOH}$ de l'acide aminé n°2

Le radical carboxyl de l'aa2 (possédant également un Fmoc en $-\text{NH}_2$ terminal) est activé afin de permettre sa fixation à l'acide aminé n°1. L'hydroxyle est rendu plus réactif par un hydroxybenzotriazole (HOBT).

La solution utilisée est un mélange de HOBT (Figure 41A) et de HBTU (Figure 41B) (hydroxybenzotriazole et O- benzotriazole N,N,N',N'-tétraméthyluronium-hexafluorophosphate). La réaction est illustrée à la figure 42.

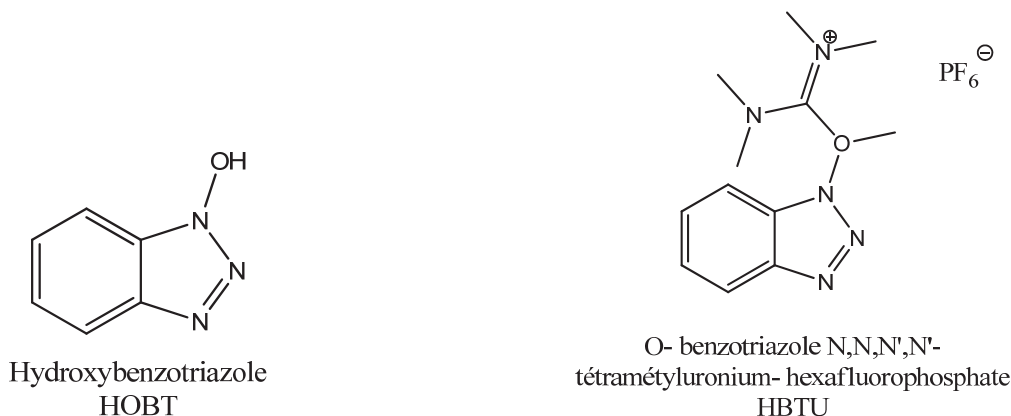


Figure 41 : HOBT (hydroxybenzotriazole) et HBTU (O- benzotriazole N, N, N', N'-tétraméthyluronium- hexafluorophosphate).

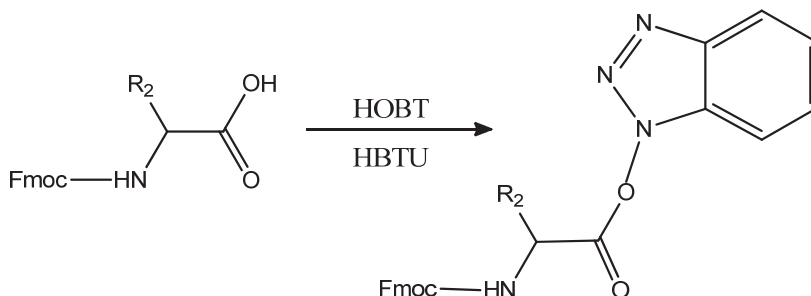


Figure 42 : Etape 2 de la synthèse peptidique. Activation du $-\text{COOH}$ du résidu aa2.

Etape 3 : Couplage de l'acide aminé déprotégé et de l'acide aminé activé

Le couplage des acides aminés se fait par l'établissement d'une liaison peptidique entre la fonction amine d'un acide aminé et la fonction $-\text{COOH}$ de l'acide aminé suivant avec élimination d'une molécule d'eau. La réaction a lieu en présence du diisopropyl éthylamine (DIEA) (Figure 43). Les réactions d'activation et de couplage se font simultanément. Après chaque couplage, a lieu un "capping". C'est une opération qui consiste à éliminer les acides aminés en excès qui n'ont pas été fixés afin d'obtenir une colonne propre pour l'étape suivante.

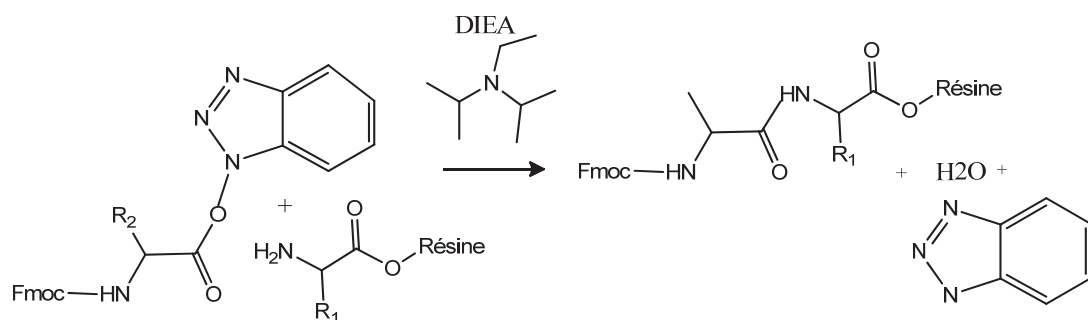


Figure 43 : Etape 3 de la synthèse peptidique. Couplage entre le -NH₂ terminal déprotégé de l'acide aminé n-1 et le -COOH terminal activé de l'acide aminé n.

Etape 4 : Déprotection et libération du peptide

L'acide trifluoroacétique est utilisé pour libérer le peptide de la résine et décrocher les groupements protecteurs des radicaux des acides aminés s'il y a lieu.

- Cas des peptides rhodaminés

Pour la microscopie confocale, les peptides sont marqués avec une molécule fluorescente, la 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine (Figure 44) (Interchim, Montluçon, France). Elle est fixée sur le -NH₂ terminal du peptide synthétique par une liaison peptidique.

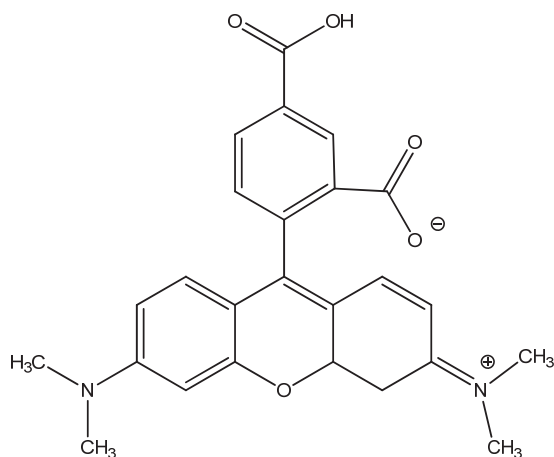


Figure 44 : 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine.

L'opération de marquage du peptide par la rhodamine se fait hors du synthétiseur afin d'éviter de laisser des traces de rhodamine. Le peptide encore fixé à la résine est prélevé du synthétiseur et mis en suspension dans 1 ml de NMP. Un mélange composé de 600 µl de HOBt/HBTU et 400 µl de DIEA est ajouté puis la solution est mise à barboter sous azote. La rhodamine (50 mg) est dissoute en parallèle dans 3 ml de NMP et ajoutée à la solution contenant le peptide. La réaction a lieu pendant 50 min sous azote puis la solution est filtrée et le peptide rhodaminé

toujours fixé à la résine est récupéré (culot) pour subir l'opération de déprotection au TFA.

I-3- Les cellules entérochromaffines.

I-3-1 Culture cellulaire

Les cellules BON sont une lignée cellulaire dérivée d'une tumeur carcinoïde du pancréas chez l'humain. Ce sont des cellules de type entérochromaffines. Elles ont été obtenues du Dr Claire Desnos (Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS UPR 1929, Paris) *via* l'équipe du Dr Stéphane Gassman (CNRS UPR 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg).

Les cellules BON sont mises en culture dans du Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) F : 12 (Gibco Paisley, Scotland). Le milieu est enrichi par 10 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*) et de 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine et incubé dans une étuve à 37° C à 5 % de CO₂ en atmosphère humide.

Les cellules à confluence sont détachées avec de la trypsine (Invitrogen, Carlsbad, Canada) et remises dans du milieu de culture frais.

I-3-2- Stimulation des cellules entérochromaffines

Les cellules sontensemencées à 10.10⁶ dans des boîtes de Pétri de diamètre 6 cm puis incubées à 37°C à 5% de CO₂ en atmosphère humide. Elles sont stimulées lorsqu'elles atteignent la confluence.

Les cellules sont lavées trois fois pendant 10 min à 37°C dans du tampon Locke sans calcium. La composition du tampon est la suivante : 140 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH₂PO₄, 1,2 mM de MgSO₄, 0,01 mM d'EDTA, 15 mM de HEPES, 10 mM de glucose à pH 7.2. Puis elles sont stimulées avec les différents sécrétagogues à tester contenus dans 2 ml de tampon Locke normal en présence de 2,5 mM de CaCl₂. La stimulation se fait pendant 10 min à 37°C. Les sécrétagogues utilisés sont l'ionomycine (Io) 2 µM (Sigma, Steinheim, Germany), la catestatine bovine (bCAT) bCGA₃₄₄₋₃₆₄ 100 µM, la chromofungine (CHR) CGA₄₇₋₆₆ 100 µM. Les milieux de sécrétion sont recueillis dans des tubes contenant une solution aqueuse de TFA 0.1%.

I-4- Les cultures bactériennes

La préculture est une opération qui consiste à mettre des bactéries en culture afin d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance. Le milieu de culture contient tous les nutriments essentiels à la croissance des bactéries.

Klebsiella oxytoca, *Salmonella enteritica*, *Shigella sonnei*, et *Vibrio cholera* sont les quatre souches bactériennes étudiées. Ce sont des bactéries qui induisent des diarrhées ; elles ont été isolées à partir de selles de patients diarrhéiques à l'Hôpital Civil de Strasbourg par l'équipe du Dr Gilles Prévost (EA-4438, Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France).

Une préculture de chacune des souches est réalisée en mettant une colonie isolée dans du bouillon Mueller Hinton, MHB (Merck, Darmstadt, Germany) sous agitation pendant 18 h à 37°C.

II- Méthode de purification du matériel biologique

La chromatographie est une méthode analytique et/ou préparative qui est basée sur la séparation des constituants d'un mélange par entraînement d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire. Elle est utilisée pour séparer, purifier un mélange de composés en solution (soluté) et identifier chacun des constituants par comparaison avec des standards.

Chaque constituant se déplace sur la phase stationnaire à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases stationnaire ou mobile. Plusieurs types de chromatographies existent. Les facteurs intervenants dans la séparation sont la solubilité du mélange dans le solvant (hydrophobicité par exemple), la longueur de la chaîne des constituants (tamis moléculaire), leur polarité (échange d'anions ou de cations), leur charge électrique (chromatofocalisation), la présence de groupements d'atomes particuliers (affinité de type IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*).

Lors de la chromatographie, deux forces sont mises en jeu :

- une force de rétention (adsorption) exercée par la phase stationnaire sur le soluté
- une force d'entraînement, exercée par la phase mobile sur le soluté

II-1- Le Sephadex G-25 superfine

La purification sur Sephadex G-25 superfine (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur masse moléculaire apparente. Le tamis utilisé est constitué de billes comportant des pores de tailles définies. Les grosses molécules ne peuvent pas entrer dans ces pores. Les plus petites pénètrent à l'intérieur des pores et seront éluées tardivement par un tampon aqueux ou des solvants organiques. L'utilisation du Sephadex G-25

superfine permet de séparer les molécules de $MW < 5000$ Da, de celles dont $MW > 5000$ Da.

II-1-1-Préparation de l'extrait de plantes à purifier

Les différentes étapes de purification des extraits sont illustrées à la figure 45.

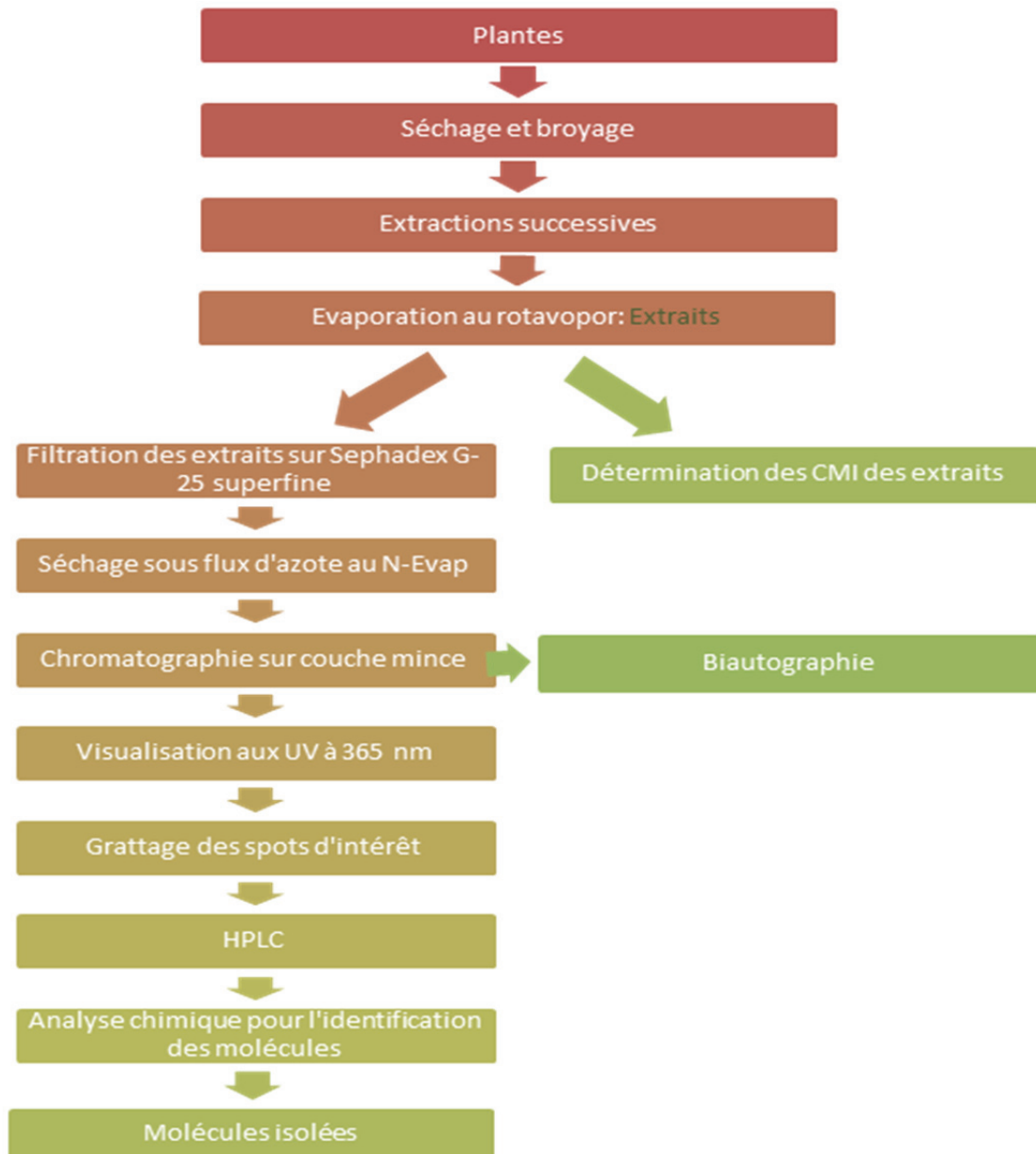


Figure 45 : Schéma représentant les différentes étapes de traitement des plantes.

20 milligrammes de chaque extrait sont mis en solution dans 2,5 ml de solution A : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 60 :30 :4,5 (v/v/v) puis homogénéisés au Vortex et mis dans un bain à ultra-sons pour une dissolution la plus complète possible.

II-1-2-Préparation de la colonne de Sephadex G-25 superfine

20 grammes de Sephadex G-25 superfine sont lavés avec une solution A jusqu'à ce que le surnageant soit exempt de petites particules en suspension après décantation. La résine est alors suspendue dans 250 ml du même solvant.

Dans la colonne de chromatographie en verre avec robinet (diamètre 0,9 cm, hauteur de 30 cm) sont introduits un peu de coton de verre puis 10 ml de la solution de Sephadex précédemment obtenue.

II-1-3- Dépôt de l'échantillon sur la colonne de Sephadex G-25 superfine

Sur la colonne sont déposés délicatement les 2,5 ml de l'extrait préparé et mis en suspension dans la solution A en prenant soin de ne pas provoquer de turbulence à la surface du Sephadex.

L'élution est obtenue par les passages successives de :

- 5 ml de solution A : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 60:30 :4,5 (v/v/v)
- 2,5 ml de solution B : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ à 2 :1 (v/v)
- 2,5 ml de solution C : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ à 40:35:10 (v/v/v)

Les 3 éluats sont réunis et séchés sous un flux d'azote au N-EVAP modèle 111 (Organomation INC, South Berlin, USA).

II-2-Chromatographie sur couche mince

II-2-1-Principe

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique utilisée au cours de la séparation et de l'identification des molécules organiques de masse molaire 100 à 5000 g/mol et de polarité moyenne des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures ou aux extraits (mélange complexe de métabolites). C'est une méthode préparative simple et peu onéreuse.

II-2-2-Analyse de l'extrait purifié après passage sur Sephadex G-25

Des chromatographies bidimensionnelles sont réalisées pour une meilleure séparation des différents composés présents.

Des plaques HPTLC en verre (10 cm x 10 cm) ou de TLC (20 cm x 20 cm) (Merck, Darmstadt, Germany) ont été utilisées. Les échantillons obtenus après le

passage sur le Sephadex sont repris dans 30 à 50 µl de solution B et sont déposés sur les plaques de CCM. Après le dépôt, la plaque de silice est placée dans une cuve de dimensions 13 x 13 x 5 cm pour 15 ml de solvant ou 25 x 25 x 10 cm pour 35 ml de solvant. La solution utilisée pour la migration en première dimension est le solvant D : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$ 95 : 5 (v/v). Après migration jusqu'au sommet de la plaque, celle-ci est retirée de la cuve, séchée et placée à nouveau dans une cuve pour une deuxième migration perpendiculaire à la première dans le solvant E : $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 90:1:2 (v/v/v). La visualisation des composés se fait sous une lampe UV à 365 nm.

II-3- Dessalage

Cette technique est utilisée pour éliminer les sels des milieux de sécrétion des cellules BON. Les milieux de sécrétion sont rassemblés par lot de 3 boîtes de pétri soit au total 30 millions de cellules. Le dessalage s'effectue avec des Sep-Pak C18 (Waters, Ireland) selon le protocole suivant: La mini-colonne est activée avec 10 ml de méthanol. La vitesse d'écoulement est de 1ml/min. Les impuretés sont ensuite lavées avec 10 ml d'acétonitrile et avec 10 ml de TFA à 0.1%, la colonne est mise en condition. L'échantillon à dessaler est ensuite déposé sur la colonne. Après ce dépôt, 10 ml d'eau TFA permettent d'éliminer les sels puis les protéines sont éluées par 5 ml d'acétonitrile. L'éluat est ensuite concentré à la speed-Vacuum (Concentrator 5301, Hamburg, Germany) en évitant le séchage complet.

II-4-Chromatographie en phase inverse : RP-HPLC

Dans la RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*), la phase stationnaire est apolaire (chaînes de carbone C18 greffées au groupement silanol) et la phase mobile polaire, contrairement à la chromatographie classique.

Dans notre travail, cette technique est utilisée dans différents contextes :

II-4-1- HPLC pour les peptides synthétiques

L'HPLC est utilisée pour identifier un peptide par comparaison avec un profil connu, obtenu préalablement dans les mêmes conditions. Une fois le temps de rétention du pic du peptide d'intérêt identifié, il peut être purifié.

Les peptides synthétisés sont analysés puis purifiés par HPLC. L'appareil utilisé est une DIONEX-Ultimate 3000. La colonne est une C18 Vydac Grace 218TP (4,6 x 250 mm ; Grace Davidson, USA) dont la taille des particules se situe entre 3 et 20 µm avec un diamètre des pores de 300 Å. La longueur d'onde de détection est de 214 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorption de la liaison peptidique.

Le système d'éluants utilisés est :

- Solvant A : TFA 0,1%, H₂O (99,9%)
- Solvant B : Acétonitrile 70%, TFA 0,09% et H₂O 29,91%

Le gradient est réalisé par un mélange des deux solvants. Le débit est de 1,5 ml/min.

II-4-2- HPLC pour la purification des extraits de plantes

L'HPLC est également utilisée pour séparer les molécules contenues dans les extraits de plantes. Nous avons utilisé comme appareil une DIONEX-Ultimate 3000. La colonne est une C18 Vydac Grace 218TP (4,6 x 250 mm ; Grace Davidson, USA) dont la taille des particules se situe entre 3 et 20 µm et le diamètre des pores de 300 Å. La longueur d'onde de détection est de 254 nm (Absorption des doubles ou triples liaisons entre carbone).

Deux éluants sont utilisés.

- Solvant A : Isopropanol 30% ,TFA 0.1% , H₂O 69,9%
- Solvant B : Isopropanol 90% , H₂O 9.91%, TFA 0.09%

II-4-2- HPLC pour les milieux de sécrétion des cellules entérochromaffines

L'HPLC DIONEX-Ultimate 3000 (nano HPLC) est utilisée dans ce cadre pour séparer les protéines sécrétées par les cellules BON après stimulation et dessalage. Ce système augmente la sensibilité de détection et permet de détecter des quantités de matériel de l'ordre du pictogramme. La colonne utilisée est une colonne C8 Grace (2,1 x 150 mm). La taille des billes est de 5 µm et celle des pores de 300 Å.

Deux solvants sont utilisés.

- Solvant A : TFA 0,1%, H₂O (99,9%)
- Solvant B : Acétonitrile 70%, TFA 0,09% et H₂O 29,91%

II-4-4- HPLC pour les surnageants bactériens

La chromatographie en phase inverse est également utilisée pour analyser l'éventuelle dégradation des peptides antibactériens en présence des bactéries et identifier les nouveaux peptides qui sont générés par dégradation protéolytique. Le système utilisé est le DIONEX-ASI. La colonne est une Macherey Nagel 300–5C18 (4 × 250 mm ; taille des billes 5 µm et celle des pores 100 Å, Düren, Germany). L'élution est obtenue avec un gradient binaire de deux solvants.

- Solvant A : TFA 0,1%, H₂O (99,9%)
- Solvant B : Acétonitrile 70%, TFA 0,09% et H₂O 29,91%

III- Méthodes d'analyse du matériel biologique

III-1- Séquençage peptidique par la méthode automatique d'Edman

III-1-1-Principe

Dans nos expériences, le séquençage est utilisé pour vérifier l'enchaînement d'acides aminés d'un peptide synthétique et le quantifier par comparaison avec un standard. Il est aussi utilisé pour déterminer la structure primaire d'une protéine inconnue. C'est une réaction de dégradation récurrente du peptide en commençant par l'extrémité $-NH_2$ terminale et basée sur la réaction d'Edman avec l'utilisation du phénylthiocyanate (PITC) (Edman, 1950). Les différentes étapes sont présentées sur les figures 46-49.

Le séquenceur utilisé est un Procise (Applied Biosystem 473A Courtaboeuf, France). Tous les produits utilisés pour le séquençage peptidique proviennent de chez Applied Biosystem (Applied Biosystem, Warrington, UK).

Les peptides en solution dans le TFA 0,1% sont déposés sur un filtre en fibre de verre qui a été traité préalablement au polybrène (Biobrene Plus). Les acides aminés qui seront convertis en phénylthiohydantoïne-amino acides (PTH-aas) au cours du séquençage sont chromatographiés par HPLC de phase inverse sur une colonne Spheri-5 PTH C18 (2,1 x 220 mm), granulométrie 5 μ m, La détection des PTH-aas est obtenue à 269 nm. Les éluants sont le solvant A : tétrahydrofurane 3.5% et Premix 2% dans de l'eau et le solvant B, acétonitrile (88%) et propanol (12%).

L'identification des PTHaas se fait par comparaison avec le chromatogramme des PTH-aas standards.

Le séquençage suit trois étapes principales :

Etape 1 : le couplage

Le PITC (réactif d'Edman) réagit avec l'acide aminé N-terminale de la séquence pour produire un phénylthiocarbamyl-amino acide (PTC-aa). La réaction a lieu en présence de la N-méthylpipéridine à pH =8 (Figure 46).

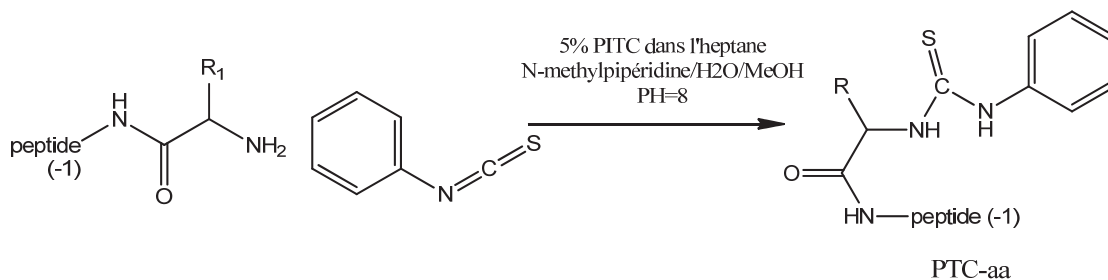


Figure 46 : Etape 1 de séquençage : couplage entre le PITC et le peptide pour donner un phénylthiocarbamyl-amino acide (PTC-aa).

Etape 2 : le clivage

Le clivage a lieu en milieu acide en présence de TFA à 65°C. Le TFA attaque le PTH-aa du côté du n-terminal et provoque sa cyclisation en anilinothiozolinone-acide aminé (ATZ-aa). L'ATZ-aa sera clivé du reste du peptide par le chlorure de butyle pour produire un ATZ-aa et le peptide n-1 (Figure 47).

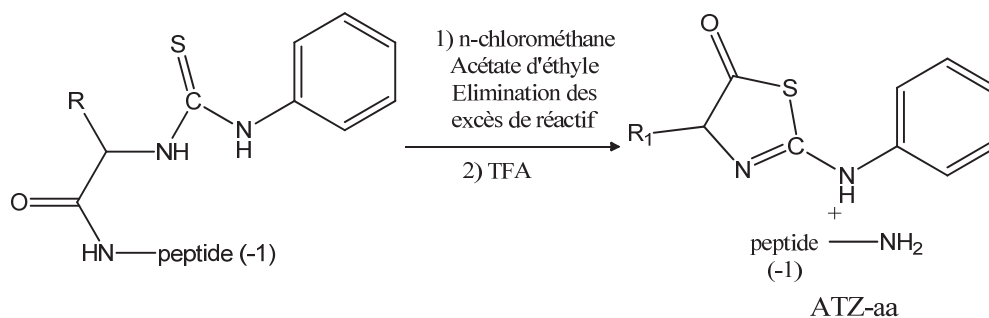


Figure 47 : Etape 2 du séquençage : Cyclisation du PTC-aa et clivage du peptide n-1 par action du TFA.

Etape 3 : la conversion

L'ATZ-aa est un composé très instable. Il est transformé en PTH-aa qui est un composé plus stable en présence de TFA 25% dans l'eau (Figure 48).

A l'issue de cette étape, le PTH-aa est séché et suspendu dans l'acétonitrile 20% dans de l'eau puis transféré vers la colonne HPLC de phase inverse.

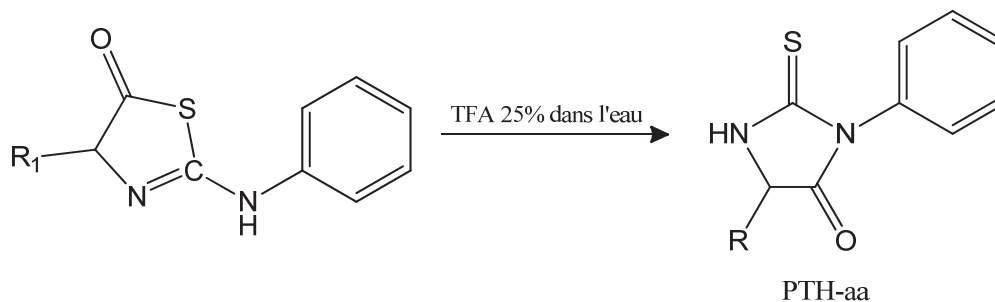


Figure 48 : Etape 3 du séquençage : conversion de L'ATZ-aa en un composé stable le en phénylthiohydantoïne-amino acide (PTH-aa).

Etape 4 : la chromatographie de phase inverse

Le PTH-aa est injecté sur la colonne. Il est élué par un mélange : solvant A (tétrahydrofurane 3.5% et Premix 2% dans de l'eau) et solvant B (acétonitrile (88%) et propanol (12%)). La détection des pics de PTH-aa se fait à 269 nm. Par comparaison avec les PTH-aas standards (Figure 49), les acides aminés du peptide sont identifiés. On peut également évaluer la quantité de peptide pur dans le peptide de synthèse, en comparant la hauteur du pic de l'acide aminé de l'échantillon par

rapport à l'acide aminé correspondant contenu dans le standard dont la quantité est connue (10 pmoles).

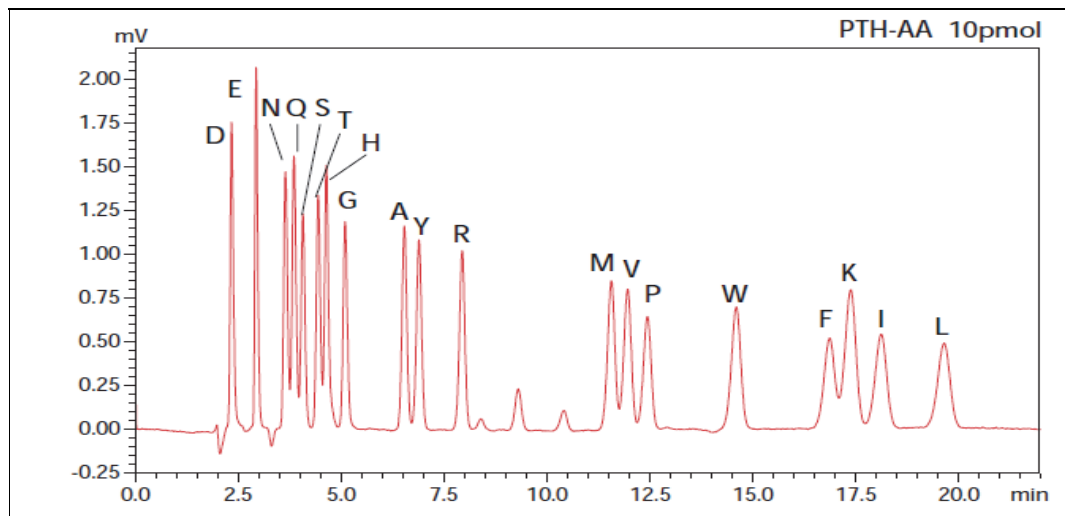


Figure 49 : Profil d'éluion des PTH-aas standards (<http://www.antteknik.com>).

Il est à noter que la cystéine n'est pas détectable si elle n'a pas subi de transformation préalable (réduction/alkylation).

Le séquençage automatique a une sensibilité de l'ordre du picomole.

III-1-2-Méthode expérimentale

Les échantillons à séquencer sont déposés sur un filtre en fibre de verre traité par le biobrène (10 μ l de la solution). Le biobrène (polymère servant à retenir les peptides à séquencer lors de l'extraction par les solvants organiques) est déposé sur les filtres en verre, puis séché. Ce filtre est inséré dans la cartouche, elle-même montée sur le séquenceur. Le programme utilisé est le "*Filter precycle*" et le nombre de cycles est de 3. A la fin de cette opération, le peptide à séquencer (50-1000 pmoles) est déposé sur le filtre traité. Le peptide à séquencer est pesé et dissout dans du TFA 0.1%, H₂O 99,9%.

III-2- Western Blot

- Préparation du gel

Les électrophorèses SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) sont réalisées sur des gels de polyacrylamide à 12 %. Le gel est composé d'un gel de séparation et d'un gel de concentration. Entre les deux plaques de verre parfaitement nettoyées et maintenues dans un support, on coule le gel de séparation. Lorsqu'il est polymérisé, on coule le gel de concentration dans lequel est inséré un

"peigne permettant d'obtenir après polymérisation, les puits dans lesquels seront déposés les échantillons.

Tableau XVII : Volume de solution nécessaire à la préparation d'un gel de séparation et de concentration

	Gel de séparation 12%	Gel de concentration 4%
Acrylamide/ Bisacrylamide 40%	4,5 ml	0,75 ml
<i>Separating buffer</i>	3,75 ml	0
<i>Stacking buffer</i>	0	0,921 ml
H₂O	6,705 ml	5,73 ml
Temed	15 µl	12 µl
Ammonium persulfate 10%	50 µl	50 µl

Tampon de séparation : Tris HCl 0,375 M, SDS 0,1% à pH 8,8

Tampon de concentration : Tris HCl 0,06M, SDS 0,05% à pH 6,8

- Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés en rajoutant un tampon Laemmli concentré deux fois (glycérol 20%, SDS 4%, bleu de bromophénol 0,025%, Tris HCl 126 mM à pH=6,8). Ils sont ensuite dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5min.

- Migration

Les échantillons contenant les protéines dénaturées sont déposés dans les puits des gels. La migration se fait dans le tampon (Glycine 192 mM, SDS 0,1%, Tris HCl 0,025 M, pH=8,2) à 50 V pendant 30 min puis à 120 V jusqu'à migration totale avec une limite d'ampérage à 3A. Un mélange de marqueurs de masses moléculaires connues est déposé pour pouvoir déterminer la masse moléculaire des protéines d'intérêt. Les protéines solubles des granules de sécrétion des cellules chromaffines (PSG) servent de témoin positif pour contrôler la migration, le transfert et l'immunodétection par les anticorps spécifiques.

- Electroransfert

Le transfert est réalisé sous l'effet d'un champ électrique sur des membranes de PVDF 0.22 µM de porosité (Amersham Biosciences, Little Chalfon, UK) à 75 V et 2 A pendant 45 min dans un tampon composé de 10% de TGS, 20% de méthanol, 70% d'H₂O.

- Immunodétection

Les protéines d'intérêt sont immunodétectées par des anticorps spécifiques. La membrane de PVDF est d'abord rincée à l'eau distillée, puis saturée par une solution de BSA (*Bovine Serum Albumin*) à 0.5% (Euromedex, Muldosheim, France), dans du

PBS pendant 1 h à 37°C. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire monoclonal anti-CGA₅₃₋₅₇ puis l'anticorps secondaire ECL anti-mouse IgG (GE Healthcare, Little Chalfond, UK) couplé à la peroxidase du raifort.

- Révélation

La peroxidase de l'anticorps secondaire est allumée par électrochemoluminescence avec le SuperSignal (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoScientific, Rochford, USA). La membrane est mise dans une cassette et recouverte d'un film radiographique à l'obscurité. La révélation du film se fait grâce à une développeuse (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Les protéines reconnues par l'anticorps sont visualisées sous forme d'une bande noire et leur masse moléculaire est déterminée par comparaison à celle des protéines de masses moléculaires connues déposées en même temps sur le gel.

III-3- Coloration au bleu de coomassie- décoloration

Une fois la migration du gel à 12% réalisée, le gel est coloré par une solution de Bleu de coomassie (40% de méthanol, 10% d'acide acétique, 50% d'eau et 1g de Coomassie R 250). Le gel est mis dans la solution pendant 1 h sous agitation puis décolorée plusieurs fois dans la solution de décoloration (7,5% de méthanol, 10% d'acide acétique, 82,5% d'eau). Ce gel sera analysé en spectrométrie de masse par la méthode de Nano LC-MS-MS décrite ci-dessous.

III-4- Analyses nanoLC-MS/MS réalisées avec le couplage NanoAcquity-Synapt

- Hydrolyse trypsique du matériel protéique immobilisé sur gel

Le gel est découpé en 24 bandes de 0.2 mm de hauteur qui sont lavées trois fois avec 50 µl de 25 mM NH₄HCO₃ et 50 µl d'acétonitrile et déshydratés avec 100 µl d'acétonitrile. Puis, on procède à une réaction de réduction en présence de 10 mM de DTT dans 25 mM de NH₄HCO₃ (1 h à 57°C) et ensuite à l'alkylation, en présence de 55 mM d'iodoacétamide dans 25 mM de NH₄HCO₃. Pour la digestion trypsique, les morceaux de gel sont remis en suspension dans 2 volumes de trypsine (12,5 ng/µl) dilué instantanément dans 25 mM de NH₄HCO₃ et incubés une nuit à 37°C. Les peptides digérés sont ensuite extraits du gel par le mélange acétonitrile/eau/acide formique 65% ; 34,9% ; 0,1% et directement analysés par nano LC-MS/MS.

Les analyses nanoLC-MS/MS sont réalisées à l'aide d'une chaîne nanoAcquity (Waters Corp.) couplée à un Synapt (Waters Corp., Millford, MA).

- Système nanoLC NanoAcquity :

Le système HPLC utilisé est une nanoAcquity qui permet de travailler à une pression maximale de 10000 psi avec des colonnes contenant des particules de petit diamètre ($< 2\mu\text{m}$). L'échantillon injecté est concentré et dessalé sur une pré-colonne Symetry C18 (180 μm x 20 mm) de granulométrie 5 μm et de porosité de 100 Å (Waters Corp.) à un débit de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durant 3 minutes par une solution d'eau acidifiée par 0,1 % d'acide formique.

La pré-colonne est ensuite mise automatiquement en ligne avec la colonne analytique. Les peptides sont séparés sur la colonne analytique C18 ACQUITY UPLC® BEH130 (75 μm x 20 cm), de granulométrie 1,7 μm et de porosité 130 Å (Waters Corp.). La phase mobile A est une solution aqueuse à 0,1 % d'acide formique et la phase mobile B est une solution d'acétonitrile acidifiée par 0,1 % d'acide formique. L'élution des peptides est réalisée à un débit de 300 nl/min par un gradient de 1 à 40 % de solvant B durant 35 min à la température de 50°C, puis par 65 % de solvant B durant 5 min. La colonne est ré-équilibrée 10 minutes par une solution A.

- Spectromètre de masse Synapt :

Les analyses MS et MS/MS sont réalisées sur un spectromètre de masse de type Synapt HDMS (Waters Corp.) qui se compose d'une source à ionisation électrospray (Z-Spray) en mode positif, d'un quadrupole, d'une cellule de collision ("T-waves") et d'un tube de vol placé de manière orthogonale. Une tension de 3500 V est appliquée au capillaire et une tension de 35 V au cône. La calibration du spectromètre de masse est réalisée à l'aide d'une solution d'acide phosphorique à 0,01% dans l'eau sur une gamme de masse de 50 à 2000 m/z. Le spectromètre de masse est équipé d'un système dit de « Lock Mass » qui permet d'injecter à des temps définis une référence. La référence choisie est le [Glu¹]-fibrinopeptide B (GFP). L'ion (M+2H)²⁺ de m/z 785,8426 est utilisé pour calibrer les données MS et l'ion (M+H)⁺ de m/z 684,3469 est utilisé pour les données MS/MS.

L'acquisition des données est réalisée selon un programme de basculement automatique du mode MS au mode MS/MS (MS 0,5 sec/scan de 250 à 1500 m/z et MS/MS 0,6 sec/scan de 50 à 2000 m/z). Le programme sélectionne les trois peptides doublement ou triplement chargés ayant les signaux les plus intenses afin de les isoler et les fragmenter. La fragmentation dans la cellule de collision est réalisée dans de l'argon. Le système est piloté par le logiciel MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters Corp.).

Les données obtenues au cours de l'analyse sont traitées et converties en liste de valeur de masse (pkl) exploitable par des logiciels de recherche dans les banques de données. Le traitement est réalisé par ProteinLynx Browser 2.3 (Waters Corp.). Le bruit de fond est soustrait selon un algorithme avec un seuil de 5%

- Paramètres de validation de la performance du système :

La vérification des performances du système HPLC et du spectromètre de masse est réalisée avec 50 fmol de digestion trypsique de sérum albumine bovine. Le système est considéré comme fonctionnel s'il répond aux caractéristiques suivantes en mode MS :

Tableau XVIII : Caractéristiques d'un système fonctionnel en mode MS

m/z	722,33	464,25
Intensité du pic BPI	> 10 ³	> 10 ³
Largeur à mi-hauteur du pic BPI	< 0,15 min	< 0,18 min
Résolution isotopique	> 9000	> 9000

En mode MS/MS le critère de bon fonctionnement du système de masse est un pourcentage de couverture de séquence de la BSA supérieur à 45% selon les paramètres suivants :

- Recherche dans la banque de données SwissProt à partir du moteur de recherche Mascot avec les critères de recherche suivants :
 1. Enzyme : trypsine/P
 2. Miss cleavage : 1
 3. Modifications : carbamidomethyl (C) et oxydation (M)
 4. Etat de charge : +1, +2, +3
 5. Tolérance de masse MS et MS/MS : 25 ppm et 0,05 Da.

III-5- Analyses MALDI –MS (Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF)

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr Jean-Marc Strub du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biorganique (Université de Strasbourg, LSBMO, CNRS UMR 7178).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight*) est une méthode de mesure des rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentation. La spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisée pour déterminer la masse des peptides synthétiques et des peptides issus de la dégradation de nos peptides d'intérêt par des protéases bactériennes.

Les mesures de masse sont réalisées à l'aide du spectromètre de masse MALDI-TOF (Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonics). L'instrument travaille en mode réflectron positif avec une tension de 25 kV appliquée à la cible et une tension 26 kV appliquée au réflectron. La valeur de l'extraction retardée a été optimisée à 110 ns afin d'obtenir la meilleure résolution sur les peptides servant à la calibration. Le laser utilisé est un laser à azote (337 nm) travaillant à une fréquence de 20 Hz. L'acquisition des données est réalisée dans une gamme de masse allant de

400 m/z à 4000 m/z, la valeur de suppression de matrice étant fixée à 500 m/z. Le spectromètre de masse est calibré à l'aide d'un mélange contenant 7 peptides (Bruker Peptide Calibration Standard #206196, Bruker Daltonics) contenant la bradykinine 1-7 (m/z=757,400), l'angiotensine humaine II (m/z=1046,542), l'angiotensine humaine I (m/z=1296,685), la substance P (m/z=1347,735), la bombésine (m/z=1619,822), la rénine (m/z=1758,933) et l'ACTH 1-17 (m/z=2093,087) et ACTH 18-39 (m/z=2465,199). Les spectres de masse obtenus sont traités par le logiciel flexAnalysis 2.4 build 11 (Bruker Daltonics), utilisant les paramètres par défaut et l'algorithme SNAP pour la détection du pic monoisotopique.

Le dépôt de l'échantillon consiste en 0,5 µl d'échantillon et 0,5 µl de matrice qui sont mélangés sur la cible et séchés à pression atmosphérique, selon la technique de la goutte séchée. Deux matrices sont utilisées, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Bruker #203072) et l'acide 2,5 di-hydrobenzoïque (DHB) (Fluka #37550). Une solution saturée de matrice HCCA dans H₂O/ACN (50/50) est diluée trois fois par une solution H₂O/ACN 50/50 acidifiée par 0,1% de TFA. La matrice DHB est préparée à la concentration de 10 mg/ml dans le mélange H₂O/ACN (50/50).

III-6- Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. Elle est couplée à un spectromètre de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément les substances présentes. La méthode de spectrométrie utilisée est l'ionisation par électro-nébulisation (électrospray) (ESI).

Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé. Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air co-axial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable.

Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes d'échantillonnage successifs faisant office de barrières avec

les parties en aval maintenues sous un vide poussé. Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

Les analyses de GC-MS (*Gas chromatography–mass spectrometry*) ont été effectuées en utilisant un chromatographe de gaz Agilent technologies 78901A équipé d'un injecteur et d'une colonne de silice fondue Agilent J&W DB5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) couplé à un spectromètre JEOL Accutof JMS T 100 GCV. Le spectromètre de masse est utilisé en mode d'impact d'électrons à 70 eV, et les spectres sont récupérés dans un interval de masse m/z de 35 à 700 avec un temps de cycle de 0,4 s. La température du four est programmé pour passer de 80 à 300° C à une vitesse de 10°C/ min, puis le four est maintenu isotherme pendant 8 minutes. Les autres conditions sont les suivantes : split hélium, 1:10 ; débit constant, 1 ml/min ; température de la ligne de transfert, 280°C, et température de la source MS, 250°C. Les échantillons ont été injectés avec un auto-injecteur dans le mode split et un ratio de 1:5, la température de l'injecteur est de 280°C.

III-7- RMN

Découverte en 1938 par Isidor Isaac Rabi (Prix Nobel de physique en 1944 pour cette découverte), la résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode permettant la détermination structurale des composés organiques. Elle est basée sur la propriété magnétique de certains atomes dont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , l'azote ^{15}N , le fluor ^{19}F qui possèdent un spin nucléaire dans un champ magnétique.

Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, ces noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement provoquant une perturbation (résonance). Cette énergie est relâchée ensuite et captée par une bobine réceptrice aboutissant ainsi au signal RMN. La RMN a été effectuée par Eric Marchioni et Minje Zhao (Université de Strasbourg, Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives IPHC-LC4, UMR 7178, France). Les analyses effectuées sont :

❖ En monodimensionnelle :

- La RMN proton (^1H) : elle renseigne sur les différents types d'hydrogène présents dans l'échantillon, leur environnement électronique, le nombre d'hydrogène voisin et leur déplacement chimique
- La RMN carbone (^{13}C) : Elle met en évidence les carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2) et tertiaires (CH)

❖ En Bidimensionnelle :

- COSY (^1H - ^1H) pour le couplage homonucléaire entre les protons voisins
- NOESY (^1H - ^1H) qui permet d'observer les corrélations entre proton d'une même molécule
- HSQC ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) pour observer le couplage entre les carbones et les protons directement liés à eux

Les échantillons sont mis en solution dans du CDCl_3 , passés en RMN BRUKER TopSpin 3.0 400 MHz et sur un système RMN BRUKER Avance III 500 MHz. 5 μl sont injectés à l'aide d'une sonde CapNMR™ Protasis Probe Head (Sovoy, IL, USA). Les spectres des molécules identifiées sont comparés à leur standard.

IV- Méthodes de caractérisation des activités biologiques

IV-1-Tests antibactériens

IV-1-1-Préculture bactérienne

La préculture consiste à mettre des bactéries en culture afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. Une préculture de chacune des souches est réalisée en mettant une colonie dans 5 ml de bouillon Mueller Hinton (MHB, Merck, Darmstadt, Germany) sous agitation pendant 18 h à 37°C dans un incubateur (Tritamax 1000, Heidolph, Germany).

IV-1-2- Caractérisation de l'activité antibactérienne

- Préparation de la solution de peptide.

Le peptide est pesé et une solution mère de chaque peptide synthétique purifié est préparée à 1 mM. Elle servira pour la dilution des concentrations à tester. Les tests antimicrobiens sont réalisés sur des microplaques (Falcon, Becton Dickinson, USA).

- Détermination de la CMI du peptide

Pour effectuer le test antimicrobien, une suspension bactérienne à $\text{DO}_{620 \text{ nm}}$ de 0,001 est utilisée. Dans chacun des puits, on dépose 90 μL de suspension bactérienne et 10 μl du peptide 10 fois concentré. Le contrôle positif correspond à 10 μl d'eau stérile et 90 μl de suspension bactérienne et le contrôle négatif à 100 μl de MHB stérile. Les tests utilisent une gamme de concentration de peptide de 10 à 100 μM . La plaque est portée à agitation pendant 18 h dans l'incubateur à 37°C puis la croissance bactérienne est mesurée avec un spectrophotomètre (Multiscan EX, Shanghai, Chine) à 620 nm. La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de peptides pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de bactéries donc la $\text{DO}_{620\text{nm}}$ est égale à celle du contrôle négatif.

IV-1-3-Tests antimicrobiens avec les extraits de plantes

- Préparation de la solution d'extraits de plantes

A partir de 20 mg d'extrait de plantes, la solution-mère est préparée à 20 mg/ml en ajoutant 100 μ l de d'acétone et 900 μ l de d'eau stérile. Les dilutions se font dans le MHB.

- Détermination de la CMI des extraits de plantes

A partir d'une préculture en phase exponentielle de croissance, une suspension bactérienne à 0.001 à $DO_{620\text{ nm}}$ est préparée.

Dans chaque puits, on met 100 μ l de la suspension bactérienne et 100 μ l de la solution d'extraits. La gamme de concentration testée est de 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,625 ; 0,312 ; 0,156 et 0,078 mg/ml. Le témoin de culture, le témoin contrôle du solvant (10% d'acétone), le témoin négatif avec des antibiotiques usuels sont réalisés en parallèle.

La concentration minimale inhibitrice est déterminée par l'utilisation de l'iodonitrotétrazolium (INT) qui est un réactif incolore sous sa forme oxydée. Lors de leur croissance, les bactéries libèrent du NADH dans le milieu. Le NADH réduit l'INT qui devient alors rouge. La réaction à l'INT est basée sur un transfert d'électrons depuis le NADH. Une enzyme bactérienne comme la thréonine déshydrogénase (TDH), catalyse l'oxydation NAD-dépendante de la thréonine pour donner du 2-amino-3-cetobutyrate et du NADH. Ainsi, les puits qui virent au rouge après ajout de l'INT indiquent la croissance bactérienne. La CMI de l'extrait est la plus petite concentration pour laquelle la couleur ne vire pas au rouge après ajout de l'INT. Le mécanisme de la réaction à l'INT est illustré à la figure 50.

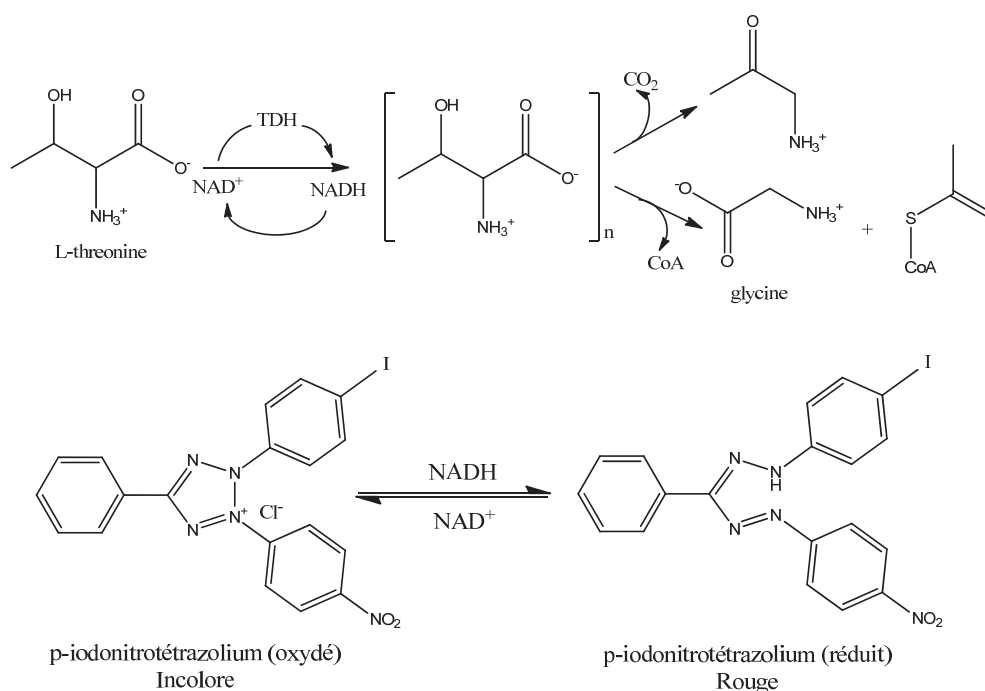


Figure 50 : Mécanisme de réaction de l'iodonitrotétrazolium.

IV-2- Biautographie

IV-2-1- Principe

La bioautographie est une méthode préliminaire de screening (détection) des composés antibactériens d'un extrait ou d'une fraction séparé par CCM. Le principe est basé sur le fait qu'une culture bactérienne coulée sur le gel de silice d'une plaque de CCM permet de détecter les constituants d'un extrait ou d'une fraction ayant une activité antibactérienne après vaporisation d'un réactif colorimétrique l'iodonitrotétrazolium (INT).

IV-2-2- Mode opératoire

L'activité antimicrobienne des plantes sur les bactéries est révélée par culture d'une gélose molle sur la silice de la plaque de CCM et détection des zones d'inhibition par l'INT (Sigma, Steinheim, Germany).

❖ Etape 1 : Préparation de la plaque de CCM

- Dépôt de la fraction sur la plaque de chromatographie
- Migration bidimensionnelle dans les solvants appropriés (Figure 51)
- Séchage toute la nuit.

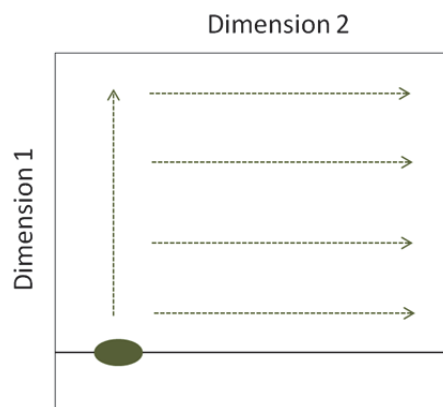


Figure 51 : Séparation bidimensionnelle des extraits sur gel de silice d'une plaque de chromatographie sur couche mince.

La migration de l'extrait se fait dans le solvant $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$ 95 :5 (v/v) (dimension 1) puis la plaque est séchée. La deuxième migration (dimension 2) a lieu dans le solvant $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O} / \text{CH}_3\text{OH} / \text{CH}_3\text{COOH}$ 90 :1:2 (v/v/v).

❖ Etape 2 : Préparation du bouillon bactérien

- Préculture bactérienne à 37°C sous agitation pendant une nuit dans du MHB
- Ensemencement dans une gélose molle à DO₆₂₀/ml de 0.01 (MHB contenant 0,7% agar ; Gibco, Paisley, Scotland)

❖ **Etape 3** : Test de bioautographie proprement dit

- Coulage rapide de la gélose molle sur la plaque de silice
- Incubation de la plaque de CCM dans une enceinte à 100% d'humidité relative à 37°C pendant 18 h
- Vaporisation de la plaque de CCM par l'INT à 1 mg/ml
- Séchage 1 h à 37°C

Les zones claires indiquent les zones où il y a inhibition de la croissance bactérienne.

IV-3-Combinaison peptide-antibiotique

IV-3-1- But

Le but de ce test est de montrer que les PAMs étudiées dans ce travail permettent de diminuer les doses d'antibiotiques pour prévenir les résistances et réduire les effets secondaires indésirables des antibiotiques.

Des antibiotiques sont choisis pour être testés sur chacune des quatre souches bactériennes étudiées : la minocycline (MIN, EG Labo, France), la ciprofloxacine (Panpharma, France), la céfotaxime (Sigma, Steinheim, Germany), la pénicilline (Sigma, Steinheim, Germany), pour *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* et la tétracycline (Sigma, Steinheim, Germany), la streptomycine (Sigma, Steinheim, Germany), la céfotaxime et la minocycline pour *Vibrio cholera*.

La CMI de chacun des antibiotiques est déterminée suivant la même méthode que pour les peptides dans les conditions expérimentales décrites préalablement. Une fois celle-ci déterminée, l'étude de l'effet combiné du peptide et de l'antibiotique est faite en utilisant des concentrations inférieures à la CMI. Le peptide choisi pour ces tests est la cateslytine bovine car ayant la meilleure activité. L'antibiotique choisi pour les combinaisons est la minocycline, car elle a une CMI élevée d'où l'intérêt de la diminuer. La pénicilline, la ciprofloxacine et la céfotaxime ont des CMI assez faible donc il n'est pas intéressant de vouloir en diminuer les doses. En outre, *Klebsiella* est naturellement résistante aux pénicillines.

Les associations testées sont les suivantes :

- $\frac{1}{2}$ CMI_{MIN} + 10 µM de cateslytine
- $\frac{1}{2}$ CMI_{MIN} + 25 µM de cateslytine

- $\frac{1}{4}$ CMI_{MIN} + 10 μ M de cateslytine
- $\frac{1}{4}$ CMI_{MIN} + 25 μ M de cateslytine

IV-3-2- Mode opératoire

Les tests sont effectués sur des microplaques.

Les résultats des tests permettent de déterminer l'action du peptide combiné à celle de l'antibiotique. Ces effets ont été décrits pour des combinaisons d'antibiotiques par EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Nous l'adaptions ici aux combinaisons peptides-antibiotiques.

L'effet de la combinaison du peptide et de l'antibiotique est déterminé par le calcul de l'indice CFI (concentration fractionnaire inhibitrice). C'est le rapport des concentrations inhibitrices obtenues pour un antibiotique lors de la combinaison avec un autre antibiotique (peptide dans notre cas) à la CMI du germe à l'antibiotique pris séparément.

En notant l'antibiotique A et le peptide P, nous pouvons écrire

$$CFI_A = \frac{\text{CMI}_A \text{ en présence de P}}{\text{CMI}_A} \qquad CFI_P = \frac{\text{CMI}_P \text{ en présence de A}}{\text{CMI}_P}$$

Tableau XIX : Corrélation entre l'indice CFI et l'effet des combinaisons peptides-antibiotiques (Eucast, 2000).

Effet	Synergie	Additive	Indifférent	Antagonisme
Indice CFI	≤ 0.5	0.5-1	1-2	≥ 2

- Effet synergique : si l'effet de la combinaison est supérieur à la somme des effets de chaque constituant.
- Effet additif : si l'effet de la combinaison est égal à la somme des effets de chacun des constituants.
- Effet indifférent : si l'effet de la combinaison peptide-antibiotique est égal à l'effet du plus actif des composés
- Effet antagonisme : si l'effet de la combinaison est plus faible que l'effet du constituant le plus actif de la combinaison.

IV-4- Cinétique d'action du peptide et du couple Peptide-Antibiotique

Le but de ce travail est de comprendre comment le PAM étudié agit sur la croissance des bactéries et quelle est son action en présence d'un antibiotique.

Nous avons donc réalisé une étude cinétique pour contrôler le devenir du peptide en présence des bactéries et son comportement lorsqu'il est associé à l'antibiotique. Pour ce faire, une étude cinétique est réalisée.

Cinq conditions sont testées :

- Le témoin : MH + bactérie
- MH + bactéries + CMI de la minocycline
- MH + bactéries + à $\frac{1}{2}$ CMI de cateslytine
- MH + bactéries + $\frac{1}{2}$ CMI de de la minocycline
- MH+ bactéries + $\frac{1}{2}$ CMI de la minocycline+ $\frac{1}{2}$ CMI de cateslytine

Les cultures sont effectuées à 37°C sous agitation.

La DO à 620 nm est mesurée aux temps t=1 h, 2 h, 4 h, 8h et 24h.

Les surnageants bactériens sont également analysés par HPLC à ces différents temps pour les conditions MH + bactéries + à $\frac{1}{2}$ CMI de cateslytine et MH + bactéries + $\frac{1}{2}$ CMI de la minocycline+ $\frac{1}{2}$ CMI de cateslytine.

IV-5-Dégradation protéolytique

Afin de comprendre pourquoi certains peptides antibactériens sont actifs et d'autres pas sur les souches d'intérêt, nous avons analysé les surnageants bactériens en présence de ces peptides.

Les peptides testés sont la procatestatine bovine (bCGA₃₃₂₋₃₆₄), la catestatine bovine (bCGA₃₄₄₋₃₆₄), la cateslytine bovine (bCGA₃₄₄₋₃₅₈) et la chromofungine (bCGA₄₇₋₆₆). Une préculture est réalisée pour chacune des souches (*K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei*, *V. cholera*) Un test antimicrobien est réalisé à partir d'une suspension à DO₆₂₀ de 0.001 (témoin) et en présence du peptide 100µM. Après 18 h de culture à 37°C sous agitation, la culture est arrêtée. Le bouillon bactérien est centrifugé à 15.000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est injecté en HPLC de phase inverse sur une colonne Macherey Nagel 300–5C18 (4 × 250 mm ; taille des billes 5 µm et taille des pores 100 Å) à température ambiante avec un débit de 0,7ml/min. Les éluants utilisés sont :

- Solvant A : TFA 0.1% ,H₂O (99,9%)
- Solvant B : Acétonitrile 70%, TFA 0,09% et H₂O 29,91%

Le débit est de 0,7 ml/ min et le gradient est indiqué sur le chromatogramme.

Les différents pics correspondants au peptide ou à sa dégradation (déterminés par comparaison avec un profil chromatographique du peptide pur et de la culture témoin) sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et les séquences sont recherchées à l'aide du logiciel Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

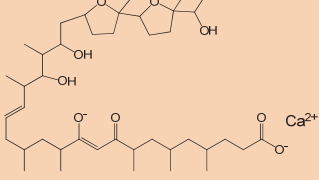
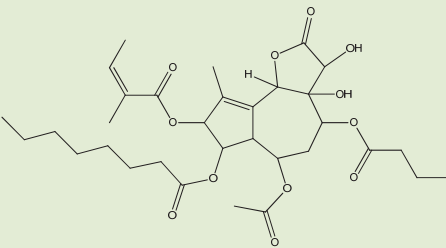
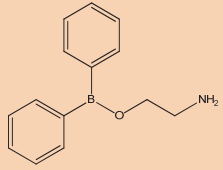
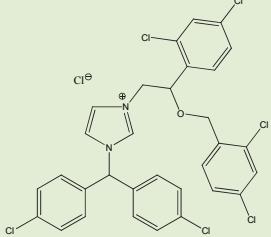
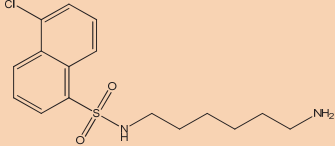
V-Analyse par microscopie

V-1-Microscopie calcique

L'imagerie calcique a été réalisée afin de déterminer si des peptides dérivés de la chromogranine A, notamment la catestatine et la chromofungine peuvent induire une entrée de calcium dans les cellules entérochromaffines. Ces expériences ont été effectuées sous la supervision du Dr Jean de Barry (Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UPR3212, Strasbourg, France).

Les cellules sontensemencées dans des boîtes à fond de verre à une densité de $5 \cdot 10^4$ à 10^5 cellules par ml pendant une nuit. Les boîtes à fond de verre ont été préalablement traitées avec du collagène (0,1% (w/v) et de la polyornithine (0,1 mg/ml) (Sigma, Steinheim, Germany) afin de permettre une bonne adhésion des cellules. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec le tampon composé de 140 mM de NaCl, 1,2 mM de $MgSO_4$, 1mM de $CaCl_2$, 11,10 mM de D-glucose, 1% (m/v) de BSA 10 mM de HEPES à pH 7,4 (Germano, 2009). Les cellules sont ensuite incubées 20 min à 37°C et 100% d'humidité relative avec 2 μ M de Fura-2-AM (Invitogen, Paisley, Scotland) et 2 μ L d'acide pyrrolidique (Interchim, Montluçon, France). Les cellules sont lavées trois fois avec le tampon afin d'éliminer l'excès de fura et les liaisons non spécifiques. Elles sont incubées encore 20 min avec 1 ml de tampon puis la boîte est placée sur le microscope inversé (Axiovert 35M Zeiss, Germany) successivement illuminé à 350 ± 10 nm et 380 ± 10 nm. Les cellules sont stimulées avec divers sécrétagogues (Tableau XX) pendant 20 min. Les images sont enregistrées par l'intermédiaire d'une caméra CCD (ImageEM™, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Le rapport de l'absorbance obtenue à 350 nm et 380 nm est calculé par le logiciel Metafluor™ (Molecular Devices, Downington, USA). Ce rapport traduit l'entrée de calcium dans les cellules.

Tableau XX : Sécrétagogues utilisés pour déterminer le mécanisme d'action de la catestatine et de la chromofungine sur les cellules BON.

Nom	Structure	Action	Dose
Ionomycine		Témoin positif Induire un influx de calcium par augmentation de la concentration intracellulaire de calcium	2 μM
Catestatine bovine	RSMRLSFRARGYGFRGPGPQL	A déterminer sur les cellules BON	10-20-40 μM
chromofungine	RILSILRHQNLKELQDLAL	A déterminer sur les cellules BON	10-20-40 μM
Thapsigargine (TG)		Inhibiteur spécifique des ATPases- Ca^{2+} SERCA (protéines membranaires qui pompent le calcium à l'intérieur du réticulum	100 μM
2-aminophenyl borate (2-APB)		Inhibiteur des récepteurs iP_3 et des TRP Induit la libération des stocks de calcium intracellulaire	100 μM
Calmidazolium (CMZ)		Inhibiteur de la calmoduline	(2 μM)
N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7)		Inhibiteur de la calmoduline	(5 μM)

V-2- Microscopie confocale

La microscopie à balayage laser permet d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3 μm dans la préparation et d'enregistrer la fluorescence émise dans un seul plan. Cette technique permet de s'affranchir de la fluorescence parasite, émise par les plans extrafocaux inférieur et supérieur et enregistrée en microscopie confocale conventionnelle. De plus, il est possible de réaliser des doubles marquages. Nous

avons utilisé un microscope Zeiss (LSM 510 invert) équipé d'un objectif à immersion (x 63). La rhodamine est excitée à l'aide d'un laser hélium/néon à 543 nm et émet à 595 nm. L'orange 548 est excitée à 548 nm et émet à 565 nm. Les expériences de microscopie confocale ont été réalisées en collaboration avec le Dr Sylvette Chasserot (Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UPR3212, Strasbourg, France).

Pour étudier les interactions entre les peptides testés et les cellules BON, les cellules (10^4 cellules) ont été mises en culture dans des Labtek préalablement traités à la polyornithine (0,1 mg/ml) pendant 24 h.

Les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon Locke normal et incubées le temps voulu à la concentration du peptide déterminée. Les cellules sont relavées trois fois avec le tampon puis incubées 10 min dans du paraformaldéhyde (PFA) qui sert à fixer les cellules. Après trois lavages, les cellules sont traitées pendant 15 min dans le Draq 5 (Biostatus Limited., Leicestershire, UK) dilué au 1/500. Trois lavages rapides sont encore effectués et les puits de Labtek sont remplis de PBS pour éviter le séchage des cellules.

Les cellules sont visualisées au microscope.

VI- Méthodes informatiques et bioinformatiques

Les séquences protéiques obtenues par nano LC-MS/MS sont recherchées dans le portail des ressources bioinformatiques EXPASY (<http://expasy.org/>) dans les banques de données : UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>), pour la détermination des séquences et des points de clivage des protéines ; Mass search (http://www.cbrg.ethz.ch/services/MassSearch_new) et Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) ou Peptide mass (http://web.expasy.org/peptide_mass/) pour la détermination des masses moléculaires des protéines.

L'identification et la détermination des fonctions des protéines isolées par nano LC-MS/MS dans les bases de données sont obtenues respectivement par Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) et Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

Les structures chimiques ont été réalisées avec ChemBioDraw Ultra 12.0.

Les prédictions de structure des molécules actives extraites des plantes sont réalisées dans la base de données NIST (<http://www.nist.gov/index>).

Les résultats des tests de cinétique sont traités par Excel 2010.



Partie 3 :



Résultats & Discussion



Chapitre I : Interactions Peptides-Bactéries

I- Résultats

I-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides

Plusieurs peptides dérivés des chromogranines A, B, C et de l'ubiquitine ont été testés sur quatre souches pathogènes : *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera non O1* qui sont responsables d'infections intestinales afin d'identifier de nouveaux agents antibactériens. Nous nous sommes par la suite focalisés sur 2 peptides de la CGA, afin de comprendre les interactions Peptides-Bactéries. Il s'agit de la chromofungine CGA₄₇₋₆₆ et de la catestatine bovine bCGA₃₄₄₋₃₆₄ avec sa forme précurseur (la procatestatine bovine bCGA₃₃₂₋₃₆₄) et son domaine actif (la cateslytine bovine bCGA₃₄₄₋₃₅₈). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XXI pour ces peptides d'intérêt et dans les tableaux I' à IV', des Résultats Supplémentaires 1 pour ces autres peptides.


Tableau XXI : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice de 4 peptides dérivés de la CGA.

Concentration minimale inhibitrice (CMI en μM) de la Procatestatine, de la Catestatine, de la Cateslytine et de la Chromofungine sur quatre souches responsables de diarrhées. Les CMI ont été déterminées par mesure du milieu de culture après 18 h de croissance au spectrophotomètre à DO 620 nm. La séquence et la charge de chacun des peptides sont indiquées.

	CMI (μM)			
	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholera</i>
Catestatine CGA ₃₄₄₋₃₆₄ RSMRLSFRARGYGFRGPGPQL (+5)	100	100	50	>100
Cateslytine CGA ₃₄₄₋₃₅₈ RSMRLSFRARGYGFR (+5)	50	50	25	75
Procatestatine CGA ₃₃₂₋₃₆₄ LEGEEEEEDPDRSMRLSFRARGYGFRGPGPQL (-4)	>100	>100	>100	>100
Chromofungine CGA ₄₇₋₆₆ RILSILRHQNLKELQDLAL (+2)	>100	>100	>100	>100

I-2- Etude de l'interaction entre les peptides et les bactéries

Une fois l'activité des peptides déterminée, notre but a été de comprendre la différence d'efficacité des peptides sur les souches sélectionnées. L'activité des protéases bactériennes sur chaque peptide a été étudiée en observant la dégradation du peptide en RP-HPLC. Les nouveaux peptides générés ont été caractérisés par spectrométrie de masse



MALDI-TOF et à l'aide de Expasy (<http://expasy.org/>). Les résultats montrent que les bactéries sont capables de cliver les peptides pour les rendre inefficaces. Cependant, la cateslytine est le peptide qui résiste le mieux aux dégradations par les protéases bactériennes (Figure 52 et Tableau XXII). Des contrôles ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les profils chromatographiques de chacune des 4 souches après 18h de croissance dans le MH et le MH seul. Le chromatogramme obtenu pour le MH est donc utilisé comme témoin.



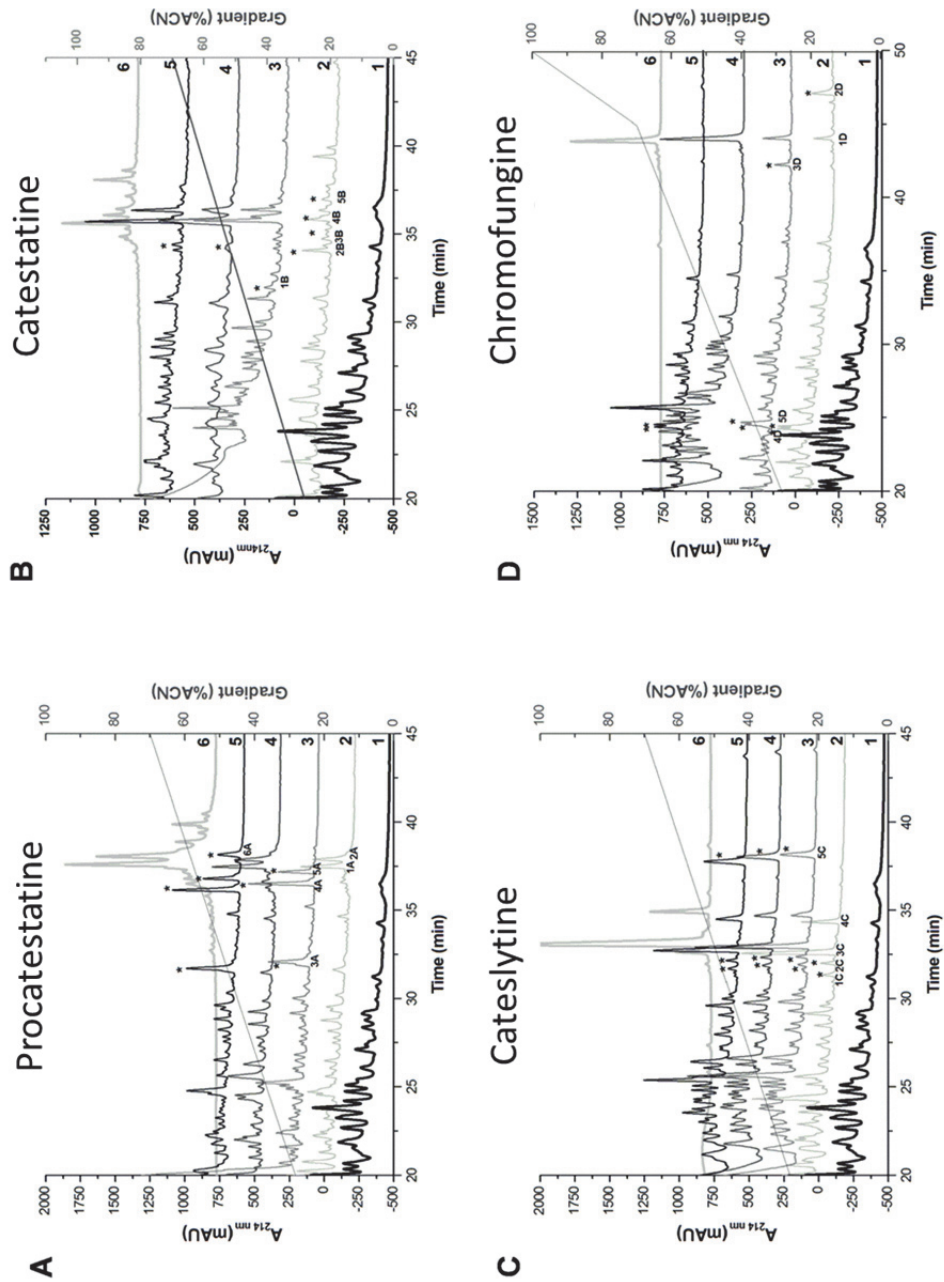


Figure 52: Analyse par RP-HPLC des surnageants bactériens

Analyse par RP-HPLC des surnageants bactériens de *K. oxytoca* (A2, B2, C2, D2), *S. enterica* (A3, B3, C3, D4), *S. sonnei* (A4, B4, C4, D4) et *V. cholerae* (A5, B5, C5, D5) en présence des peptides Procatestatine (A6), Catestatine (B6), Cateslytine (C6) et Chromofungine (D6) et par comparaison au témoin (Bactérie dans du MH : A1, B1, C1, D1). Les lettres A, B, C et D désignent respectivement la procatestatine, la catestatine, la cateslytine et la chromofungine. Les nouveaux pics apparaissant sont marqués d'une étoile et numérotés. Le système utilisé est une HPLC Dionex (Germering, Germany), la colonne est une C18 Nucleosil 300-5 (Macherey Nagel, Düren, Germany) (4×250 mm, taille des particules 5 µm, porosité 300 Å). La phase mobile est constituée de deux solvants : solvant A- 0,1% d'acide trifluoroacétique dans H₂O (v/v) et solvant B- 0,09% d'acide trifluoroacétique dans 70% d'acétonitrile et 29,91% de H₂O (v/v/v). Le volume d'élution est de 0,7 mL/min et le gradient est schématisé en gris et la détection est faite à λ=214 nm.

Tableau XXII : Identification des nouveaux peptides générés.

Identification des nouveaux peptides générés par la dégradation du peptide par les protéases bactériennes. Les surnageants bactériens en présence des peptides sont analysés par RP-HPLC en phase inverse, les nouveaux pics identifiés sont collectés et pesés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les séquences peptidiques sont identifiées à l'aide de la banque UniProtKB/Swiss-Prot. Les flèches représentent les points de clivage identifiés avec les quatre souches utilisées.

	Numéro du pic	Séquence	Masse (Da)
Procatostatine	1A	Leu332-Leu 364	3827
	2A	Leu332-Leu 364+ H ⁺	3828
bovine	3A	Leu 332- Arg353	2680
bCGA ₃₃₂₋₃₆₄	4A	Asp343-Arg351	1167
3827,1 Da	5A	Asp343-Arg351-2H ⁺	1165
		Leu332-Glu340+1O	1108
	6A	Gly354-Leu364	1164

332	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ LEGEEEEEDPDRSMRLSFRARGYGFRGPGQLQ	364
-----	--	-----

Catestatine	1B	Ala352-Gln363	1278
bovine		Gly354-Leu364	1164
bCGA ₃₄₄₋₃₆₄	2B	Arg344-Tyr355	1499
2425,8 Da		Arg344-Gly356	1556
	3B	Arg344-Gly361	2071
		Arg344-Arg353+ 1O	1052
		Ser345-Arg358	1858
	4B	Arg344-Leu364+ 1O	2441
	5B	Arg344-Leu364	2426

344	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ RSMRLSFRARGYGFRGPGQLQ	364
-----	---	-----

Cateslytine	1C	Arg344-Arg358+1O	1876
bovine	2C	Leu348-Phe 357	1173
bCGA ₃₄₄₋₃₅₈	3C	Arg344-Arg358	1859
1860,1 Da	4C	Ser345-Arg358+ 1O	1745
	5C	Ser349-Arg353	637

344	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ RSMRLSFRARGYGFR	358
-----	---	-----

Chromofungine	1D	Arg47-Leu66	2386
bCGA ₄₇₋₆₆	2D	-	-
2386,8 Da	3D	Arg47-Glu60	2386
		His54-Leu66	1534
	4D	Arg53-Lys59	909
		Leu52-Leu58	893
	5D	Gln55-Leu66	1396
		Gln55-Gln62	984
		Ile48-Arg53	713
		His54-Lys59	753

47	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ RILSILRHQNLLKELQDLAL	66
----	--	----

I-3- Etude de l'effet la combinaison de la cateslytine et de la minocycline

Les peptides sont actifs à des concentrations supérieures à 20 μM . Aussi, la dernière étape de ce travail a été d'étudier le peptide en association avec un antibiotique, la minocycline. L'ajout du peptide potentialise l'activité de l'antibiotique et permet de réduire les doses d'antibiotiques (Figure 53).

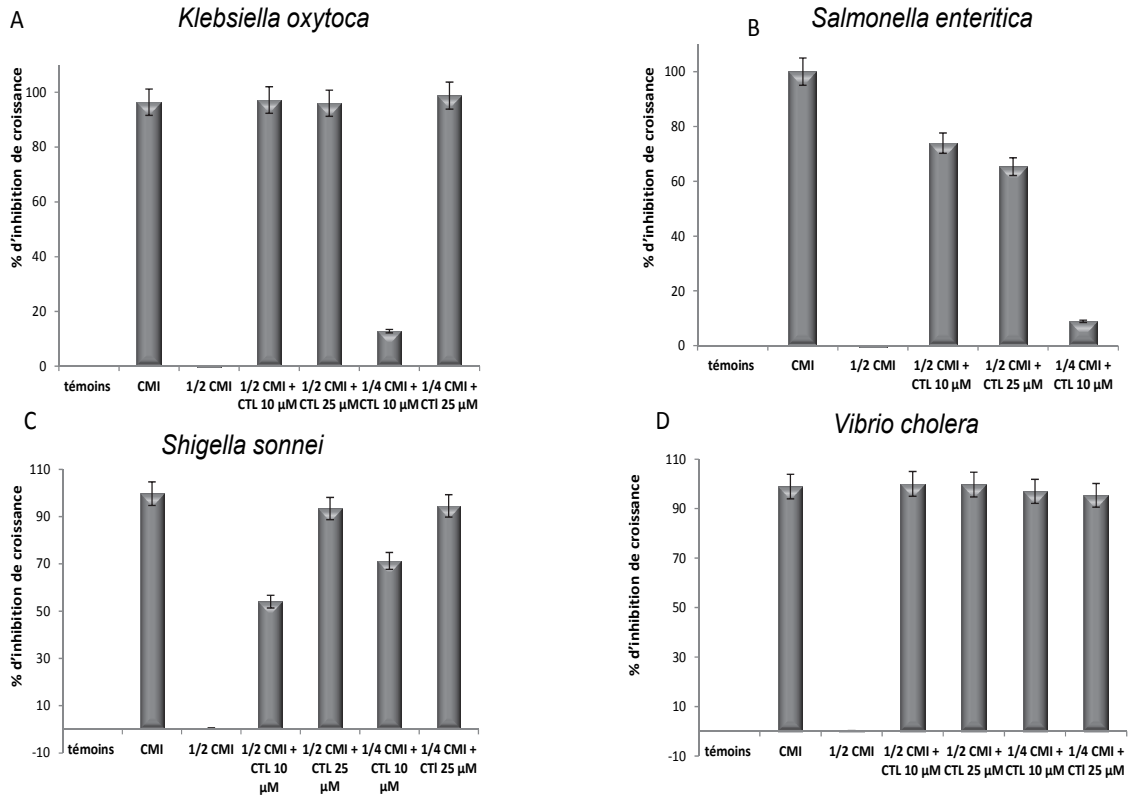


Figure 53 : Activité antibactérienne de la combinaison de la cateslytine et de la minocycline

Activité antibactérienne de la combinaison de la cateslytine et de la minocycline à différentes concentrations indiquées en abscisse. Le pourcentage d'inhibition de croissance a été calculé grâce aux données obtenues par lecture au spectrophotomètre à $\lambda=620$ nm, des milieux dans les différentes conditions (témoins : bactéries dans MH). La CMI désigne ici la CMI de la minocycline. Les lettres A, B, C et D désignent respectivement *K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei* et *V. cholera*.

La cinétique de croissance des bactéries en absence d'agents antimicrobiens ou en présence de la moitié de la CMI de l'antibiotique seul ou en association avec la moitié de la CMI de CTL a été réalisée (Figure 54) et montre que l'addition de CTL à la minocycline améliore l'action de l'antibiotique.

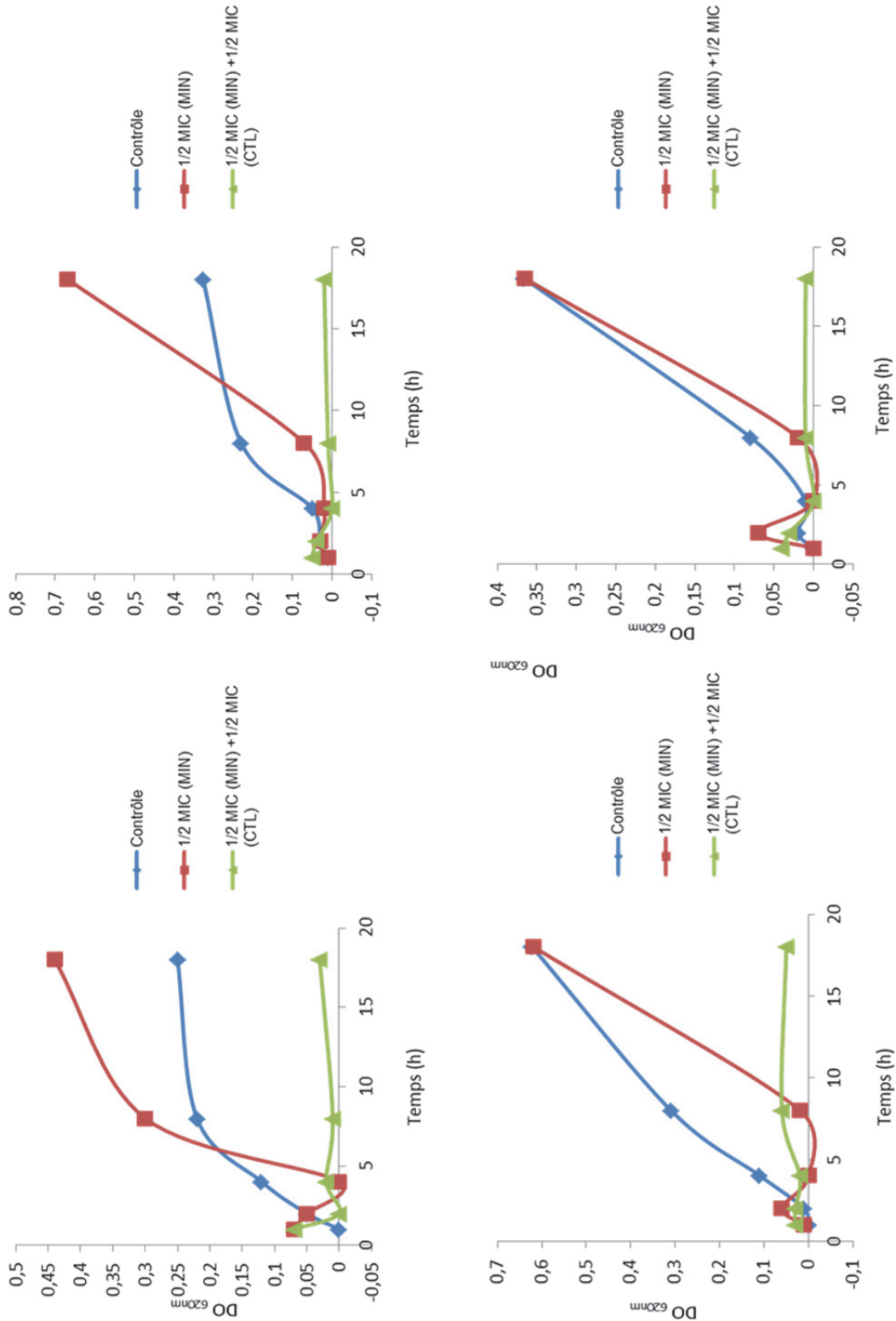


Figure 54 : Etude cinétique de l'action de la combinaison de la minocycline et de la cateslytine

Etude cinétique de l'action de la combinaison de la minocycline et de la cateslytine aux doses de 1/2 de la CMI de l'antibiotique et du peptide. Les DO sont mesurées à 1, 2, 4, 8 et 18h. Les lettres A, B, C et D désignent respectivement *K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei* et *V. cholera*.

L'analyse par RP-HPLC des surnageants au cours de cette cinétique montre qu'au bout de 8 h, il n'y a pas de dégradation du peptide par les protéases bactériennes en présence ou en absence de la minocycline. Par contre après 18 h en présence de la bactérie, CTL (concentration à la moitié de la CMI) est complètement dégradé dans le milieu où il n'y a pas de minocycline. L'étude avec *K. oxytoca* est présentée à titre d'exemple car ce résultat a été observé aussi pour les autres bactéries (Figures 55).

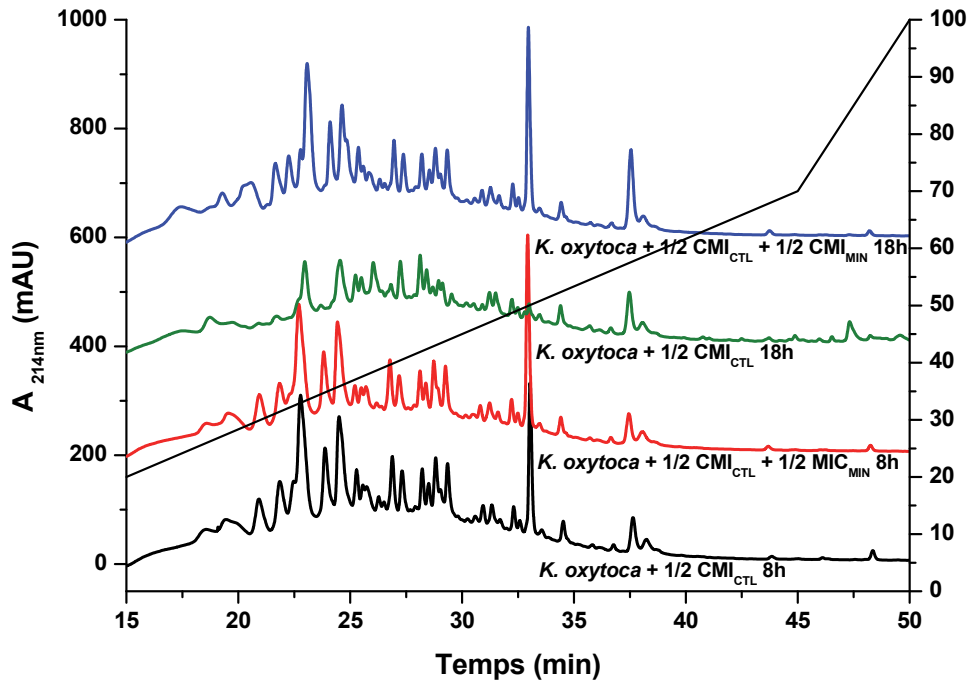


Figure 55 : Analyse du surnageant bactérien en présence de la minocycline

Analyse du surnageant bactérien des milieux contenant la cateslytine seul ou la cateslytine et l'antibiotique aux doses de $\frac{1}{2}$ de la CMI au temps $t=8h$ et $t=18h$. Le système utilisé est une RP-HPLC Dionex (Germering, Germany), la colonne est une C18 Nucleosil 300-5 (Macherey Nagel, Düren, Germany) (4×250 mm, taille des particules $5 \mu m$, porosité 300 \AA). La phase mobile est constituée de deux solvants : Solvant A- 0,1% d'acide trifluoroacétique dans H_2O (v/v) et Solvant B- 0,09% d'acide trifluoroacétique dans 70% d'acétonitrile et 29,91% de H_2O (v/v/v). Le volume d'élution est de 0,7 mL/min et le gradient est schématisé en noir. La détection est obtenue à $\lambda=214$ nm

II- Discussion des résultats

L'apparition de nombreuses souches bactériennes résistantes aux agents antibiotiques conventionnels incite à identifier de nouvelles sources d'antimicrobiens. A cet effet, plusieurs sources sont explorées par les chercheurs : les peptides antimicrobiens que nous explorons ici, les plantes que nous décrivons dans un deuxième article, les bactériophages et les peptides mimétiques dont le concept a été expliqué dans les données bibliographiques de ce document.

Notre étude s'est penchée sur le rôle des peptides antimicrobiens dans le cadre d'infections intestinales. Les résultats obtenus par nos expériences montrent que certains peptides dérivés de la CGA notamment la catestatine (CAT, bCGA₃₄₄₋₃₆₄) et son fragment actif la cateslytine (CTL, bCGA₃₄₄₋₃₅₈) ont une activité antibactérienne sur au moins trois des quatre souches étudiées (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera*). Ces activités sont produites par des concentrations de peptides variant entre 50 et 100 μM (Tableau XXI). Nous pouvons d'autre part constater qu'il y a un facteur 2 entre l'activité de la catestatine et celle de la cateslytine. Cette différence d'activité peut être liée au fait que la catestatine possède dans sa structure, une proline qui peut induire la formation des isomères ayant des activités différentes. Cette hypothèse se justifie par l'obtention de plusieurs pics pour la purification de la catestatine en RP-HPLC (les masses de chacun de ces pics ont été vérifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF).

Deux autres peptides testés dans notre travail sont la procatestatine (ProCAT, bCGA₃₃₂₋₃₆₄) et la chromofungine (CHR, CGA₄₇₋₆₆). ProCAT est le fragment précurseur de CAT mais elle ne présente pas d'activité sur les bactéries testées pour des concentrations inférieures ou égales à 100 μM . Ses résultats sont à relier au fait que ProCAT est riche en acide glutamique, ce qui lui confère une charge négative (-4) (Tableau XXII) alors que la charge positive des peptides est importante pour l'interaction avec les lipopolysaccharides bactériens chargés négativement. De plus, d'autres études ont montré que pour être actifs, les peptides antimicrobiens doivent posséder une certaine conformation amphipathique. S'agissant de CHR, aucune activité n'a été retrouvée sur les bactéries pour des concentrations inférieures ou égales à 100 μM . A priori, on aurait pu s'attendre à ce que CHR soit active sur les bactéries du fait de sa charge positive (+2). L'étude de l'interaction entre les peptides et les bactéries par RP-HPLC a permis de montrer que CHR est dégradée par les protéases bactériennes ce qui explique son absence d'activité. L'analyse de cette dégradation a été obtenue par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour identifier les fragments générés à l'aide d'Expasy. Il en résulte également que parmi, les peptides étudiés, c'est CTL, le peptide le plus actif qui résiste le mieux à la dégradation protéolytique. Cette étude montre que les peptides sont sensibles à l'action des protéases, il est par conséquent nécessaires de les protéger. Différentes méthodes sont décrites dans la littérature : les techniques de "drug design" décrites

dans les données bibliographiques ou encore l'amidation de l'extrémité –COOH (nous avons montré que l'ubifungine Ubi₆₅₋₇₄ amidée est trois fois plus active que son homologue non amidé sur *Vibrio cholera* (Tableau IV', Résultats supplémentaires 1)).

Les CMI des peptides sont de l'ordre de 25 à 100 µM. Ce sont des concentrations assez élevées et nous avons proposé d'utiliser les peptides comme adjuvants pouvant potentialiser l'activité des antibiotiques. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps testé plusieurs antibiotiques : céfotaxime, pénicilline, streptomycine, ciprofloxacine, tétracycline (Tableau V', Résultats supplémentaires 1). Nous avons retenu la minocycline pour la suite des tests car elle présente des CMI moyennes (2 à 4 µg/mL) qu'il serait intéressant de diminuer à cause des effets toxiques telles que les diarrhées post-antibiotiques, l'inflammation articulaire, les nausées migraines...

Les tests de détermination de l'activité de la cateslytine avec la minocycline ont montré que la cateslytine permet de réduire les doses d'antibiotiques de deux à quatre fois la dose nécessaire (Figure 3 et 4). La détermination du type d'activité (additive, synergique, indifférente ou tolérante) de cette combinaison, en accord avec le protocole décrit par le comité européen sur les tests de susceptibilité aux antimicrobiens (EUCAST) montre que la combinaison cateslytine-minocycline a un effet synergique sur *Vibrio cholera* et additif sur les autres souches testées. Des résultats similaires ont déjà été obtenus dans la littérature pour d'autres combinaisons peptides- antibiotiques (exemple de la Cryptidine 2 et de l'ampicilline sur *Salmonella enterica*). Cela permet de justifier l'usage des peptides antimicrobiens en combinaison avec des antibiotiques permettant ainsi de réduire les coûts, les effets délétères et l'apparition de souches résistantes.

En étudiant la cinétique d'action de cette combinaison, nous avons montré que la minocycline joue également un rôle protecteur du peptide. En effet, après incubation pendant 18 h, le peptide à une concentration de 25 µM est complètement dégradé par les bactéries tandis que dans un milieu en présence de la moitié de la CMI de la minocycline, le peptide n'est pas dégradé (Figure 55). Un mécanisme plausible peut-être décrit pour ce résultat. En effet, la minocycline est un antibiotique qui empêche la synthèse protéique par fixation à la sous-unité 30S du ribosome. CTL agit en perméabilisant la membrane bactérienne. Des études antérieures ont montré que les peptides ont un mode d'action très rapide, puisqu'au bout de deux minutes, les peptides sont retrouvés à l'intérieur des champignons. On peut supposer que le peptide agit en premier par une perméabilisation de la membrane bactérienne et une entrée plus rapide de la minocycline. Cette dernière une fois à l'intérieur de la cellule va se fixer sur la sous-unité 30S du ribosome et inhiber la synthèse des protéines parmi lesquelles, les protéases. Ainsi, les protéases n'étant pas synthétisées, le peptide ne sera pas dégradé.

En conclusion, cette étude a permis d'identifier deux peptides dérivés de la CGA, la catestatine et la cateslytine, actives sur des souches pathogènes responsables d'infections intestinales. L'étude de la dégradation des peptides par les protéases montre qu'il serait utile de protéger les peptides pour en augmenter encore plus l'efficacité antimicrobienne. La CTL résiste à la dégradation par les protéases bactériennes. Nous avons également mis en évidence le rôle potentialisant de CTL vis-à-vis de la minocycline et le rôle protecteur de la minocycline vis-à-vis de CTL. Cette association cateslytine-minocycline permet de réduire les doses nécessaires au traitement, réduisant ainsi la toxicité et les effets délétères liés à l'antibiotique. Cette synergie d'action pourrait également être utilisée dans les cas de résistance aux antibiotiques car le peptide permet un meilleur accès de l'antibiotique à sa cible. Nous proposons donc cette association peptide-antibiotique comme une piste prometteuse dans la recherche de nouveaux antimicrobiens. Une autre piste que nous voulons explorer dans ce cadre, est celle des antimicrobiens isolés de plantes médicinales.

En perspective, il serait intéressant d'examiner si l'effet protecteur de la minocycline sur la cateslytine est reproduit pour d'autres types d'antibiotiques et appliquer ces résultats à des modèles *in vivo*.

Ce travail a donné lieu au manuscrit 3, présenté et discuté en annexe et qui sera soumis à **Antimicrobial Agent Chemotherapy**.

Résultats supplémentaires

Tableau I : Détermination sur microplaques de la concentration minimale inhibitrice de peptides dérivés de la CGA sur *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Après 24h à 37°C sous agitation, la CMI est lue au spectrophotomètre à 620 nm par comparaison avec le témoin.

Peptide	Séquence	CMI (µM)
CGA₄₇₋₆₀	RILSILRHQNLKE	>100
Chromofungine CGA₄₇₋₆₆	RILSILRHQNLKELQDLAL	
Procatestatine bovine CGA₃₃₂₋₃₆₄	LEGEEEEEDPDRSMRLSFRARGYGFRGPGQL	
Catestatine de rat CGA₃₄₄₋₃₆₄	RSMKLSFRARAYGFRDPGPQL	
CGA₃₄₈₋₃₅₁	LSFR	
C cateslytine bovine CGA₃₄₄₋₃₅₈ + C en -NH₂	CRSMRLSFRARGYGFR	
Catestatine humaine CGA₃₅₂₋₃₇₂	SSMKLSFRARAYGFRGPGPQL	
CGA₃₈₇₋₄₃₁	GYPEEKKEEEGSANRR PEDQELESLSAIEAELEKVAHQLEELRRG	
C catestatine humaine	CSSMKLSFRARAYGFRGPGPQL	
C cateslytine humaine CGA₃₅₂₋₃₆₆ + C en -NH₂	CSSMKLSFRARAYGFRG	
Scramble Catestatine humaine	SLPRRQLPSSAGMRGGKFAYF	
CGA₃₆₀₋₃₇₂ humaine	ARAYGFRGPGPQL	

Tableau II : Détermination sur microplaques de la concentration minimale inhibitrice de peptides dérivés de la CGB sur *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Après 24h à 37°C sous agitation, la CMI est lue au spectrophotomètre à 620 nm par comparaison avec le témoin.

Peptide	Séquence	CMI (µM)
CGB₅₈₋₆₂	NTRFE	>100
CGB₂₇₉₋₂₉₁	KARHPAHFRALEE	
CGB₄₇₀₋₄₈₆	LLNPFVDPSQWKSSRFE	
CGB₄₇₀₋₄₈₆ di E	LLNPFVDPSQWKEERFE	
CGB₄₇₀₋₄₈₆ di P	LLNPFVDPSQWKPPRFE	
BAM CGB₅₄₇₋₅₆₀	QYDRVAELDQLLHY	

Tableau III : Détermination sur microplaques de la concentration minimale inhibitrice de peptides dérivés de la sécrétogranine II (SgII) sur *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Après 24h à 37°C sous agitation, la CMI est lue au spectrophotomètre à 620 nm par comparaison avec le témoin.

Peptide	Séquence	CMI (µM)
Sécrétoeurine bovine CGC ₁₈₉₋₂₅₄	ERADEEQKLYTDDDDIYKANNIAYEDVVGEDWN PVEEKIESQTQEEVRDSKENADKTEQINDEM	>100
SGII ₁₃₁₋₁₃₈	RKCLKHMRF	
CGC ₅₈₂₋₅₈₆	AMENM	

Tableau IV : Détermination sur microplaques de la concentration minimale inhibitrice de peptides dérivés de l'ubiquitine sur *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Après 24h à 37°C sous agitation, la CMI est lue au spectrophotomètre à 620 nm par comparaison avec le témoin.

Peptide	Séquence	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholera</i>
Ubifungine ₆₅₋₇₄	STLHLVLRLR	>100	>100	>100	33
Ubifungine ₆₅₋₇₆	STLHLVLRLRGG	>100	>100	>100	100
Ubifungine ₆₅₋₇₄ NH2	STLHLVLRLR	>100	>100	33	10

Tableau V' : Détermination sur microplaques de la concentration minimale inhibitrice de quelques antibiotiques usuels sur *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Après 24h à 37°C sous agitation, la CMI est lue au spectrophotomètre à 620 nm par comparaison avec le témoin.

Antibiotiques	CMI en µg/mL			
	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholera</i>
Cefotaxime (Céphalosporine ; Inhibition de l'élaboration de la paroi bactérienne)	0,25	0,0156	0,25	-
Ciprofloxacine (Fluoroquinolone ; Neutralisation des enzymes nécessaires à la réplication des bactéries)	0,0625	0,25	0,0625	1
Minocycline (Tétracycline ; Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes)	4	4	3	2
Streptomycine (Aminoside ; Fixation sur le ribosome entraînant la synthèse de protéines non fonctionnelles)	-	-	-	0,312
Tétracycline (Tétracycline ; Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes)	-	-	-	0,0625
Pénicilline (Bêta-lactamine : Inhibition de la synthèse des liaisons peptidoglycanes de la paroi bactérienne)	>16	12	6	-

Chapitre II- Interactions Plantes-Bactéries

I- Résultats

I-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes du Bénin, actives contre les bactéries responsables d'infections intestinales

Les plantes médicinales sont couramment utilisées au Bénin dans le traitement de diverses pathologies. Cette partie de notre travail a eu pour but de valider l'usage de quelques plantes utilisées dans le traitement des pathologies intestinales en médecine traditionnelle et d'identifier les principes actifs d'une plante. L'étude préliminaire a consisté à analyser 14 plantes choisies après une enquête ethnopharmacologique. Elles sont décrites dans le chapitre IV des données bibliographiques. Les plantes récoltées dans leur habitat naturel sont séchées à l'abri de la lumière, broyées, puis extraites avec différents solvants organiques (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol). Les CMI des quatre types d'extraits de chaque plante, sur les quatre souches bactériennes précédemment étudiées avec les peptides (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera non O1*) ont été déterminées (Tableau XXIII). Les plantes ont ainsi pu être classées en fonction de leur efficacité sur chacune des souches (Tableau I', Résultats supplémentaires 2).

Tableau XXIII : Concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes

Détermination sur microplaque de 96 puits de la concentration minimale inhibitrice (CMI en mg/ ml) de quatre types d'extraits (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol) pour chacune de ces plantes sur quatre souches bactériennes (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera non O1*) dans du Mueller Hinton sous agitation à 37°C. La CMI est déterminée par addition de l'iodonitrotétrazolium (INT) 0,2 mg/ml après 24 h et correspond à la plus faible concentration pour laquelle la couleur du puits ne vire pas au rouge (Voir Stratégie Expérimentale).

	Extraits	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholera</i>
<i>Boerhavia diffusa</i>	Cyclohexane	>5	>5	>5	>5
	Dichlorométhane	1,25	>5	>5	0,312
	Acétate d'éthyle	>5	>5	>5	2,5
	Butanol	1,25	2,5	2,5	1,25
<i>Boswellia dalzielii</i>	Cyclohexane	>5	>5	>5	0,625
	Dichlorométhane	>5	>5	>5	0,625
	Acétate d'éthyle	1,25	1,25	>5	>5
	Butanol	-	-	-	-
<i>Chromolaena odorata</i>	Cyclohexane	1,25	0,625	0,625	1,25
	Dichlorométhane	1,25	0,625	0,625	0,625
	Acétate d'éthyle	1,25	0,625	0,625	0,625
	Butanol	1,25	0,625	0,625	0,312

	Extraits	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholera</i>
<i>Crateva religiosa</i>	Cyclohexane	>5	>5	>5	1,25
	Dichlorométhane	5	1,25	5	0,078
	Acétate d'éthyle	2,5	0,625	2,5	0,078
	Butanol	0,625	0,312	1,25	<0,078
<i>Croton lobatus</i>	Cyclohexane	1,25	15	5	2,5
	Dichlorométhane	1,25	2,5	1,25	1,25
	Acétate d'éthyle	0,625	2,5	1,25	1,25
	Butanol	1,25	5	5	5
<i>Delonix regia</i>	Cyclohexane	>5	>5	0,625	>5
	Dichlorométhane	>5	>5	1,25	2,5
	Acétate d'éthyle	>5	>5	2,5	5
	Butanol	-	-	-	-
<i>Ficus exasperata</i>	Cyclohexane	>5	>5	0,312	>5
	Dichlorométhane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	2,5	2,5	1,25	1,25
	Butanol	5	2,5	1,25	0,153
<i>Flacourtia flavescens</i>	Cyclohexane	2,5	1,25	2,5	5
	Dichlorométhane	5	1,25	5	1,25
	Acétate d'éthyle	1,25	2,5	5	0,312
	Butanol	1,25	2,5	2,5	0,156
<i>Lantana camara</i>	Cyclohexane	>5	>5	2,5	1,25
	Dichlorométhane	>5	0,625	0,625	0,625
	Acétate d'éthyle	>5	0,625	0,625	0,625
	Butanol	5	1,25	0,625	0,312
<i>Nauclea latifolia</i>	Cyclohexane	1,25	5	>5	2,5
	Dichlorométhane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	1,25	>5	>5	0,625
	Butanol	1,25	2,5	1,25	5
<i>Schrankia leptocarpa</i>	Cyclohexane	5	>5	>5	>5
	Dichlorométhane	2,5	2,5	1,25	5
	Acétate d'éthyle	2,5	1,25	1,25	1,25
	Butanol	5	2,5	1,25	2,5
<i>Thalia geniculata</i>	Cyclohexane	>5	>5	>5	>5
	Dichlorométhane	2,5	2,5	1,25	1,25
	Acétate d'éthyle	2,5	1,25	1,25	1,25
	Butanol	5	2,5	1,25	2,5
<i>Vernonica amygdalina</i>	Cyclohexane	1,25	>5	>5	-
	Dichlorométhane	0,625	0,625	0,625	-
	Acétate d'éthyle	0,625	0,625	1,25	-
	Butanol	1,25	5	5	-
<i>Voacanga africana</i>	Cyclohexane	>5	>5	>5	>5
	Dichlorométhane	5	5	1,25	2,5
	Acétate d'éthyle	1,25	1,25	0,625	0,312
	Butanol	1,25	5	2,5	2,5

I-2- Détermination de deux principes actifs de *Chromolaena odorata*

Parmi ces plantes, *Chromolaena odorata*, qui fait partie des plantes les plus actives et qui est peu étudiée, a été choisie pour isoler et caractériser les principes actifs grâce à des méthodes chromatographiques (Figure 56 et 57), un isolement bioguidé, l'analyse par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire (Figure 58 à 60). Deux molécules responsables de l'activité de cette plante ont été identifiées: la sinésentine et l'O-tétraméthyléther scutellaréine.

Les autres résultats sont présentés dans les résultats supplémentaires 2 (Figure 1'' à 4'').

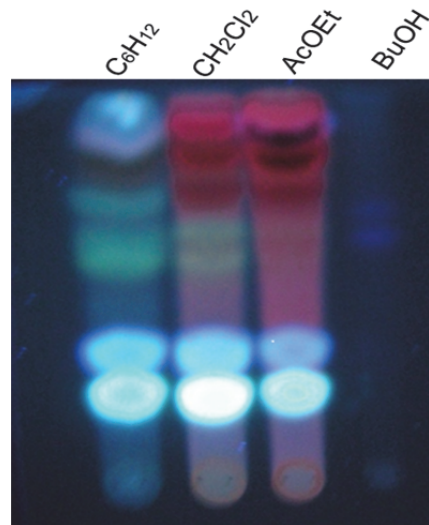


Figure 56 : Chromatographie sur couche mince de quatre extraits de *Chromolaena odorata*

Profil chromatographique de quatre extraits de *Chromolaena odorata* après migration de la plaque dans le mélange chloroforme /acétone 95:5 v/v et visualisation à 365 nm. Plusieurs familles de composés sont présentes.

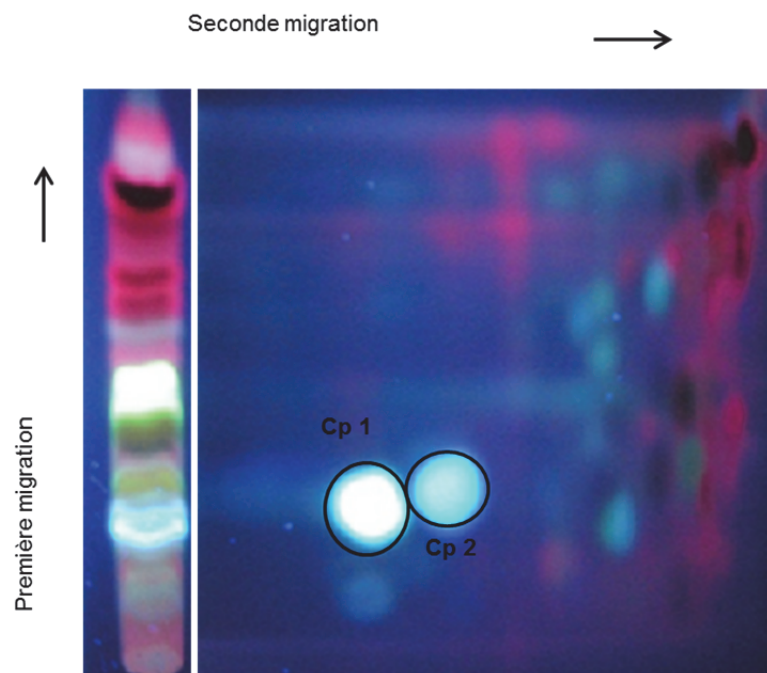


Figure 57: Chromatographie bidimensionnelle de *Chromolaena odorata*.

Chromatographie bidimensionnelle de *Chromolaena odorata* et identification de deux zones d'inhibition de la croissance bactérienne Cp 1 et Cp 2 grâce à la bioautographie. Les solvants utilisés pour la chromatographie bidimensionnelle sont : première migration : chloroforme/ acétone 95:5 (v/v) ; seconde migration: éther / méthanol/ acide acétique 90/1/2 (v/v/v). La détection est observée à 365 nm.

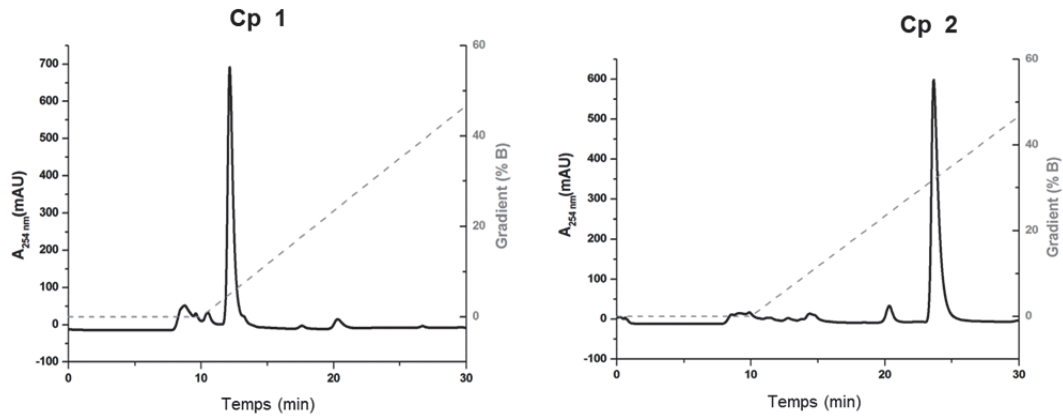


Figure 58: Isolation de deux principes actifs Cp 1 et Cp 2 de *Chromolaena odorata* par RP-HPLC.

Le système utilisé est un appareil Dionex Ultimate 3000 et la colonne est de type Vydac C18 218TP510 (taille des particules 3-20 μm , diamètre des pores 300 \AA). La détection a lieu à 254 nm. L'élution est obtenue avec un gradient (représenté en pointillé) de deux solvants : solvant A (isopropanol 30%, TFA 0.1%, 69.9% H_2O , v/v/v) et solvant B (isopropanol 90 %, 9.991 % ; H_2O ; 0.09% v/v/v). Le débit d'élution est de 1,5 mL/min.

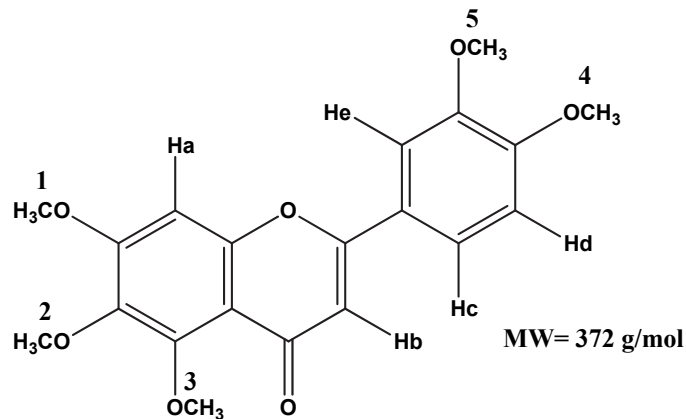


Figure 59: Structure et masse moléculaire de la sinensétine

Cette détermination est faite grâce à la RMN, la spectrométrie de masse MALDI-TOF et la GC-MS

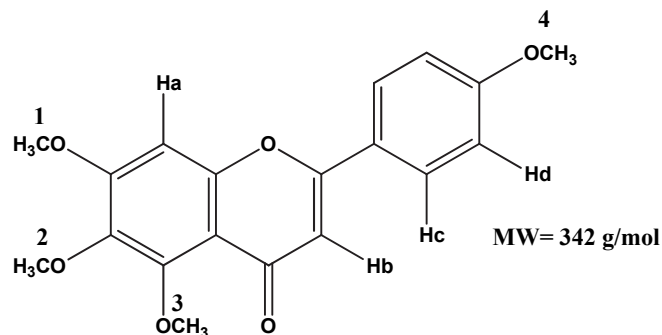


Figure 60: Structure et masse moléculaire du tétraméthyléther scutellariéine

Cette détermination est faite grâce à la RMN, la spectrométrie de masse et la GC-MS

II- Discussion des résultats

Ces dernières décennies, de nombreuses souches bactériennes résistantes ou multirésistantes à de nombreux antibiotiques ont apparues. Cette situation est si préoccupante que depuis l'an 2000, l'OMS a déclaré la multirésistance aux antibiotiques comme problème de santé publique et a fait de la recherche de nouveaux antimicrobiens un axe prioritaire. Parmi les différentes pistes explorées, nous nous sommes intéressés aux PAMs dérivés de la CGA dont les résultats sont décrits dans le chapitre précédent et à d'autres molécules naturelles, telles que les plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Bénin. L'usage des plantes en médecine est établi par de nombreux écrits datant pour les plus anciens de -5000 ans avant JC (Tableau XIII) et aussi par le fait que de nombreuses molécules de médicaments ont été découvertes dans les plantes. C'est le cas par exemple de l'aspirine provenant du saule blanc (*Salix alba*), de l'imodium utilisé dans le traitement des diarrhées, qui provient du chêne blanc (*Quercus alba*), du taxol et du taxotère employés dans le traitement des cancers du sein ou des ovaires et qui proviennent de l'if (*Taxus brevifolia* et *Taxus baccata*).

Les résultats obtenus montrent une concentration minimale inhibitrice inférieure à 5 mg/mL pour la majorité des extraits (Tableau XXIII). Ces résultats nous ont permis de classer les plantes en fonction de leur activité sur chacune des souches (Tableau II, Résultats supplémentaires 2). Ces résultats permettent de valider l'usage traditionnel des 14 plantes testées dans les pathologies intestinales.

Parmi les plantes testées, trois se sont révélés particulièrement actives. Ce sont *Chromolaena odorata*, *Crateva religiosa* et *Vernonia amydalina*. Nous avons choisi d'étudier les principes actifs contenus dans *C. odorata* car c'est la plante présentant une bonne activité sur les quatre souches en général.

La CCM montre la présence de nombreuses molécules (Figure 56) appartenant aux différentes familles de principes actifs décrites dans les données bibliographiques (terpènes, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins...). La bioautographie réalisée sur des plaques de chromatographie bidimensionnelle nous a permis d'identifier deux zones majeures d'inhibition de la croissance bactérienne (Figure 57, Cp1 et Cp2). Ces zones ont été grattées sur une plaque CCM réalisée en parallèle et isolés par HPLC (Figure 58). Les molécules isolées ont été étudiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF, chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse et résonance magnétique nucléaire (Figure 1" et 2", données supplémentaires 2). Nous avons identifié pour la première zone d'inhibition Cp1, un composé pur, la sinensétine et pour la deuxième zone d'inhibition Cp2, un mélange de deux composés dont la majoritaire (55%) est le tétraméthyléther scutellaréine. Les molécules de synthèse pour ces deux composés ont été achetées (Extrasynthèse SAS, Genay, France) et testées en RMN afin de valider les structures déterminées.

Des molécules ont été décrites précédemment de *Chromolaena odorata* parmi lesquelles la sinensétine et la tétraméthyléther scutellaréine. En littérature, la sinensétine est décrite comme antioxydante et intervenant dans les inflammations. D'autres études ont montré son rôle antiprolifératif sur des cellules cancéreuses et préventif dans l'obésité. La tétraméthyléther est très peu décrit, néanmoins son activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses dans la leucémie a été établie.

En conclusion, nos travaux ont permis de valider l'usage de 14 plantes utilisées en médecine traditionnelle du Bénin, dans le traitement des maladies intestinales infectieuses et d'isoler 2 molécules actives, la sinensétine et le tétraméthyléther scutellaréine. Nous montrons pour la première fois que ces deux molécules ont une activité antimicrobienne. Leurs mécanismes d'action restent à élucider. Des tests de toxicité, des tests *in vivo*, de biodisponibilité sont à envisager dans le futur afin de rendre de l'usage de ces plantes et de leurs principes actifs plus rationnel.

Ces résultats sont présentés et discutés en annexe dans le Manuscrit 4 qui sera soumis pour évaluation à **International Journal of Antimicrobial Agents**.

Résultats supplémentaires 2

Tableau I'' : Classification des plantes selon l'activité globale des quatre types d'extraits. * Nombres d'extraits dont l'activité est inférieure ou égale à 1,25 mg/ml ; +: Nombres d'extraits dont l'activité est inférieure ou égale 3.125 mg/ml

Souches	Très actives ≤ 1,25 mg/mL	Moyennement actives 1.25-3.125 mg /mL	Peu actives >3.125 mg/mL
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>C. odorata</i> <i>C. lobatus</i> <i>N. latifolia</i> <i>V. amygdalina</i>	<i>B. diffusa</i> * <i>C. religiosa</i> * <i>F. flavescens</i> **	<i>B. dalzielii</i> * <i>D. regia</i> <i>F. exasperata</i> + <i>L. camara</i> <i>S. leptocarpa</i> ++ <i>T. geniculata</i> ++ <i>V. africana</i> **
<i>Salmonella enterica</i>	<i>C. odorata</i>	<i>C. lobatus</i> * <i>C. religiosa</i> *** <i>F. flavescens</i> ** <i>L. camara</i> *** <i>S. leptocarpa</i> * <i>T. geniculata</i> * <i>V. amygdalina</i> **	<i>B. diffusa</i> + <i>B. dalzielii</i> * <i>D. regia</i> <i>F. exasperata</i> ++ <i>N. latifolia</i> + <i>V. africana</i> *
<i>Shigella sonnei</i>	<i>C. odorata</i> <i>F. exasperata</i> <i>L. camara</i> ***	<i>C. lobatus</i> ** <i>D. regia</i> ** <i>S. leptocarpa</i> *** <i>T. geniculata</i> *** <i>V. amygdalina</i> ** <i>V. africana</i> **	<i>B. diffusa</i> + <i>B. dalzielii</i> <i>C. religiosa</i> *+ <i>F. flavescens</i> ** <i>N. latifolia</i> * <i>S. leptocarpa</i> **
<i>Vibrio cholera</i>	<i>C. odorata</i> <i>C. religiosa</i> <i>L. camara</i>	<i>B. diffusa</i> ** <i>B. dalzielii</i> ** <i>C. lobatus</i> ** <i>F. exasperata</i> ** <i>F. flavescens</i> ** <i>F. flavescens</i> *** <i>N. latifolia</i> * <i>T. geniculata</i> ** <i>V. africana</i> *	<i>D. regia</i>

Spot 1

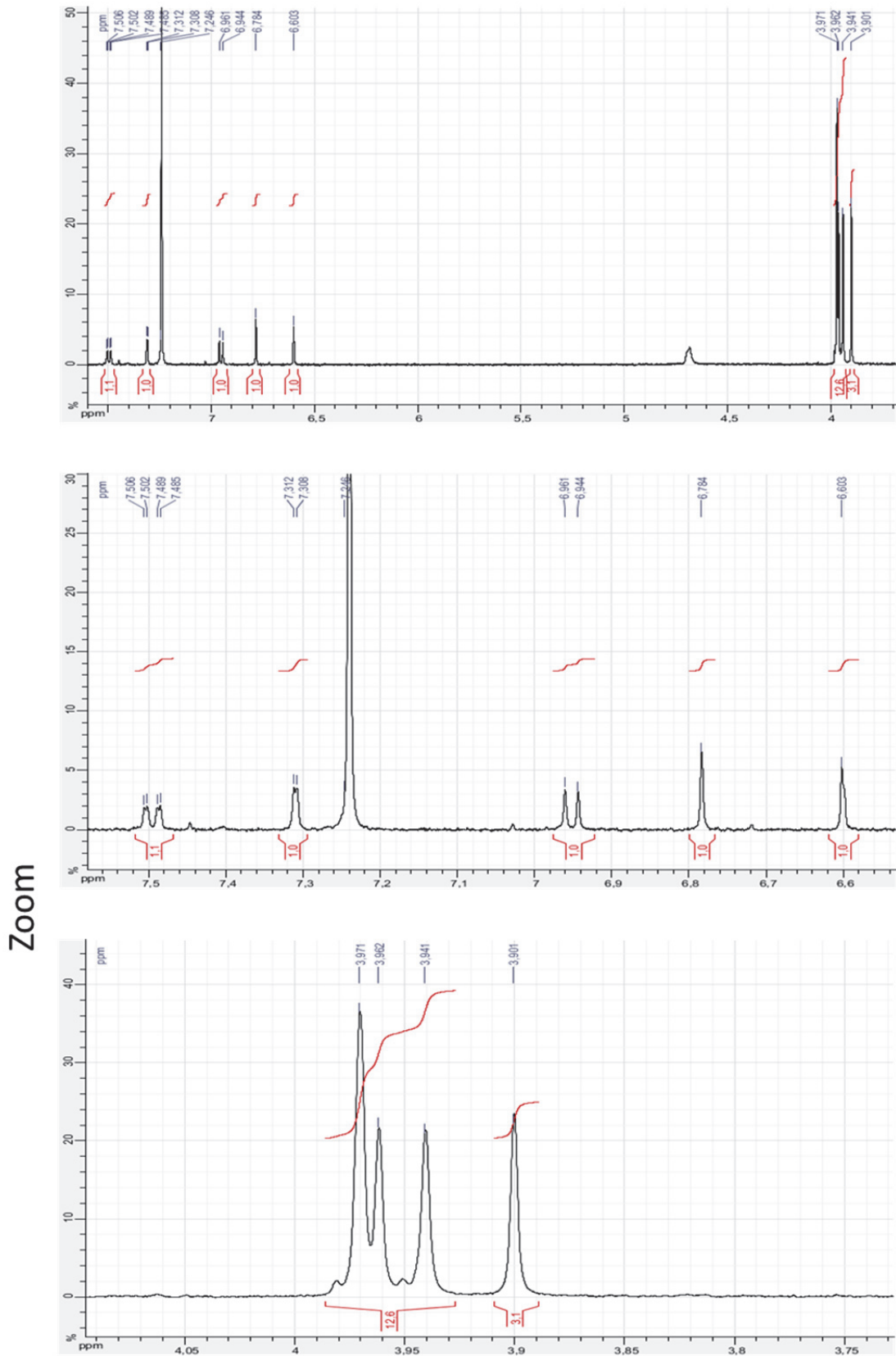


Figure 1'' : Spectre RMN du composé 1: sinensétine

Spot 2

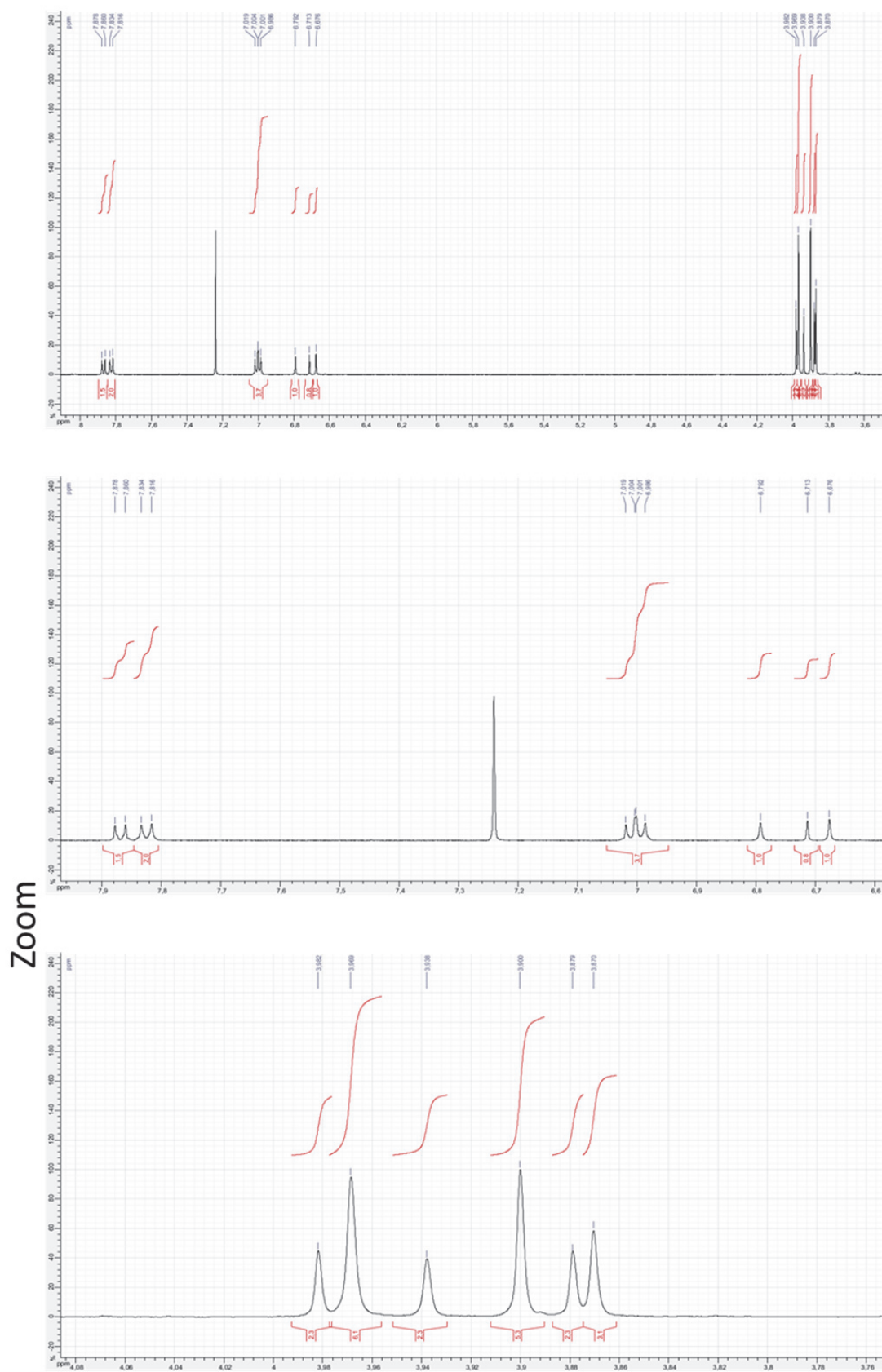


Figure 2'' : Spectre RMN du composé 2 : O-tétraméthyléther scutellaréine

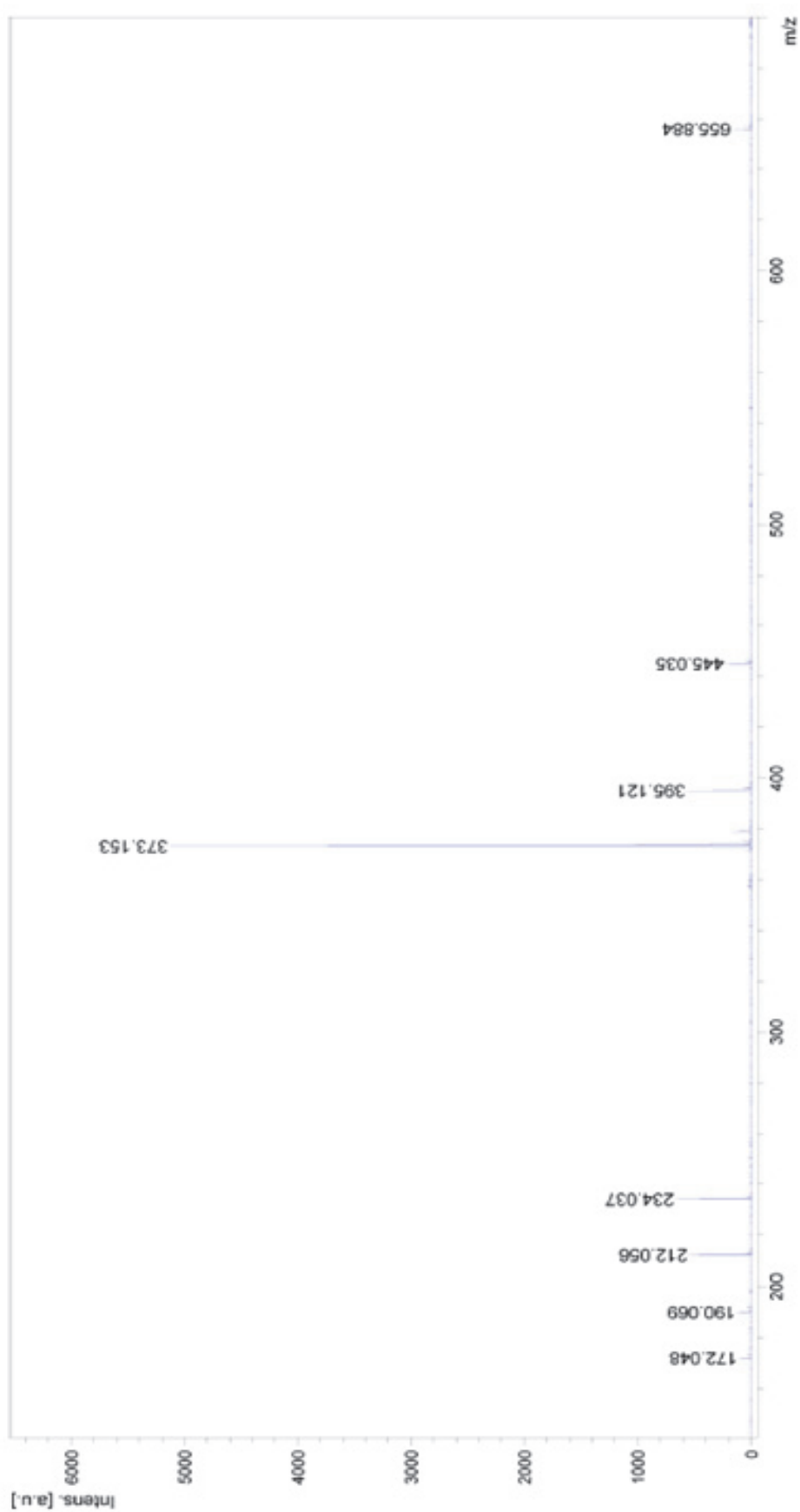


Figure 3'' : Spectrométrie de masse MALDI-TOF du composé 1

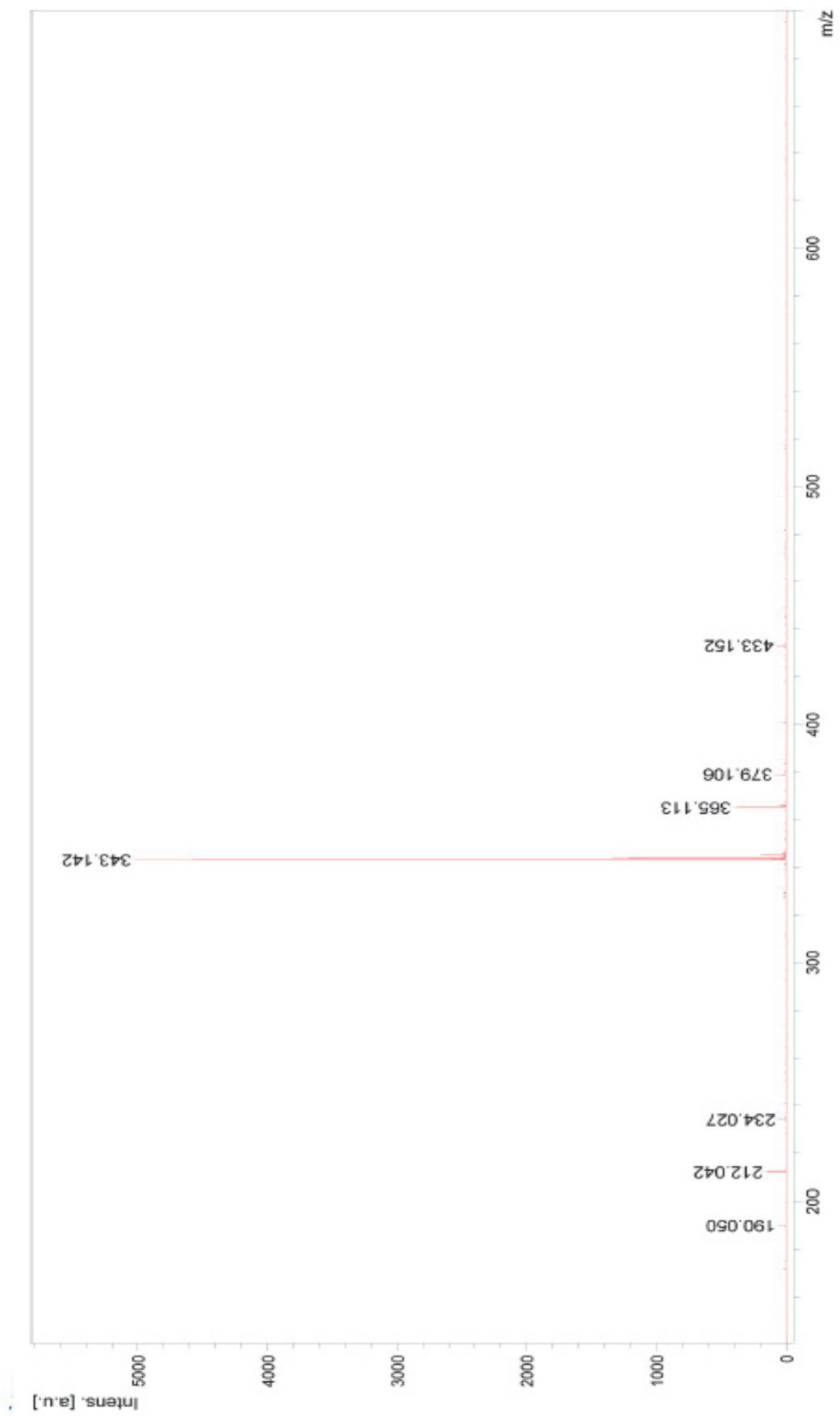


Figure 4'' : Spectrométrie de masse MALDI-TOF du compos

Chapitre III- Interactions Peptides-Cellules

I- Résultats

I-1- Sécrétion protéique des cellules BON

La CGA et ses peptides dérivés sont des acteurs importants de l'immunité secrétés par les cellules nerveuses, endocrines, immunitaires et neuroendocrines lors d'un stress. Des études antérieures ont montré leur importance dans les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, la nociception ...

Sous l'effet d'enzymes protéolytiques, la CGA est maturée dans les granules de sécrétion pour produire de nombreux peptides biologiquement actifs. Il est aussi établi que la CGA est un marqueur des tumeurs neuroendocrines, de maladies neurodégénératives et de gravité chez les patients de réanimation.

Notre travail de thèse (Chapitre I), a mis en évidence, l'importance des peptides dérivés de la CGA dans les infections intestinales. Ces infections peuvent conduire à long terme à des maladies inflammatoires susceptibles de dégénérer en cancer de l'intestin.

Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré le rôle immunomodulateur de CAT et CHR, 2 PAMs dérivés de la CGA qui activent la sécrétion des neutrophiles en se liant à la calmoduline (Chapitre III, Données bibliographiques).

Dans cette nouvelle étude, nous explorons le rôle de CAT et de la CHR sur le modèle des cellules entérochromaffines. Ces cellules sont disséminées le long du tube digestif et il est difficile de les isoler et de les mettre en culture. Nous avons donc utilisé comme modèle, des cellules BON qui sont une lignée de cellules de type entérochromaffines, dérivées d'une tumeur carcinoïde du pancréas chez l'humain. Les cellules entérochromaffines de l'intestin, tout comme les cellules chromaffines, sécrètent la CGA qui sera maturée en peptides.

La sécrétion protéique des cellules BON, induite après stimulation par CHR ou CAT a été analysée par RP-HPLC et comparée au témoin négatif que représente le niveau basal (contrôle) et au témoin positif représenté par l'ionomycine (Io) (Figure 61).

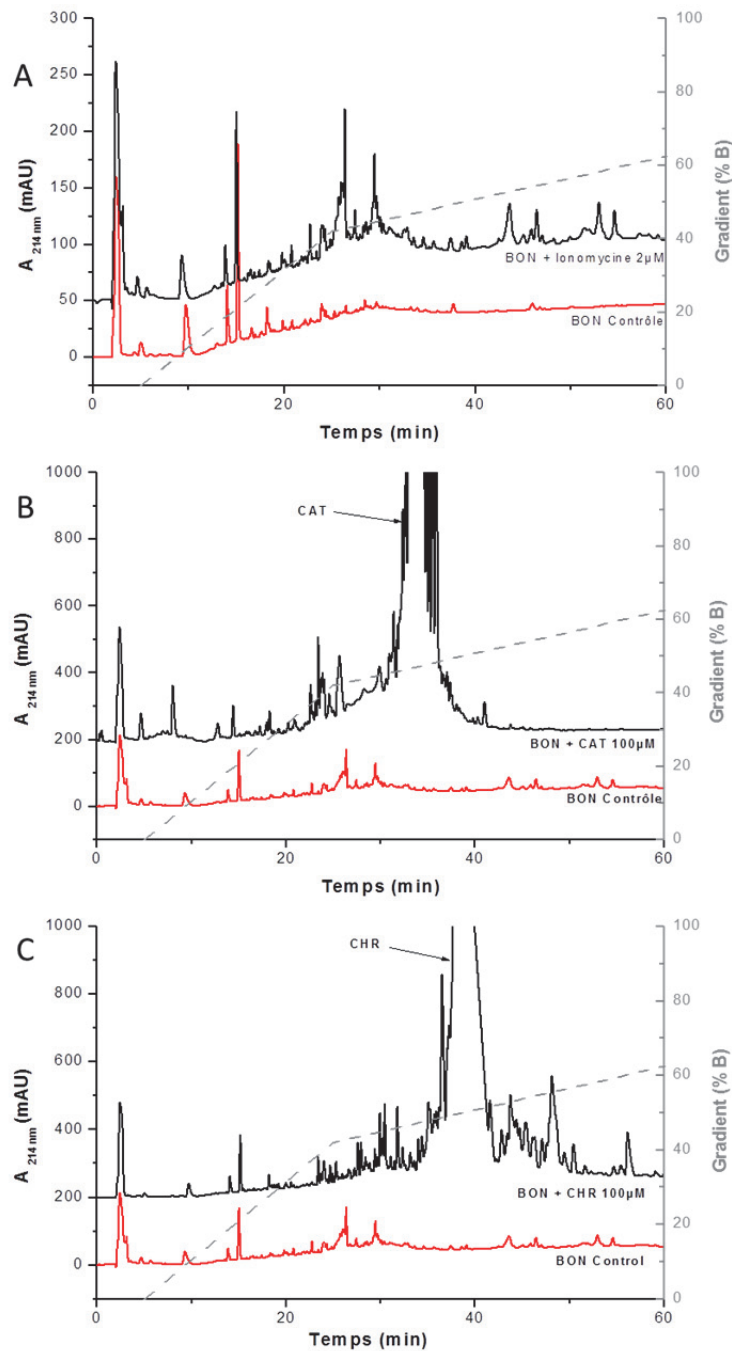


Figure 61: Analyse de la sécrétion des cellules BON par RP-HPLC.

Le système utilisé est une DIONEX-Ultimate 3000 (Germering, Germany) et la colonne est une C8 Grace C8 (2.1 x 150 mm, taille des particules 5 μ m, porosité 100 Å, Grace, Waukegan Road Deerfield, USA). Le niveau basal de sécrétion (BON contrôle) est comparé aux sécrétions induites par 2 μ M d'ionomycine, 100 μ M de CAT ou 100 μ M de CHR.

Les résultats obtenus montrent que de nombreuses protéines sont sécrétées par les cellules BON au niveau basal. Le nombre de protéines sécrétées est augmenté en

présence d'ionomycine et de chromofungine et diminué en présence de catestatine (Figure 62 et 63). La chromofungine est un meilleur sécrétagogue pour ces cellules que l'ionomycine.

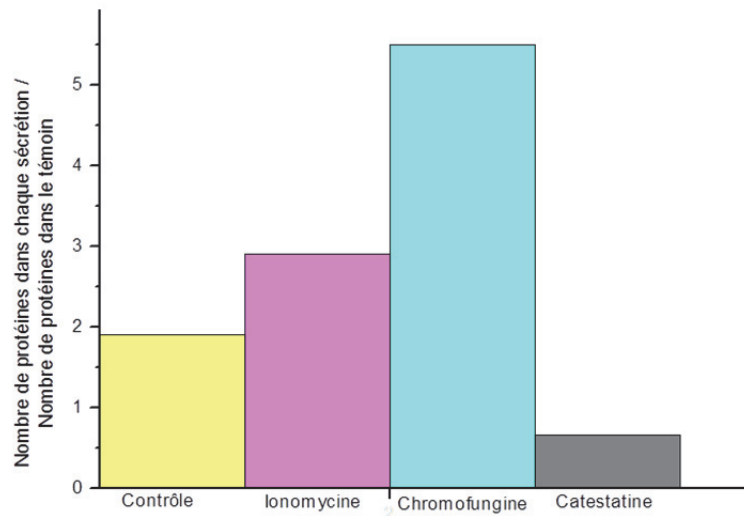
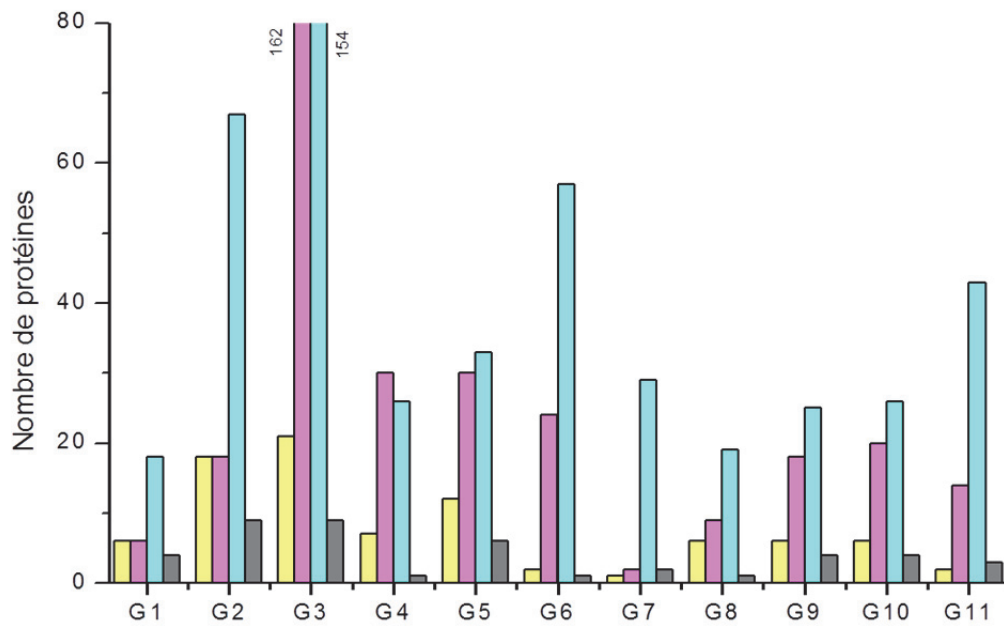


Figure 62 : Ratio du nombre de protéines dans chacune des conditions (Ionomycine 2 μ M, CAT 100 μ M, CHR 100 μ M) par rapport au contrôle.

Ces protéines identifiées par Nano Lc/MS-MS dans les sécrétions de cellules BON, ont été classées en fonction des processus biologiques dans lesquelles elles interviennent (Figure 63). Dans le cas de la stimulation par CHR, on observe une nette augmentation des protéines intervenant dans la transcription et la traduction. Au contraire, dans le cas de la stimulation par CAT, on observe une diminution du nombre de protéines sécrétées par rapport aux autres expériences.



- G1: Protéines en relation avec l'immunité et l'inflammation
 G2: protéines intervenant dans le développement des tissus et organes
 G3: Protéines intervenant dans la transcription et la traduction
 G4: Processus intervenant dans le métabolisme des glucides
 G5: Protéines en relation avec l'homéostasie
 G6: Protéines intervenant dans la protéolyse et la formation de complexe
 G7: Protéines intervenant dans les processus métaboliques
 G8: Protéines intervenant dans l'adhésion
 G9: Protéines oncogènes
 G10: Enzymes et coenzymes
 G11: Protéines intervenant dans le transport

Figure 63 : Classification des protéines sécrétées par dans les différentes conditions en fonction des processus biologiques dans lesquels elles interviennent.

Basal, Jaune ; Io 2 μm, rose ; CHR 100 μM, bleu ; CAT 100 μM, gris.

Parmi les protéines sécrétées, nous nous sommes particulièrement intéressés à la CGA qui est étudiée par notre laboratoire. Les résultats obtenus montrent la présence de celle-ci dans les sécrétions induites par CHR et Io (Figure 64).

I-2-Profil et Maturation de la CGA dans les cellules BON

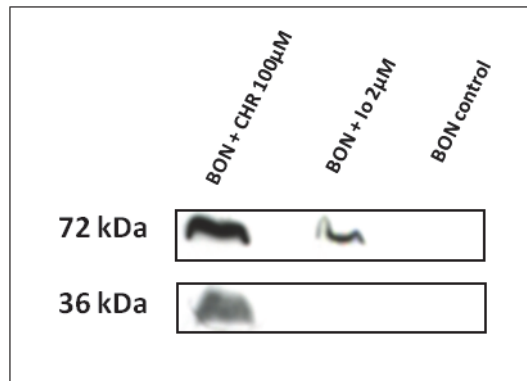


Figure 64 : Détection par Western Blot de la sécrétion de CGA par les cellules BON.

La détection est faite par l'anticorps monoclonal primaire CGA₅₃₋₅₇ (5A8 ; dilution 1: 2,000) et l'anticorps secondaire (anti-mouse antibody) (dilution 1: 10,000). Les masses moléculaires apparentes sont déterminées par comparaison à un standard.

L'analyse protéique par nano LC-MS/MS ainsi que des données précédemment obtenues, ont permis de caractériser les fragments de CGA retrouvés (Figure 65 et Tableau XXIV).

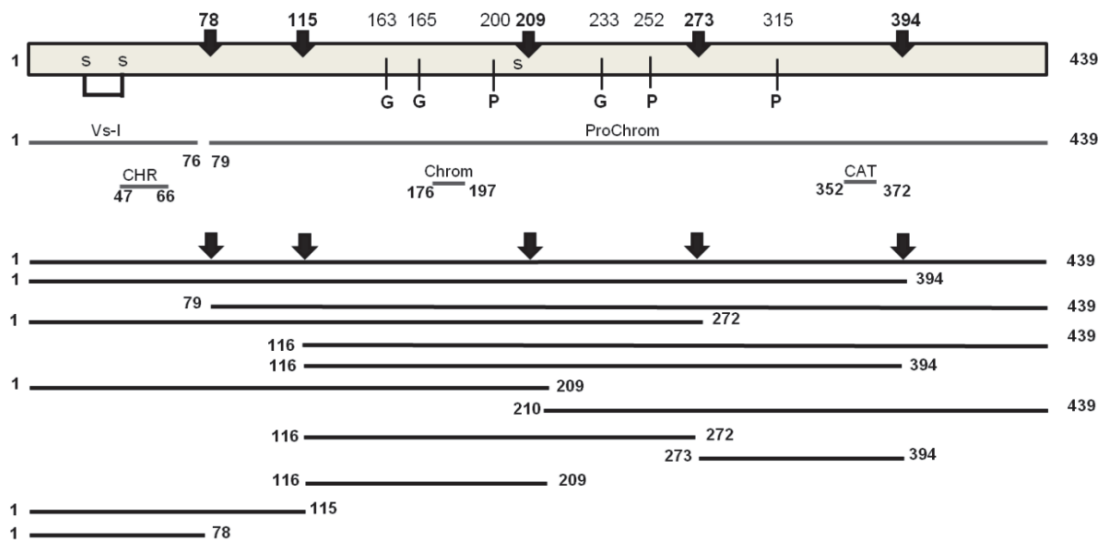


Figure 65 : Identification par analyse protéomique des fragments dérivés de la chromogranine A dans les sécrétions de cellules BON induites en présence de 2 μ M d'Io ou 100 μ M de CHR.

Les fragments dérivés de la CGA et les modifications post-translacionnelles (site de clivage, glycosylation, phosphorylation) sont indiqués ainsi que le pont disulfure.

Tableau XXIV: Identification des fragments dérivés de la CGA dans chacune des bande après stimulation à la chromofungine ou à l'ionomycine.

	Io	CHR
24 ← 120 kDa		CgA-multimer
← 72 kDa	1 - 439	1 - 439
20 ← 55 kDa		1 - 394
← 36 kDa	116 - 439	79 - 439
15 ← 28 kDa		1 - 272 ; 116 - 439
← 17 kDa		116 - 394 ; 1 - 209
10 ← 11 kDa		210 - 439
← 72 kDa	116 - 272 ; 273 - 394	116 - 272 ; 273 - 394
← 55 kDa	116 - 209	116 - 209
← 36 kDa	1 - 115	1 - 115
← 28 kDa	1 - 78	1 - 78
5 ← 17 kDa		
← 11 kDa		
1		

k

I-3- Mécanisme d'action de CAT et CHR sur les cellules BON

Notre travail a aussi concerné l'analyse des mécanismes par lesquels CAT et CHR agissent sur les cellules BON pour moduler leur sécrétion.

L'analyse en microscopie calcique des cellules chargées en fura-2 montre que CHR induit un influx de calcium et que CAT est capable de bloquer l'entrée de calcium induite par CHR lors d'un traitement par les deux peptides ensemble (Figure 66 et 67). L'utilisation de différents bloqueurs des canaux SOCs (*Store Operated Channels*) ou de la phospholipase A2 (calcium indépendant) montrent que ces peptides induisent l'ouverture des canaux SOCs pour l'entrée du calcium, mais n'utilisent pas les réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA) (Figure 68 à 70).

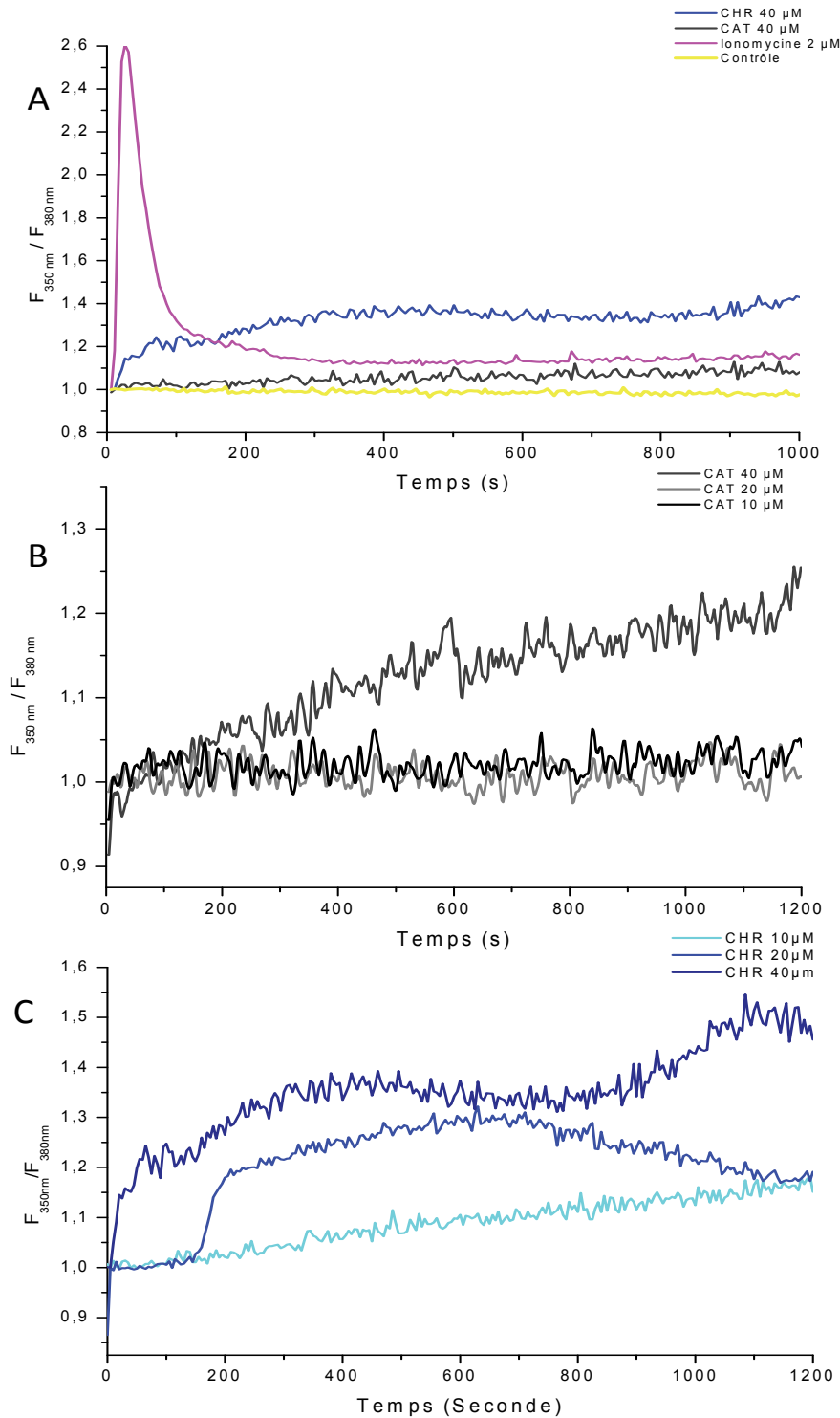


Figure 66 : Influx de calcium dans les cellules BON dans différentes conditions.

Les cellules BON sont prétraitées au Fura-2 AM 2 μM et à l'acide pluronique 20 % (2 μL). Le ratio $F_{350\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ traduit l'entrée de calcium dans les cellules. A : Entrée de calcium induit par le contrôle (tampon Locke, ionomycine 2 μM , CAT 100 μM , CHR 100 μM ajouté à $t=0\text{s}$) ; B : entrée de calcium dose dépendant induit par CAT 10, 20 et 40 μM ; C : entrée de calcium dose dépendant induit par CHR 10, 20 et 40 μM .

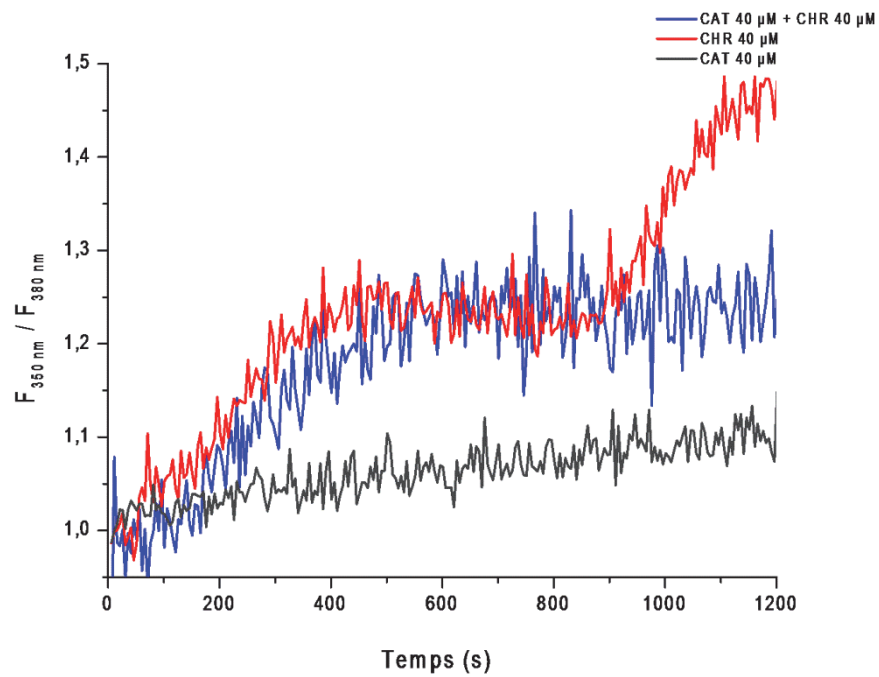


Figure 67 : Effet Bloqueur de CAT sur l'influx de calcium induit par CHR.

Les cellules BON sont prétraitées au Fura-2 AM 2 μM et à l'acide pluronique 20 % (2 μL). Le ratio $F_{350\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ traduit l'entrée de calcium dans les cellules. CAT est capable de bloquer l'influx de calcium induit par CHR (en bleu).

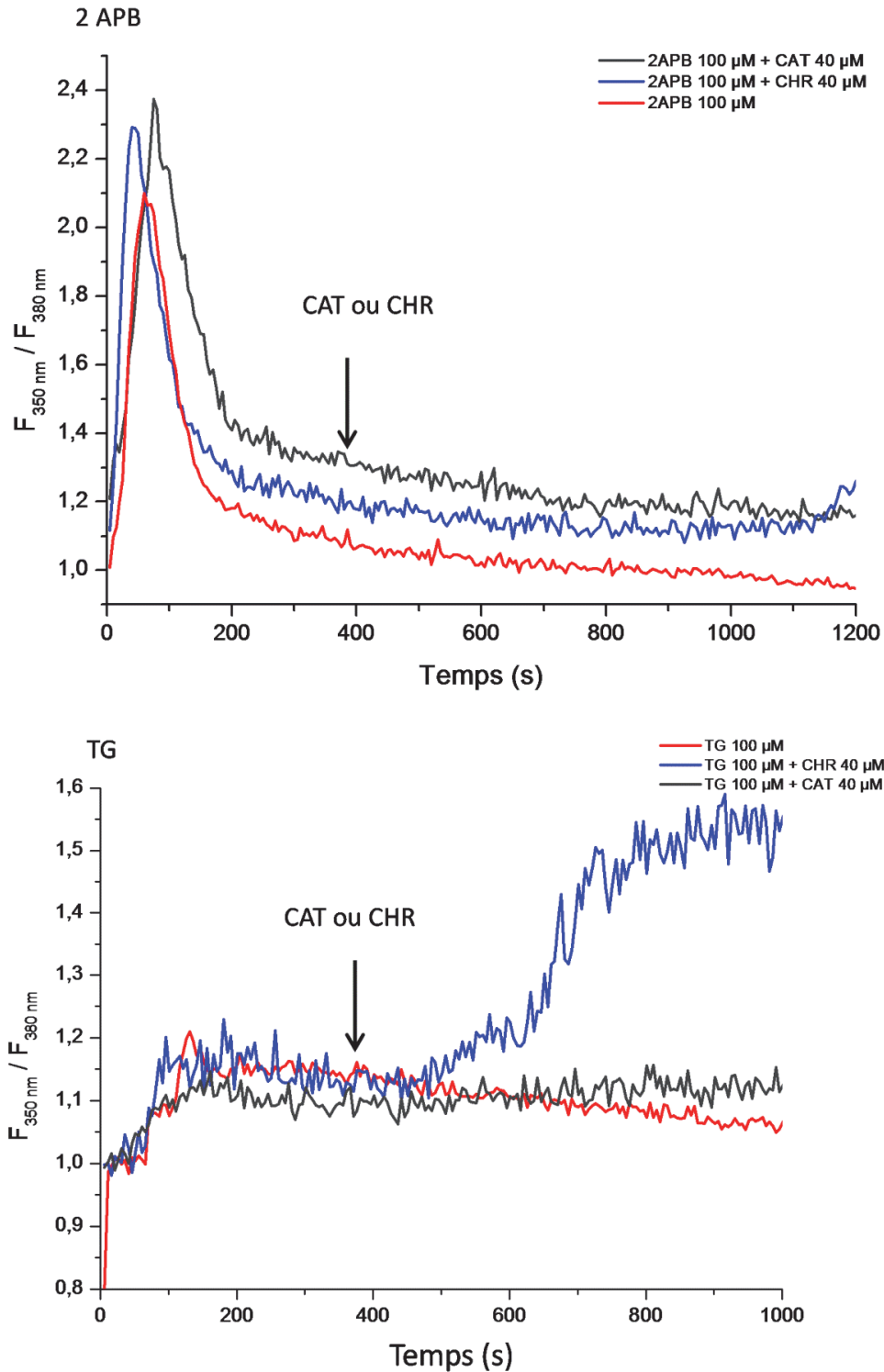


Figure 68 : Influx de calcium en présence de 2-APB et de TG

Les cellules BON sont prétraitées au Fura-2 AM 2 μM et à l'acide pluronique 20 % (2 μL). Le ratio $F_{350\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ traduit l'entrée de calcium dans les cellules. A : l'influx de calcium induit par CHR est bloqué après un traitement préalable des cellules avec 100 μM de 2-aminoethyl diphenylborate (2 APB). B : Un traitement préalable des cellules BON avec 100 μM de thapsigargine ne bloque pas l'influx de calcium induit par CHR.

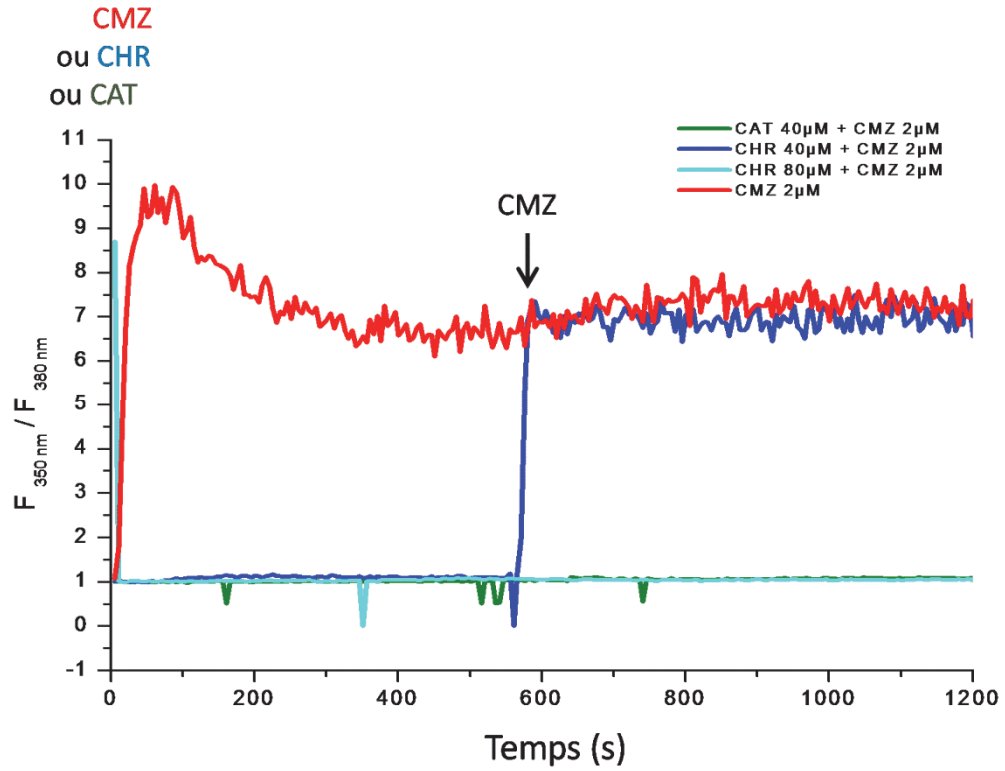


Figure 69 : Influx de calcium en présence de CMZ

Figure 69 : Les cellules BON sont prétraitées au Fura-2 AM 2 µM et à l'acide pluronique 20 % (2 µL). Le ratio $F_{350\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ traduit l'entrée de calcium dans les cellules. CMZ n'induit plus d'influx de calcium dans les cellules prétraitées à CAT 40 µM ou CHR 80 µM.

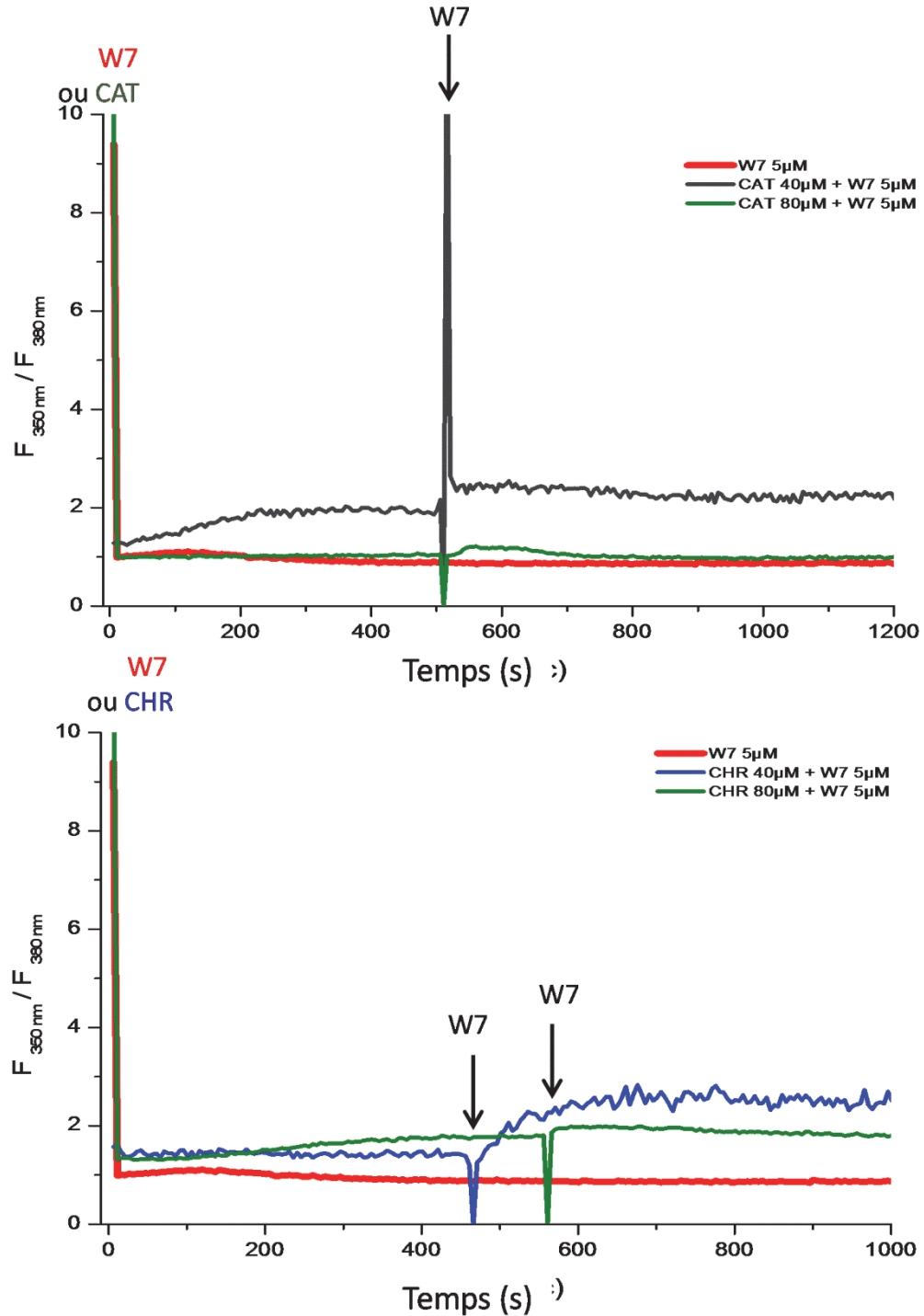


Figure 70 : Influx de calcium en présence de W7

Les cellules BON sont prétraitées au Fura-2 AM 2 μM et à l'acide pluronique 20 % (2 μL). Le ratio $F_{350\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ traduit l'entrée de calcium dans les cellules. W7 n'induit plus d'influx de calcium dans les cellules prétraitées à CAT 80 μM ou CHR 80 μM . Par contre, à 40 μM de Cat ou CHR, CMZ induit encore un influx de calcium dans les cellules prétraitées par ces concentrations de peptides.

L'analyse en microscopie confocale de l'effet des deux peptides préalablement rhodaminés montre qu'après stimulation des cellules BON pendant 30 min par 40 μM CAT, le peptide est détecté dans le cytoplasme, la membrane périmoléculaire et le noyau. Ce résultat indique que CAT pénètre dans les cellules BON jusqu'au noyau. Le résultat observé pour 40 μM CHR est différent et indique après 1 h de traitement un marquage cytoplasmique (vésiculaire), suggérant une entrée du peptide dans les cellules BON par des endosomes (Figure 71).

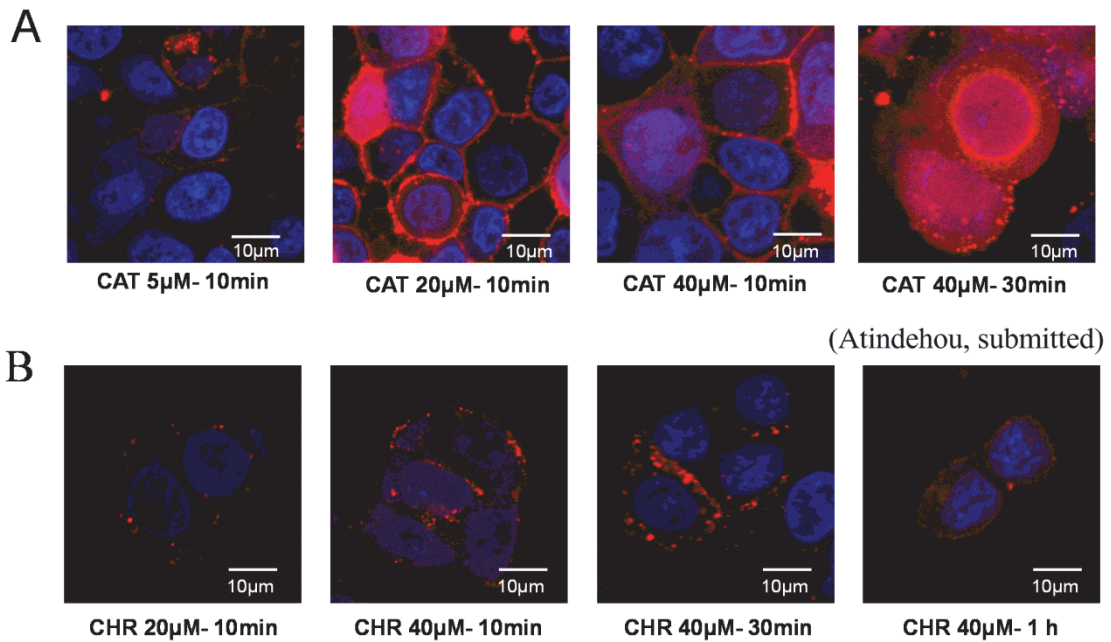


Figure 71 : Microscopie confocale des cellules BON après incubation avec du peptide rhodaminé.

Différentes concentrations de peptides (5, 10, 20, 40 μM) ont été testés à différents temps (10, 30, 60 min).

II- Discussion des résultats

Les résultats ici obtenus sont décrits et discutés dans deux manuscrits (Manuscrit 5 et 6) qui seront soumis à des journaux de protéomique : le premier s'attarde sur la composition en chromogranine A des cellules stimulées par la chromofungine par rapport à un témoin négatif (condition basale) et un témoin positif (l'ionomycine, ionophore calcique) et le deuxième qui porte sur l'analyse globale des protéines retrouvées dans les sécrétions et le mécanisme d'action de la catestatine et de la chromofungine. Nous montrons que la chromofungine stimule la sécrétion des cellules BON tandis que la catestatine ne la stimule pas. Ce résultat est confirmé en HPLC par l'apparition de nouveaux pics dans les sécrétions de cellules BON en

présence de chromofungine. Les protéines obtenues ont été classées en fonction des processus biologiques dans lesquels elles interviennent. Il en ressort une augmentation du nombre de protéines intervenant dans la transcription et la traduction, dans la protéolyse et la formation de complexe, dans le développement des tissus et organes et dans le transport. L'expression de la CGA est aussi accentuée en présence de chromofungine (Résultats supplémentaires 3, tableaux 1^{'''A} à 1^{'''D}). Les différents fragments de CGA sécrétés ont été caractérisés grâce, à la spectrométrie de masse Nano LC-MS/MS, le western blot et des données de la littérature.

Pour mettre en exergue les mécanismes d'action de ces deux peptides, nous avons réalisé des expériences de microscopie confocale et de microscopie calcique. Il en ressort une entrée de calcium plus importante en présence de chromofungine que de catestatine. Cette entrée de calcium est dose dépendante. La catestatine ayant un rôle inhibiteur de la sécrétion des catécholamines, nous avons voulu savoir si elle agissait pareillement sur les cellules entérochromaffines. En rajoutant CHR et CAT simultanément, CAT est capable de bloquer l'influx de calcium induit par CHR.

Des expériences antérieures menées dans notre équipe ont montré que sur les polymorphonucléaires (PMN), CAT et CHR induisent un influx de calcium par liaison à la calmoduline. En partant de cette hypothèse, nous avons utilisé le 2-APB (2-aminophenyl borate), qui induit la libération des stocks de calcium intracellulaire et qui est un inhibiteur des récepteurs iP_3 et des canaux TRP (*Transient Receptor Potential*). Sur des cellules prétraitées (400 secondes auparavant) avec 100 μM de 2-APB, CAT et CHR n'induisent plus d'influx de calcium. Ces résultats impliquent que ces deux peptides mobilisent les stocks de calcium intracellulaire pour provoquer l'influx de calcium. En utilisant la thapsigargine (TG), un inhibiteur des ATPase- Ca^{2+} SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*), on constate qu'un traitement préalable des cellules avec TG n'empêche pas l'entrée de calcium induit par CHR. Ainsi, CHR n'utiliserait pas les réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique. CHR et CAT se lient à la calmoduline car un traitement des cellules à CAT ou CHR à 40 μM inhibe partiellement la liaison de la calmidazolium (CMZ) ou du N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide (W7), tous deux inhibiteurs de la calmoduline et à 80 μM , totalement.

Les récepteurs situés sur les cellules BON ne sont pas tous connus, mais des TRVP1 (*Transient Receptor Potential Vanilloïde 1*) et des récepteurs de la somatostatine ont été identifiés. Les mécanismes d'action des deux peptides restent à mieux expliciter.

Résultats supplémentaires 3

Tableau 1'''A: Fragments tryptiques de chromogranine A obtenus dans les sécrétions basales de cellules BON

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
1	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
2	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
3	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
4	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EEEEEEEAEGAEAVPEEGPTVVLNHPHSLGYK	3 980,76	210-245
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
5	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	PQALPEPMQESK	1 354,67	133-144
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
6	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
7	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
8	GPGPQLR	724,4102	367-373
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
9	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
10	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
11	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
12	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
13	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
14	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
15	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
16	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
17	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
18	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
19	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	CIVEISDTLSK	1 363,71	18-38
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
20	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	CIVEISDTLSK	1 363,71	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
21	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
22	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	ILSILR	714,4873	48-53
	RPDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394

23	CIVEISDTLSK	1 363,71	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428

24	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313

Tableau 1''B: Fragments tryptiques de chromogranine A obtenus dans les sécrétions de cellules BON stimulées à l'ionomycine

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
1	ILSILR	714.4873	48-53
	EAVEEPPSSK	975.4629	101-109
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	CIVEISDTLSK	1,363.7139	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
2	PSPMPVSEQcFETLR	1,777.8249	29-43
	ILSILR	714.4873	48-53
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	HQNLKELQDLALQGAK	1,919.0712	54-70
3	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	ILSILR	714.4873	48-53
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
4	CIVEISDTLSK	1,363.7139	17-28
	HSGFEDSEVLNQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	CIVEISDTLSK	1,363.7139	17-28
5	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144 + O
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144 + O
	GPGPQLR	724.4102	367-373
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
6	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	GPGPQLR	724.4102	367-373
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PGAEAAQDPEGK	1,227.5490	265-276
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144 + O
7	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144 + O
	HSGFEDSEVLNQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144 + O
8	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144 + O
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144
9	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
10	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
11	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
12	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2,830.2951	277-300
	GPGPQLR	724.4102	367-373
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
13	HSGFEDSEVLNQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2,814.3001	277-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
14	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	HSGFEDSEVLNQSSQAELK	2,476.1475	79-100
15	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
16	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	LEGGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
17	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	LEGGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
18	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
19	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
20	HSGFEDSEVLNQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	LEGGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
21	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ILSILR	714.4873	48-53
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	GLSAEPGWQAK	1,143.5794	198-208
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	CIVEISDTLSK	1,363.7139	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
22	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
24	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276

Tableau 1'''C: Fragments tryptiques de chromogranine A obtenus dans les sécrétions de cellules BON stimulées à la chromofungine

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
1	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197
2	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
3	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	PGAEAEADPEGK	1 227,55	265-276
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276	
SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
4	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
5	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300	
GPGPQLR	724,4102	367-373	
HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100	
LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355	
PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144	
RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428	
SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276	
SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
6	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
7	EAVEPSSK	975,4629	101-109
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	GWRPSSR	845,4376	375-381
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350
LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355	
RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428	
SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276	
SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
8	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
9	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
10	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
11	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
VAHQQLALRR	1 191,71	429-438	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
12	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
VAHQQLALRR	1 191,71	429-438	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
13	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAG K P G A E E A Q D P E G K	2 226,05	254-276
	SGEATD GAR PQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195	
YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197	
14	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R	2 074,97	176-195
	YGPQAE GDS E G L S Q G L V D R E K	2 332,11	176-197

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
15	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
16	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPQPQLR	724,4102	367-373
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	PQALPEPMQESK	1 354,67	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	17	ELQDLALQGA	1 185,65
GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR		2 830,30	277-300
HSGFDELSEVLENQSSQAELEK		2 476,15	79-100
RPEDQELSLSAIEAELEK		2 186,08	410-428
SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK		2 226,05	254-276
SGEATD GARPQALPEPMQESK		2 199,03	124-144
YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR		2 332,11	176-197
EDSLEAGLPLQVR		1 426,75	382-394
18	EEEEEEEEEAEGEEAVPEEEGPTVVLN	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPQPQLR	724,4102	367-373
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
19	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	HSGFDELSEVLENQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	20	CIVEISDTLSKPSMPVSOECFETLR	3 138,52
EDSLEAGLPLQVR		1 426,75	382-394
ELQDLALQGA		1 185,65	60-70
GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR		2 814,30	277-300
GLSAEPGWQAK		1 143,58	198-208
HSGFDELSEVLENQSSQAELEK		2 476,15	79-100
ILSILR		714,4873	48-53
KHSGFDELSEVLENQSSQAELEK		2 604,24	78-100
RPEDQELSLSAIEAELEK		2 186,08	410-428
SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK		2 226,05	254-276
SGEATD GARPQALPEPMQESK		2 215,03	124-144
YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR		2 074,97	176-195
YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR		2 332,11	176-197

Bande	Séquence peptidique	Masse (AMU) +1H	Localisation
21	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPQPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLENQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
22	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPQPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLENQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	REEEEEEEEAEGEEAVPEEEGPTVVLN	4 136,86	210-245
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
23	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGA	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPQPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLENQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGLELQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	24	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75
EEEEEEEEEAEGEEAVPEEEGPTVVLN		3 980,76	210-245
ELQDLALQGA		1 185,65	60-70
GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR		2 814,30	277-300
GLSAEPGWQAK		1 143,58	198-208
GPQPQLR		724,4102	367-373
HSGFDELSEVLENQSSQAELEK		2 476,15	79-100
LEGQEEEEEDNRDSSMK		1 895,79	340-355
RPEDQELSLSAIEAELEK		2 186,08	410-428
SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK		2 226,05	254-276
SGEATD GARPQALPEPMQESK		2 199,03	124-144
SGLELQEEER		1 205,53	304-313
VAHQQLALR		1 035,61	429-437
YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR		2 074,97	176-195
YGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197	

Tableau 1''D: Fragments tryptiques de chromogranine A obtenus dans les sécrétions de cellules BON stimulées à la catestatine

Bande	Séquence Peptide	Masse (AMU)	Localisation
1	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFEDELSEVLNQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
2	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
3	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197
	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHPPASLPSQK	3 319,45	145-175
4	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
5	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
6	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
7	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
8	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
9	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
10	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
11	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195

Bande	Séquence Peptide	Masse (AMU)	Localisation
12	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
13	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
14	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
15	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
16	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
17	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
18	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
19	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
20	ILSILR	714,4873	48-53
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
21	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFEDELSEVLNQSSQAELEK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
22	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	CIVEVISDTLSK	1 363,71	18-38
23	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	ILSILR	714,4873	48-53
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
24	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELLESLSAIEAELEK	2 186,08	410-428

Conclusion et perspectives

Dans un contexte marqué par l'apparition de nombreuses souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques classiques, le développement des maladies nosocomiales et le nombre important des maladies infectieuses intestinales, notre travail a eu pour objectif d'identifier et de caractériser de nouveaux agents antimicrobiens actifs dans les infections intestinales. Nos travaux se sont articulés sur deux axes susceptibles de fournir de telles molécules : les peptides dérivés de la chromogranine A (CGA), et les plantes médicinales utilisées en pharmacopée traditionnelle béninoise.

Notre travail a permis d'identifier deux peptides dérivés de la CGA, la catestatine et la cateslytine, actifs contre des pathogènes intestinaux : *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1. Les concentrations inhibitrices minimales de ces deux peptides antimicrobiens (PAMs) se situent entre 25 et 100 μM . Plusieurs autres peptides dérivés de la CGA ont également été testés et se sont révélés inactifs sur ces pathogènes pour des concentrations inférieures ou égales à 100 μM . Ceci est notamment le cas pour la chromofungine, CGA₄₇₋₆₆ qui se situe dans la partie vasostatine-I de la CGA et pour la procatestatine, le fragment précurseur de la catestatine. Cette différence d'action des différents peptides pourrait s'expliquer par leur charge respective, (+5) pour la cateslytine et la catestatine, (-4) pour la procatestatine et (+2) pour la chromofungine. En effet, des études antérieures ont montré que la charge cationique des peptides est importante pour leurs interactions avec les membranes bactériennes chargées négativement. D'autres facteurs, comme la dégradation des peptides par les protéases bactériennes peuvent également être responsables de la différence d'activité observée. Pour savoir si c'est le cas pour les peptides que nous étudions avec les différentes souches bactériennes choisies, nous avons lors de nos travaux, étudiés les surnageants bactériens en présence des différents peptides. Ils s'avèrent que les bactéries sécrètent pour se défendre, des protéases qui sont capables de dégrader les peptides pour en diminuer l'activité ou les rendre inefficaces. Parmi les peptides testés, c'est la cateslytine qui résiste le mieux à la dégradation protéolytique. Les nouveaux peptides générés ont été caractérisés et ces dégradations montrent qu'il est nécessaire de protéger les peptides pour en accroître l'activité. Différentes méthodes peuvent être utilisées : l'amidation des COOH terminaux, l'ajout de tryptophane à l'une ou l'autre des extrémités et les peptides "drug design" basés sur les approches décrites dans le chapitre 2 de la première partie de ce document. Nos peptides

présentent des CMI élevées. Il serait envisageable de les utiliser de préférence comme des adjuvants pour potentialiser l'effet d'antibiotique. Dans ce but, les tests réalisés en combinant la cateslytine, le peptide le plus actif à la minocycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines qui inhibe la synthèse protéique, ont montré que cette combinaison peptide-antibiotique peut avoir un effet synergique. Nous avons également montré qu'en présence de la minocycline, la cateslytine résiste à la dégradation par les protéases bactériennes. Le mécanisme par lequel cette association agit peut-être décrit. La cateslytine en interagissant avec la membrane bactérienne permet l'entrée rapide de la minocycline dans la cellule bactérienne. La minocycline se fixe alors sur la sous-unité 30S du ribosome et empêche la synthèse protéique des bactéries. Les protéases bactériennes n'étant plus produites, elles ne pourront pas dégrader le peptide. Ces résultats montrent aussi que la combinaison des peptides avec les antibiotiques permet de réduire les doses d'antibiotiques utiles pour combattre une infection, réduisant ainsi les coûts pharmaceutiques, les problèmes liés aux doses massives d'antibiotiques, les phénomènes de résistance et les phénomènes délétères liés aux antibiotiques.

Nos travaux ont aussi permis d'étudier l'effet de deux peptides antimicrobiens, la catestatine et la chromofungine sur les cellules BON. Ces cellules sont une lignée cellulaire isolée d'une tumeur carcinoïde du pancréas chez l'humain. Ce sont des cellules de type entérochromaffines qui sécrètent la sérotonine et la CGA. L'étude de l'interaction peptide-cellule grâce au modèle des cellules BON, a permis d'identifier les protéines sécrétées par celles-ci pour chaque type de stimulation (ionomycine, chromofungine, catestatine) et de comparer avec les sécrétions basales. Ces résultats montrent que la CGA est présente majoritairement dans les sécrétions des cellules BON et encore plus, dans celles induites par la chromofungine. D'autre part, la chromofungine s'est révélée être un meilleur sécrétagogue que l'ionomycine habituellement utilisée pour induire les sécrétions de cellules BON. L'étude des mécanismes d'action des deux peptides dérivés de la CGA par microscopie calcique montre que la chromofungine induit un influx de calcium dans les cellules BON. La microscopie confocale montre que la catestatine pénètre dans les cellules BON et marque les noyaux tandis que la chromofungine a plus tendance à interagir avec la membrane plasmique. Une partie des mécanismes d'action de ces deux peptides passerait par les SOCs, mais sans l'implication des SERCA.

Enfin, l'étude de l'interaction plante-bactérie sur des bactéries responsables de diarrhées nous a permis d'identifier des plantes ayant une activité contre ces pathogènes intestinaux. *Vernonia amygdalina*, *Lantana camara*, *Crateva religiosa* et *Chromolaena odorata* sont les plantes dont les extraits sont les plus actifs. *C. odorata* présente la meilleure activité antibactérienne et deux principes actifs responsables de celle-ci ont été isolés et identifiés : la sinensétine et l'O-tétraméthyléther scutellaréine. Ces travaux nous ont ainsi permis de confirmer ou d'infirmer l'usage de 14 plantes utilisées couramment en médecine traditionnelles.

Différentes pistes sont envisagées pour poursuivre ces travaux. S'agissant de l'interaction peptide-bactérie, nos résultats ont montré qu'il est nécessaire de protéger le peptide de l'action des protéases bactériennes. L'une ou l'autre des techniques de "drug design" pourrait être explorée. De plus, au niveau intestinal, nous envisageons d'intégrer les peptides dans les liposomes afin de permettre une meilleure absorption et accessibilité à leur site d'action. Ces liposomes contenant des peptides et les peptides seuls doivent être testés sur des modèles animaux pour en confirmer l'efficacité. D'autres pistes innovantes telles que les biomatériaux à usage médical pouvant recouvrir les cathéters ou les valves cardiaques pourraient être des applications pour nos peptides. Il serait également intéressant de tester la cateslytine et ses dérivés modifiés en association avec plusieurs antibiotiques afin de voir si d'autres antibiotiques agissant sur la synthèse protéique ou sur d'autres cibles cellulaires ont également un rôle protecteur de la dégradation du peptide par les protéases.

S'agissant de l'interaction peptide-cellule, il est important d'identifier les autres mécanismes par lesquels ces peptides pénètrent dans les cellules et quels sont leurs rôles *in vivo*. De plus, la CGA est un marqueur de nombreuses tumeurs neuroendocrines. C'est une protéine de plus de 400 acides aminés donc il serait intéressant d'identifier des peptides qui pourraient être utilisés comme marqueur plutôt que la protéine entière au niveau des tumeurs de l'intestin. Des recherches translationnelles en collaboration avec le Service de Réanimation de l'Hôpital de Hautepierre sont en cours de développement.

Pour l'interaction plante-bactérie, d'autres molécules actives peuvent être caractérisées à partir des plantes les plus actives et ces molécules peuvent être étudiées en synergie avec d'autres antimicrobiens afin d'identifier de nouveaux traitements contre les infections et les infections intestinales en particulier. Dans le cadre spécifique de l'Afrique, il est plus intéressant de fabriquer des phytomédicaments que d'isoler des molécules car l'isolement augmente les coûts de revient du médicament. Cependant, l'isolement des principes actifs est important car ceux-ci pourraient servir à évaluer la qualité des phytomédicaments et à rendre les préparations plus efficaces. Les molécules isolées constituent également de bons candidats pour des applications pharmaceutiques.

Références bibliographiques

- Abbah, J., Amos, S., Chindo, B., Ngazal, I., Vongtau, H.O., Adzu, B., Farida, T., Odutola, A.A., Wambebe, C. and Gamaniel, K.S. (2010) Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *J Ethnopharmacol*, 127, 85-90.
- Abbas, A. and Lichtman, A. (2005) *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*.
- Abotsi, W.M., Woode, E., Ainooson, G.K., Amo-Barimah, A.K. and Boakye-Gyasi, E. (2010) Antiarthritic and antioxidant effects of the leaf extract of *Ficus exasperata* P. Beauv. (Moraceae). *Pharmacognosy Res*, 2, 89-97.
- Ademola, I.O. and Eloff, J.N. (2011) Anthelmintic activity of acetone extract and fractions of *Vernonia amygdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Trop Anim Health Prod*, 43, 521-527.
- Agassounon Djikpo-Tchibozo, M., Karou, S.D., Sanon, S., Toukourou, F. and de Souza, C. (2010) In vitro antiplasmodial properties of *Flacourtia flavescens* Willd. (Flacourtiaceae) and *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns (Rubiaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8, 66-68.
- Akaddar, A., Doderer-Lang, C., Marzahn, M.R., Delalande, F., Mousli, M., Helle, K., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Dunn, B.M., Metz-Boutigue, M.H. and Candolfi, E. (2010) Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1005-1015.
- Akinmoladun, A., Ibukun, E.O. and Dan-Ologe, I. (2007) Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Sci. Res. Essays*, 2, 191-194.
- Anago, E., Lagnika, L., Gbenou, J., Loko, F., Moudachirou, M. and Sanni, A. (2011) Antibacterial activity and phytochemical study of six medicinal plants used in Benin. *Pak J Biol Sci*, 14, 449-455.
- Andoniou, C.E., van Dommelen, S.L., Voigt, V., Andrews, D.M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K.J., Trinchieri, G. and Degli-Esposti, M.A. (2005) Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol*, 6, 1011-1019.
- Andreu, P., Perret, C. and Romagnolo, B. (2006) [Wnt and gastrointestinal stem cells: dangerous connections]. *Med Sci (Paris)*, 22, 693-695.
- Angelone, T., Quintieri, A.M., Goumon, Y., Di Felice, V., Filice, E., Gattuso, A., Mazza, R., Corti, A., Tota, B., Metz-Boutigue, M.H. and Cerra, M.C. (2010) Cytoskeleton mediates negative inotropism and lusitropism of chromogranin A-derived peptides (human vasostatin1-78 and rat CgA) in the rat heart. *Regul Pept*, 165, 78-85.
- Arbonnier, M. (2009) *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. Quae, MNHN.
- Aung, G., Niyonsaba, F., Ushio, H., Hoq, M.I., Ikeda, S., Ogawa, H. and Okumura, K. (2011) A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci*, 61, 142-144.
- Aung, G., Niyonsaba, F., Ushio, H., Kajiwara, N., Saito, H., Ikeda, S., Ogawa, H. and Okumura, K. (2011) Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology*, 132, 527-539.
- Aunis, D. (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol*, 181, 213-320.
- Aunis, D. (2009) GRANINS: thirty-five happy years in the granulosome world. Preface. *Regul Pept*, 165, 3-4.

- Balls, A.K., Hale, W.S. and Harris, T.H. (1942) A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem*, 17, 243-245.
- Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, 1, 141-150.
- Baltzer, S.A. and Brown, M.H. (2011) Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 20, 228-235.
- Bancroft, G.J. (1993) The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol*, 5, 503-510.
- Banga Singh, K.K., Ojha, S.C., Deris, Z.Z. and Rahman, R.A. (2011) A 9-year study of shigellosis in Northeast Malaysia: Antimicrobial susceptibility and shifting species dominance. *Z Gesundh Wiss*, 19, 231-236.
- Bani, S., Kaul, A., Khan, B., Ahmad, S.F., Suri, K.A., Gupta, B.D., Satti, N.K. and Qazi, G.N. (2006) Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytother Res*, 20, 279-287.
- Banks, P. and Helle, K. (1965) The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J*, 97, 40C-41C.
- Barreto, F., Sousa, E., Campos, A., Costa, J. and Rodrigues, F. (2010) Antibacterial Activity of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* Brig Extracts from Cariri-Ceara, Brazil. *J Young Pharm*, 2, 42-44.
- Bartolomucci, A., Pasinetti, G.M. and Salton, S.R. (2010) Granins as disease-biomarkers: translational potential for psychiatric and neurological disorders. *Neuroscience*, 170, 289-297.
- Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S.K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y.P. and Salton, S.R. (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev*, 32, 755-797.
- Barua, R.N., Sharma, R.P., Thyagarajan, G. and Hertz, W. (1978) Flavonoids of *Chromolaena odorata*. *Phytochemistry*, 17, 1807-1808.
- Baumann, T., Kampfer, U., Schurch, S., Schaller, J., Largiader, C., Nentwig, W. and Kuhn-Nentwig, L. (2010) Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2787-2798.
- Bechinger, B. (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1462, 157-183.
- Begue, W.J. and Kline R.M. (1972) The use of tetrazolium salts in bioautographic procedure. *Journal of chromatography*, 64, 182-184.
- Benachour, H., Zaiou, M., Samara, A., Herbeth, B., Pfister, M., Lambert, D., Siest, G. and Visvikis-Siest, S. (2009) Association of human cathelicidin (hCAP-18/LL-37) gene expression with cardiovascular disease risk factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19, 720-728.
- Benedum, U.M., Lamouroux, A., Konecki, D.S., Rosa, P., Hille, A., Baeuerle, P.A., Frank, R., Lottspeich, F., Mallet, J. and Huttner, W.B. (1987) The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region. *Embo J*, 6, 1203-1211.
- Benoit, M., Desnues, B. and Mege, J.L. (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*, 181, 3733-3739.
- Bentivoglio, M. and Pacini, P. (1995) Filippo Pacini: a determined observer. *Brain Res Bull*, 38, 161-165.
- Beranova-Giorgianni, S., Zhao, Y., Desiderio, D.M. and Giorgianni, F. (2006) Phosphoproteomic analysis of the human pituitary. *Pituitary*, 9, 109-120.
- Bernard, F.X., Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.F., Crouzet, J. and Blanche, F. (1997) Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 992-998.
- Besedovsky, H.O. and del Rey, A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17, 64-102.
- Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J. and Spiess, M. (2004) Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem*, 279, 20242-20249.

- Bevins, C.L. and Salzman, N.H. (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 9, 356-368.
- Bian, Z., Guo, Y., Ha, B., Zen, K. and Liu, Y. (2012) Regulation of the Inflammatory Response: Enhancing Neutrophil Infiltration under Chronic Inflammatory Conditions. *J Immunol*, 188, 844-853.
- Bindoni, M., Perciavalle, V., Berretta, S., Belluardo, N. and Diamantstein, T. (1988) Interleukin 2 modifies the bioelectric activity of some neurosecretory nuclei in the rat hypothalamus. *Brain Res*, 462, 10-14.
- Biran, V., Gaudin, A., Mariani-Kurdjian, P., Doit, C., Bingen, E. and Aujard, Y. (2010) [Implication of extended-spectrum beta-lactamase enterobacteriaceae in nosocomial infections in neonates]. *Arch Pediatr*, 17 Suppl 4, S150-153.
- Bishop, R.E., Kim, S.H. and El Zoeiby, A. (2005) Role of lipid A palmitoylation in bacterial pathogenesis. *J Endotoxin Res*, 11, 174-180.
- Bisi-Johnson, M.A., Obi, C.L., Hattori, T., Oshima, Y., Li, S., Kambizi, L., Eloff, J.N. and Vasaikar, S.D. (2011) Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants. *BMC Complement Altern Med*, 11, 14.
- Biswas, N., Rodriguez-Flores, J.L., Courel, M., Gayen, J.R., Vaingankar, S.M., Mahata, M., Torpey, J.W., Taupenot, L., O'Connor, D.T. and Mahata, S.K. (2009) Cathepsin L colocalizes with chromogranin a in chromaffin vesicles to generate active peptides. *Endocrinology*, 150, 3547-3557.
- Blanchette, C.D., Woo, Y.H., Thomas, C., Shen, N., Sulchek, T.A. and Hiddessen, A.L. (2009) Decoupling internalization, acidification and phagosomal-endosomal/lysosomal fusion during phagocytosis of InlA coated beads in epithelial cells. *PLoS One*, 4, e6056.
- Blaschko, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M. and Smith, A.D. (1967) Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*, 215, 58-59.
- Blaschko, H. and Welch, A.D. (1953) Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 219, 17-22.
- Boman, H.G., Agerberth, B. and Boman, A. (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun*, 61, 2978-2984.
- Borregaard, N. and Cowland, J.B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521.
- Boullard, B. (2001) *Plantes Médicinales du Monde- Réalités et Croyances*. ESTEM.
- Bowdish, D.M. and Hancock, R.E. (2005) Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins. *J Endotoxin Res*, 11, 230-236.
- Bradshaw, J. (2003) Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *BioDrugs*, 17, 233-240.
- Braff, M.H., Zaiou, M., Fierer, J., Nizet, V. and Gallo, R.L. (2005) Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun*, 73, 6771-6781.
- Brandenburg, K., Andra, J., Garidel, P. and Gutschmann, T. (2011) Peptide-based treatment of sepsis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 799-808.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535.
- Briolat, J., Wu, S.D., Mahata, S.K., Gonthier, B., Bagnard, D., Chasserot-Golaz, S., Helle, K.B., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (2005) New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci*, 62, 377-385.
- Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-250.
- Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B., Jr. and Tack, B.F. (2003) Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents*, 22, 465-478.

- Brotman, Y., Makovitzki, A., Shai, Y., Chet, I. and Viterbo, A. (2009) Synthetic ultrashort cationic lipopeptides induce systemic plant defense responses against bacterial and fungal pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 75, 5373-5379.
- Bruschi, M., Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S.F., Baster, I., Scorciapino, M.A., Casu, M. and Rinaldi, A.C. (2010) Synthesis, characterization, antimicrobial activity and LPS-interaction properties of SB041, a novel dendrimeric peptide with antimicrobial properties. *Peptides*, 31, 1459-1467.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. and Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23, 329-344.
- Bum, E.N., Taiwe, G.S., Nkainsa, L.A., Moto, F.C., Seke Etet, P.F., Hiana, I.R., Bailabar, T., Rouyatou, Seyni, P., Rakotonirina, A. and Rakotonirina, S.V. (2009) Validation of anticonvulsant and sedative activity of six medicinal plants. *Epilepsy Behav*, 14, 454-458.
- Burdick, M.D., Harris, A., Reid, C.J., Iwamura, T. and Hollingsworth, M.A. (1997) Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem*, 272, 24198-24202.
- Burmester, G.-R. and Pezzutto, A. (2005) *Atlas de poche d'immunologie*. Flammarion Médecine-Sciences.
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobón, E., Samayoa, B., Jauregui, E., Peralta, E. and Carrillo, G. (1995) Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethnopharmacol*, 48, 85-88.
- Calvo, J. and Martínez-Martínez, L. (2009) [Antimicrobial mechanisms of action]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27, 44-52.
- Cambier, L., Defaweux, V., Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Bagut, E.T., Antoine, N. and Mignon, B. (2010) Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes. *Ann. Méd. Vét.*, 154, 104-112.
- Cassone, M. and Otvos, L., Jr. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8, 703-716.
- Cattoir, V. (2004) [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)*, 52, 607-616.
- Cecconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G. and Corti, A. (2002) Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *Eur Heart J*, 23, 967-974.
- Chakraborty, T.R., Tkalych, O., Nanno, D., Garcia, A.L., Devi, L.A. and Salton, S.R. (2006) Quantification of VGF- and pro-SAAS-derived peptides in endocrine tissues and the brain, and their regulation by diet and cold stress. *Brain Res*, 1089, 21-32.
- Chan, S.C., Hui, L. and Chen, H.M. (1998) Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells. *Anticancer Res*, 18, 4467-4474.
- Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S. and Snowden, N. (2004) *Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques*. De Boeck Université.
- Chen, J.Y., Cook, M.R., Pinchot, S.N., Kunnimalaiyaan, M. and Chen, H. (2010) MG-132 inhibits carcinoid growth and alters the neuroendocrine phenotype. *J Surg Res*, 158, 15-19.
- Cheng, H. (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *Am J Anat*, 141, 521-535.
- Chin, J.N., Jones, R.N., Sader, H.S., Savage, P.B. and Rybak, M.J. (2008) Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 61, 365-370.
- Chin, J.N., Rybak, M.J., Cheung, C.M. and Savage, P.B. (2007) Antimicrobial activities of ceragenins against clinical isolates of resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1268-1273.
- Chinetti-Gbaguidi, G. (2007) Hétérogénéité des macrophages dans l'athérosclérose: une nouvelle cible thérapeutique. *La lettre de la NFSA*, 30.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. and Palucka, A.K. (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*, 1, 510-514.
- Clarac, F. and Ternaux, J.-P. (2008) *Encyclopédie historique des neurosciences: Du neurone à l'émergence de la pensée*. De Boeck.

- Cochrane, C.G. and Muller-Eberhard, H.J. (1968) The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J Exp Med*, 127, 371-386.
- Collier-Hyams, L.S. and Neish, A.S. (2005) Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*, 62, 1339-1348.
- Collin, F., Karkare, S. and Maxwell, A. (2011) Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92, 479-497.
- Corone, A. (1964) [Lysopain In Transtympanic Aerosols]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 81, 367-368.
- Corti, A., Ferrari, R. and Ceconi, C. (2000) Chromogranin A and tumor necrosis factor- α (TNF) in chronic heart failure. *Adv Exp Med Biol*, 482, 351-359.
- Cox, P.A. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Found Symp*, 185, 25-36; discussion 36-41.
- Cozzi, M.G. and Zanini, A. (1986) Sulfated LH subunits and a tyrosine-sulfated secretory protein (secretogranin II) in female rat adenohipophyses: changes with age and stimulation of release by LHRH. *Mol Cell Endocrinol*, 44, 47-54.
- Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 38, 99-107.
- d'Andon, A., Sarnacki, S., Couanet, D., Grill, J. and Hartmann, O. (2004) Tumeur carcinoïde. *De la recherche à la vie*. Institut Gustave-Roussy.
- Dandawate, P.R., Vyas, A.C., Padhye, S.B., Singh, M.W. and Baruah, J.B. (2010) Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds. *Mini Rev Med Chem*, 10, 436-454.
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J. and Chertov, O. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, 192, 1069-1074.
- Deban, L., Jaillon, S., Garlanda, C., Bottazzi, B. and Mantovani, A. (2010) Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res*, 343, 237-249.
- Delgado, M., Pozo, D. and Ganea, D. (2004) The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev*, 56, 249-290.
- Delneste, Y., Beauvillain, C. and Jeannin, P. (2007) [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)*, 23, 67-73.
- Demers, B. and Sansonetti, P. (1997) Mécanismes moléculaires des diarrhées bactériennes. *Médecine thérapeutique*, 3, 315-325.
- Dennison, S.R., Howe, J., Morton, L.H., Brandenburg, K., Harris, F. and Phoenix, D.A. (2006) Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 347, 1006-1010.
- Devine, D.A. (2003) Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol*, 40, 431-443.
- Di Comite, G., Grazia Sabbadini, M., Corti, A., Rovere-Querini, P. and Manfredi, A.A. (2007) Conversation galante: how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmun Rev*, 7, 23-29.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. and Kisich, K.O. (2009) The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*, 15, 2377-2392.
- Dillen, L., Miserez, B., Claeys, M., Aunis, D. and De Potter, W. (1993) Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. *Neurochem Int*, 22, 315-352.
- Dimarcq, J.L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers*, 47, 465-477.
- Dimarcq, J.L., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hoffmann, D. and Reichhart, J.M. (1990) Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterocin, in *Phormia terranova*. *Embo J*, 9, 2507-2515.
- Dinda, B., Chowdhury, D.R. and Mohanta, B.C. (2009) Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 57, 765-796.
- Dobrzynska, I., Szachowicz-Petelska, B., Skrzydlewska, E. and Figaszewski, Z.A. (2004) Changes in electric charge and phospholipids composition in erythrocyte membrane of ethanol-poisoned rats after administration of teas. *Acta Pol Pharm*, 61, 483-487.

- Dopazo, A., Lovenberg, T.W., Danielson, P.E., Ottiger, H.P. and Sutcliffe, J.G. (1993) Primary structure of mouse secretogranin III and its absence from deficient mice. *J Mol Neurosci*, 4, 225-233.
- Dorschner, R.A., Pestonjamas, V.K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G.H. and Gallo, R.L. (2001) Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol*, 117, 91-97.
- Drawz, S.M. and Bonomo, R.A. (2010) Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*, 23, 160-201.
- Dubos, R.J. and Cattaneo, C. (1939) Studies On A Bactericidal Agent Extracted From A Soil *Bacillus*: Iii. Preparation And Activity Of A Protein-Free Fraction. *J Exp Med*, 70, 249-256.
- Dunkelberger, J.R. and Song, W.C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20, 34-50.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (2006) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer.
- Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chemica scandinavica*, 4, 283-293.
- Egger, M., Beer, A.G., Theurl, M., Schgoer, W., Hotter, B., Tatarczyk, T., Vasiljevic, D., Frauscher, S., Marksteiner, J., Patsch, J.R., Schratzberger, P., Djanani, A.M., Mahata, S.K. and Kirchmair, R. (2008) Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin. *Eur J Pharmacol*, 598, 104-111.
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A. and Grishin, E.V. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26, 2064-2073.
- Eiden, L.E. (1987) Is chromogranin a prohormone? *Nature*, 325, 301.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. and Vizi, E.S. (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 52, 595-638.
- Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 705-712.
- Eband, R.F., Mowery, B.P., Lee, S.E., Stahl, S.S., Lehrer, R.I., Gellman, S.H. and Eband, R.M. (2008) Dual mechanism of bacterial lethality for a cationic sequence-random copolymer that mimics host-defense antimicrobial peptides. *J Mol Biol*, 379, 38-50.
- Eband, R.F., Savage, P.B. and Eband, R.M. (2007) Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochim Biophys Acta*, 1768, 2500-2509.
- Eband, R.M. and Eband, R.F. (2010) Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J Pept Sci*, 17, 298-305.
- Epstein, O., de Bono, D.P., Perkin, D.G. and Cookson, J. (1999) *Examen clinique: Eléments de sémiologie médicale*. De Boeck.
- Escribese, M.M., Rodriguez-Garcia, M., Sperling, R., Engel, S.M., Gallart, T. and Moran, T.M. (2011) Alpha-defensins 1-3 release by dendritic cells is reduced by estrogen. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 118.
- Eskeland, N.L., Zhou, A., Dinh, T.Q., Wu, H., Parmer, R.J., Mains, R.E. and O'Connor, D.T. (1996) Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. *J Clin Invest*, 98, 148-156.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J.C., Aunis, D., Schaaf, P., Metz-Boutigue, M.H., Bolcato-Bellemin, A.L. and Egles, C. (2005) Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*, 26, 6704-6712.
- Ettlinger, M.G., Dateo, G.P., Jr., Harrison, B.W., Mabry, T.J. and Thompson, C.P. (1961) Vitamin C as a coenzyme: the hydrolysis of mustard oil glucosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47, 1875-1880.
- EUCAST. (2000) EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*, 6, 503-508.

- Evers, B.M., Ishizuka, J., Townsend, C.M., Jr. and Thompson, J.C. (1994) The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci*, 733, 393-406.
- Evers, B.M., Townsend, C.M., Jr., Upp, J.R., Allen, E., Hurlbut, S.C., Kim, S.W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J.C. and Thompson, J.C. (1991) Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*, 101, 303-311.
- Falcone, F.H., Knol, E.F. and Gibbs, B.F. (2011) The role of basophils in the pathogenesis of allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 41, 939-947.
- Falkensammer, G., Fischer-Colbrie, R., Richter, K. and Winkler, H. (1985) Cell-free and cellular synthesis of chromogranin A and B of bovine adrenal medulla. *Neuroscience*, 14, 735-746.
- Faller, A., Sprumont, P. and Schünke, M. (2006) *Le corps humain*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Farombi, E.O. and Owoeye, O. (2011) Antioxidative and chemopreventive properties of Vernonia amygdalina and Garcinia biflavonoid. *Int J Environ Res Public Health*, 8, 2533-2555.
- Findlay, B., Zhanel, G.G. and Schweizer, F. (2011) Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 4049-4058.
- Finking, R. and Marahiel, M.A. (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annu Rev Microbiol*, 58, 453-488.
- Fischer-Colbrie, R., Hagn, C., Kilpatrick, L. and Winkler, H. (1986) Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. *J Neurochem*, 47, 318-321.
- Fischer-Colbrie, R., Laslop, A. and Kirchmair, R. (1995) Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol*, 46, 49-70.
- Fischer-Colbrie, R., Lassmann, H., Hagn, C. and Winkler, H. (1985) Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in endocrine and nervous tissues. *Neuroscience*, 16, 547-555.
- Fischer-Colbrie, R. and Schober, M. (1987) Isolation and characterization of chromogranins A, B, and C from bovine chromaffin granules and a rat pheochromocytoma. *J Neurochem*, 48, 262-270.
- Fishelson, Z. and Muller-Eberhard, H.J. (1987) Regulation of the alternative pathway of human complement by C1q. *Mol Immunol*, 24, 987-993.
- Fleming, A. and Allison, V.D. (1922) Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues.
- Fournier, I., Gaucher, D., Chich, J.F., Bach, C., Shooshtarizadeh, P., Picaud, S., Bourcier, T., Speeg-Schatz, C., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Corti, A., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (2010) Processing of chromogranins/secretogranin in patients with diabetic retinopathy. *Regul Pept*, 167, 118-124.
- Fowler, Z.L. and Koffas, M.A. (2009) Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83, 799-808.
- Freeman, H.J. (2008) Crypt region localization of intestinal stem cells in adults. *World J Gastroenterol*, 14, 7160-7162.
- Freter, R. (1974) Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*, 27, 1409-1416.
- Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, L.A. and Douglass, J. (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci*, 20, 639-648.
- Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E. and Nicolaidis, D.N. (2004) Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des*, 10, 3813-3833.
- Gadroy, P., Stridsberg, M., Capon, C., Michalski, J.C., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (1998) Phosphorylation and O-glycosylation sites of human chromogranin A (CGA79-439) from urine of patients with carcinoid tumors. *J Biol Chem*, 273, 34087-34097.

- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N.S., Altmeyer, P. and Kreuter, A. (2006) Changes of antimicrobial peptide mRNA expression in atopic eczema following phototherapy. *Br J Dermatol*, 155, 1275-1278.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A. and Moreno, M. (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol*, 3, 72-74.
- Gardner, J.F. (1950) Some antibiotics formed by bacterium coli. *Br J Exp Pathol*, 31, 102-111.
- Ghia, J.E., Crenner, F., Metz-Boutigue, M.H., Aunis, D. and Angel, F. (2004) Effects of a chromogranin-derived peptide (CgA 47-66) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Regul Pept*, 119, 199-207.
- Giclas, P.C. (2001) Alternative pathway evaluation. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 13, Unit 13 12.
- Giuliani, A. and Rinaldi, A.C. (2011) Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2255-2266.
- Glinicki, P. and Jeske, W. (2010) Chromogranin A (CgA)--the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on it's concentration in blood. *Endokrynol Pol*, 61, 384-387.
- Gonzalez, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O. and Sanchez de Medina, F. (2011) Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51, 331-362.
- Good, I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40, 237-264.
- Gorkiewicz, G. (2009) Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents*, 33 Suppl 1, S37-41.
- Goumon, Y., Lugardon, K., Kieffer, B., Lefevre, J.F., Van Dorselaer, A., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (1998) Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem*, 273, 29847-29856.
- Goumon, Y., Strub, J.M., Moniatte, M., Nullans, G., Poteur, L., Hubert, P., Van Dorselaer, A., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem*, 235, 516-525.
- Granucci, F., Zanoni, I., Pavelka, N., Van Dommelen, S.L., Andoniou, C.E., Belardelli, F., Degli Esposti, M.A. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2004) A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med*, 200, 287-295.
- Gratia, A. (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol*, 93, 1040-1042.
- Greenblatt, D.Y., Ndiaye, M., Chen, H. and Kunnimalaiyaan, M. (2010) Lithium inhibits carcinoid cell growth in vitro. *Am J Transl Res*, 2, 248-253.
- Gregory, A.D. and Houghton, A.M. (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res*, 71, 2411-2416.
- Guclu-Ustundag, O. and Mazza, G. (2007) Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47, 231-258.
- Guerin, M., Guillemot, J., Thouennon, E., Pierre, A., El-Yamani, F.Z., Montero-Hadjadje, M., Dubessy, C., Magoul, R., Lihrmann, I., Anouar, Y. and Yon, L. (2011) Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: Implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. *Regul Pept*, 165, 21-29.
- Guhl, S., Lee, H.H., Babina, M., Henz, B.M. and Zuberbier, T. (2005) Evidence for a restricted rather than generalized stimulatory response of skin-derived human mast cells to substance P. *J Neuroimmunol*, 163, 92-101.
- Gunell, M., Webber, M.A., Kotilainen, P., Lilly, A.J., Caddick, J.M., Jalava, J., Huovinen, P., Siitonen, A., Hakanen, A.J. and Piddock, L.J. (2009) Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3832-3836.
- Hakkim, A., Furnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E. and Zychlinsky, A. (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9813-9818.

- Hancock, R.E. and Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1317-1323.
- Hancock, R.E. and Sahl, H.G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24, 1551-1557.
- Hanh, T.T., Hang, D.T., Van Minh, C. and Dat, N.T. (2011) Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pac J Trop Med*, 4, 760-763.
- Hansen, R., Thomson, J.M., El-Omar, E.M. and Hold, G.L. (2010) The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 45, 266-276.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K. and Kinoshita, T. (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48, 125-129.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R. and Weaver, C.T. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 18, 349-356.
- Harris, F., Dennison, S.R. and Phoenix, D.A. (2009) Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci*, 10, 585-606.
- Hassan, H.S., Musa, A.M., Usman, M.A. and Abdulaziz, M. (2009) Preliminary phytochemical and antispasmodic studies of the stem bark of *Boswellia dalzielii*. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8.
- Helle, K.B. (2004) The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79, 769-794.
- Helle, K.B. (2010) Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions. *Regul Pept*, 165, 45-51.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K. and Doble, M. (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639-652.
- Henkel, A.W., Kang, G. and Kornhuber, J. (2001) A common molecular machinery for exocytosis and the 'kiss-and-run' mechanism in chromaffin cells is controlled by phosphorylation. *J Cell Sci*, 114, 4613-4620.
- Henzler-Wildman, K.A., Martinez, G.V., Brown, M.F. and Ramamoorthy, A. (2004) Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry*, 43, 8459-8469.
- Hill, D.A. and Artis, D. (2010) Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 28, 623-667.
- Hillarp, N.A. (1958) Isolation and some biochemical properties of the catechol amine granules in the cow adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, 43, 82-96.
- Hillarp, N.A. and Hokfelt, B. (1953) Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol Scand*, 30, 55-68.
- Hirano, T., Gotoh, M. and Oka, K. (1994) Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci*, 55, 1061-1069.
- Hirsh, D.J., Hammer, J., Maloy, W.L., Blazyk, J. and Schaefer, J. (1996) Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 35, 12733-12741.
- Hoenigl, M., Valentin, T., Zarfel, G., Wuerstl, B., Leitner, E., Salzer, H.J., Posch, J., Krause, R. and Grisold, A.J. (2012) Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2158-2161.
- Hoffmann, J.A. (1995) Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*, 7, 4-10.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. and Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol*, 8, 8-13.
- Hoffmann, K.M., Deutschmann, A., Weitzer, C., Joainig, M., Zechner, E., Hogenauer, C. and Hauer, A.C. (2010) Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*, 125, e960-963.
- Hoq, M.I., Niyonsaba, F., Ushio, H., Aung, G., Okumura, K. and Ogawa, H. (2011) Human catestatin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 64, 108-118.
- Horii, T., Osaki, M. and Muramatsu, H. (2008) Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*. *Chemotherapy*, 54, 323-327.
- Horiuchi, K., Naito, I., Nakano, K., Nakatani, S., Nishida, K., Taguchi, T. and Ohtsuka, A. (2005) Three-dimensional ultrastructure of the brush border glycocalyx in the mouse small

- intestine: a high resolution scanning electron microscopic study. *Arch Histol Cytol*, 68, 51-56.
- Hoskin, D.W. and Ramamoorthy, A. (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 357-375.
- Hsi, K.L., Seidah, N.G., De Serres, G. and Chretien, M. (1982) Isolation and NH₂-terminal sequence of a novel porcine anterior pituitary polypeptide. Homology to proinsulin, secretin and Rous sarcoma virus transforming protein TVFV60. *FEBS Lett*, 147, 261-266.
- Hugli, T.E. (1975) Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure. *J Biol Chem*, 250, 8293-8301.
- Huh, Y.H., Jeon, S.H. and Yoo, S.H. (2003) Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem*, 278, 40581-40589.
- Hung, T.M., Cuong, T.D., Dang, N.H., Zhu, S., Long, P.Q., Komatsu, K. and Min, B.S. (2011) Flavonoid glycosides from *Chromolaena odorata* leaves and their in vitro cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 59, 129-131.
- Hungate, R.E. (1967) Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Arch Mikrobiol*, 59, 158-164.
- Huttner, W.B., Gerdes, H.H. and Rosa, P. (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci*, 16, 27-30.
- Iguchi, H., Chan, J.S., Seidah, N.G. and Chretien, M. (1984) Tissue distribution and molecular forms of a novel pituitary protein in the rat. *Neuroendocrinology*, 39, 453-458.
- Iikura, M., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Kawasaki, H., Matsushima, K., Kitaura, M., Morita, Y., Yoshie, O., Yamamoto, K. and Hirai, K. (2001) Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol*, 70, 113-120.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. and Shimamura, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta*, 1147, 132-136.
- Irobi, O. (1992) Activities of *Chromolaena odorata* (Compositae) leaf extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 8 1-83.
- Ischia, R., Lovisetti-Scamihorn, P., Hogue-Angeletti, R., Wolkersdorfer, M., Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. (1997) Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT_{1B} receptor antagonist activity. *J Biol Chem*, 272, 11657-11662.
- Itzkowitz, S.H. and Yio, X. (2004) Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G7-17.
- Ivanov, D.V. and Egorov, A.M. (2008) [Spreading and mechanisms of antibiotic resistance of microorganisms, producing beta-lactamases. Molecular mechanisms of resistance to beta-lactams of *Klebsiella* spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections]. *Biomed Khim*, 54, 104-113.
- Jafari, F., Hamidian, M., Rezadehbashi, M., Doyle, M., Salmanzadeh-Ahrabi, S., Derakhshan, F. and Reza Zali, M. (2009) Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 20, e56-62.
- Jean-Francois, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M.H. and Dufourc, E.J. (2008a) Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry*, 47, 6394-6402.
- Jean-Francois, F., Desbat, B. and Dufourc, E.J. (2009) Selectivity of cateslytin for fungi: the role of acidic lipid-ergosterol membrane fluidity in antimicrobial action. *Faseb J*, 23, 3692-3701.
- Jean-Francois, F., Elezgaray, J., Berson, P., Vacher, P. and Dufourc, E.J. (2008b) Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophys J*, 95, 5748-5756.
- Jean-Francois, F., Khemtouri, L., Odaert, B., Castano, S., Grelard, A., Manigand, C., Bathany, K., Metz-Boutigue, M.H. and Dufourc, E.J. (2007) Variability in secondary structure of the antimicrobial peptide Cateslytin in powder, solution, DPC micelles and at the air-water interface. *Eur Biophys J*, 36, 1019-1027.
- Jeng, Y.J., Townsend, C.M., Jr., Nagasawa, S., Chuo, S., Kern, K., Yanaihara, N., Ferrar, R.S., Hill, F.L., Thompson, J.C. and Greeley, G.H., Jr. (1991) Regulation of pancreastatin release from a human pancreatic carcinoid cell line in vitro. *Endocrinology*, 128, 220-225.

- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R.E. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 19, 491-511.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J. and Tarkowski, A. (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*, 172, 1169-1176.
- Jung, C., Hugot, J.P. and Barreau, F. (2010) Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflamm*, 2010, 823710.
- Kabelitz, D. and Medzhitov, R. (2007) Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*, 19, 1-3.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J. and Kropp, H. (1974) The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci*, 235, 364-386.
- Kalfa, V.C. and Brogden, K.A. (1999) Anionic antimicrobial peptide-lysozyme interactions in innate pulmonary immunity. *Int J Antimicrob Agents*, 13, 47-51.
- Kang, S.I., Shin, H.S., Ko, H.C. and Kim, S.J. (2012) Effects of Sinensetin on Lipid Metabolism in Mature 3T3-L1 Adipocytes. *Phytother Res*.
- Kang, Y.K. and Yoo, S.H. (1997) Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett*, 404, 87-90.
- Karasuyama, H., Wada, T., Yoshikawa, S. and Obata, K. (2011) Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites. *Trends Immunol*, 32, 125-130.
- Karlinger, K., Gyorke, T., Mako, E., Mester, A. and Tarjan, Z. (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 35, 154-167.
- Karnovsky, M.L. (1981) Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med*, 304, 1178-1180.
- Kennedy, B.P., Mahata, S.K., O'Connor, D.T. and Ziegler, M.G. (1998) Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides*, 19, 1241-1248.
- Khalifa, A.B., Mastouri, M., Abdallah, H.B., Noomen, S. and Kheder, M. (2010) [Acquired bacterial meningitis in Monastir region, Tunisia (1999-2006): bacteriological aspects and susceptibility patterns]. *Bull Soc Pathol Exot*, 104, 42-48.
- Kichler, A., Mason, A.J. and Bechinger, B. (2006) Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 301-307.
- Kieffer, A.E., Goumon, Y., Ruh, O., Chasserot-Golaz, S., Nullans, G., Gasnier, C., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (2003) The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J*, 17, 776-778.
- Kierszenbaum, A.L. (2006) *Histologie et biologie cellulaire*. De Boeck.
- Kim, T., Tao-Cheng, J.H., Eiden, L.E. and Loh, Y.P. (2001) Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 106, 499-509.
- Kim, Y.S. and Ho, S.B. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*, 12, 319-330.
- Kita, H. (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*, 242, 161-177.
- Kittner, J.M., Jacobs, R., Pawlak, C.R., Heijnen, C.J., Schedlowski, M. and Schmidt, R.E. (2002) Adrenaline-induced immunological changes are altered in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 1031-1039.
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrucker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P.S., Vogelmeier, C., Gallo, R.L., Clauss, M. and Bals, R. (2003) An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*, 111, 1665-1672.
- Konecki, D.S., Benedum, U.M., Gerdes, H.H. and Huttner, W.B. (1987) The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem*, 262, 17026-17030.
- Koshimizu, H., Cawley, N.X., Kim, T., Yergey, A.L. and Loh, Y.P. (2011) Serpinin: a novel chromogranin A-derived, secreted peptide up-regulates protease nexin-1 expression and granule biogenesis in endocrine cells. *Mol Endocrinol*, 25, 732-744.
- Koshimizu, H., Cawley, N.X., Yergey, A.L. and Loh, Y.P. (2011) Role of pGlu-Serpinin, a novel chromogranin a-derived peptide in inhibition of cell death. *J Mol Neurosci*, 45, 294-303.

- Kraus, D. and Peschel, A. (2006) Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306, 231-250.
- Krause, W.J. (2000) Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. *Prog Histochem Cytochem*, 35, 259-367.
- Krisch, K., Horvat, G., Krisch, I., Wengler, G., Alibeik, H., Neuhold, N., Ulrich, W., Braun, O. and Hochmeister, M. (1988) Immunochemical characterization of a novel secretory protein (defined by monoclonal antibody HISL-19) of peptide hormone producing cells which is distinct from chromogranin A, B, and C. *Lab Invest*, 58, 411-420.
- Kruger, P.G., Mahata, S.K. and Helle, K.B. (2003) Catestatin (CgA344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. *Regul Pept*, 114, 29-35.
- Kubmarawa, D., Ogunwande, I.A., Okorie, D.A., Olawore, N.O. and Kasali, A.A. (2006) Constituents of the Essential Oils of *Boswellia dalzielii* Hutch. from Nigeria. *J. Essent. Oil Res*, 18, 119-120.
- Kumar, P.A., Patterson, J. and Karpagam, P. (2009) Multiple antibiotic resistance profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139. *Jpn J Infect Dis*, 62, 230-232.
- Lacy, A. and O'Kennedy, R. (2004) Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Des*, 10, 3797-3811.
- Lacy, P. and Stow, J.L. (2011) Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood*, 118, 9-18.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamrani Alaoui, H., Oufdou, K. and Mezrioui, N.E. (2010) Determination of several potential virulence factors in non-o1 *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, faecal coliforms and streptococci isolated from Marrakesh groundwater. *Water Sci Technol*, 61, 1895-1905.
- Lange, K. (2011) Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J Cell Physiol*, 226, 896-927.
- Lassmann, H., Hagn, C., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H. (1986) Presence of chromogranin A, B and C in bovine endocrine and nervous tissues: a comparative immunohistochemical study. *Histochem J*, 18, 380-386.
- Lawrence, J.P., Ishizuka, J., Haber, B., Townsend, C.M., Jr. and Thompson, J.C. (1990) The effect of somatostatin on 5-hydroxytryptamine release from a carcinoid tumor. *Surgery*, 108, 1131-1134; discussion 1134-1135.
- Lee, J.C., Taylor, C.V., Gaucher, S.P., Toneff, T., Taupenot, L., Yasothornsrikul, S., Mahata, S.K., Sei, C., Parmer, R.J., Neveu, J.M., Lane, W.S., Gibson, B.W., O'Connor, D.T. and Hook, V.Y. (2003) Primary sequence characterization of catestatin intermediates and peptides defines proteolytic cleavage sites utilized for converting chromogranin a into active catestatin secreted from neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry*, 42, 6938-6946.
- Lee, M.T., Chen, F.Y. and Huang, H.W. (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry*, 43, 3590-3599.
- Lehrer, R.I. and Ganz, T. (1996) Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann NY Acad Sci*, 797, 228-239.
- Lemos, T.L., Monte, F.J., Santos, A.K., Fonseca, A.M., Santos, H.S., Oliveira, M.F., Costa, S.M., Pessoa, O.D. and Braz-Filho, R. (2007) Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. *Nat Prod Res*, 21, 529-550.
- Leontiadou, H., Mark, A.E. and Marrink, S.J. (2006) Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc*, 128, 12156-12161.
- Levy, O. (2004) Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol*, 76, 909-925.
- Liang, W., Liu, X.F., Huang, J., Zhu, D.M., Li, J. and Zhang, J. (2011) Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*, 11, 109.
- Liburdy, R.P. (1992) Biological interactions of cellular systems with time-varying magnetic fields. *Ann NY Acad Sci*, 649, 74-95.

- Lienkamp, K. and Tew, G.N. (2009) Synthetic mimics of antimicrobial peptides--a versatile ring-opening metathesis polymerization based platform for the synthesis of selective antibacterial and cell-penetrating polymers. *Chemistry*, 15, 11784-11800.
- Lillard, J.W., Jr., Boyaka, P.N., Hedrick, J.A., Zlotnik, A. and McGhee, J.R. (1999) Lymphotactin acts as an innate mucosal adjuvant. *J Immunol*, 162, 1959-1965.
- Linch, S.N. and Gold, J.A. (2011) The role of eosinophils in non-parasitic infections. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 11, 165-172.
- Lins, L. and Brasseur, R. (2008) Tilted peptides: a structural motif involved in protein membrane insertion? *J Pept Sci*, 14, 416-422.
- Liszewski, M.K., Farries, T.C., Lublin, D.M., Rooney, I.A. and Atkinson, J.P. (1996) Control of the complement system. *Adv Immunol*, 61, 201-283.
- Lominadze, G., Powell, D.W., Luerman, G.C., Link, A.J., Ward, R.A. and McLeish, K.R. (2005) Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics*, 4, 1503-1521.
- Louise, C.B. and Obrigg, T.G. (1992) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun*, 60, 1536-1543.
- Lu, X., Cao, X., Liu, X. and Jiao, B. (2010) Marine microbes-derived anti-bacterial agents. *Mini Rev Med Chem*, 10, 1077-1090.
- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A.E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem*, 276, 35875-35882.
- Mader, S. (2009) *Biologie humaine*. De Boeck.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Fung, M.M. and O'Connor, D.T. (1997) Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*, 162, 33-43.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Fung, M.M. and O'Connor, D.T. (2010) Reprint of: Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*, 165, 52-62.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Wen, G., Wong, W.B., Mahapatra, N.R., Hamilton, B.A. and O'Connor, D.T. (2004) The catecholamine release-inhibitory "catestatin" fragment of chromogranin a: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses. *Mol Pharmacol*, 66, 1180-1191.
- Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M. and Parmer, R.J. (1997) Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*, 100, 1623-1633.
- Makovitzki, A., Avrahami, D. and Shai, Y. (2006) Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 15997-16002.
- Makovitzki, A., Viterbo, A., Brotman, Y., Chet, I. and Shai, Y. (2007) Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens in vitro and in planta with ultrashort cationic lipopeptides. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6629-6636.
- Male, D. (2005) *Immunologie Aide-mémoire illustré*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Mangoni, M.L. and Shai, Y. (2011) Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences in cell specificities and modes of action. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2267-2280.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. and Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11, 519-531.
- Manu, K.A. and Kuttan, G. (2009) Immunomodulatory activities of Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 31, 377-387.
- Maroti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E. and Mergaert, P. (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol*, 162, 363-374.
- Marwick, C. (2002) US report calls for tighter controls on complementary medicine. *British Medical Journal*, 324, 870.
- Massironi, S., Fraquelli, M., Paggi, S., Sangiovanni, A., Conte, D., Sciola, V., Cifardini, C., Colombo, M. and Peracchi, M. (2009) Chromogranin A levels in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*, 41, 31-35.

- Masuda, K., Nakamura, K., Yoshioka, S., Fukaya, R., Sakai, N. and Ayabe, T. (2011) Regulation of microbiota by antimicrobial peptides in the gut. *Adv Otorhinolaryngol*, 72, 97-99.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. and Miyajima, K. (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35, 11361-11368.
- Medalla, F., Sjolund-Karlsson, M., Shin, S., Harvey, E., Joyce, K., Theobald, L., Nygren, B.N., Pecic, G., Gay, K., Austin, J., Stuart, A., Blanton, E., Mintz, E.D., Whichard, J.M. and Barzilay, E.J. (2011) Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhi, United States, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*, 17, 1095-1098.
- Melo, M.N., Ferre, R. and Castanho, M.A. (2009) Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol*, 7, 245-250.
- Meng, L., Ye, X.J., Ding, W.H., Yang, Y., Di, B.B., Liu, L. and Huo, Y. (2011) Plasma catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 12, 643-647.
- Meri, S., Morgan, B.P., Davies, A., Daniels, R.H., Olavesen, M.G., Waldmann, H. and Lachmann, P.J. (1990) Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*, 71, 1-9.
- Merrifield, R.B. (1965) Automated synthesis of peptides. *Science*, 150, 178-185.
- Metz-Boutigue, M.H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R. and Aunis, D. (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem*, 217, 247-257.
- Metz-Boutigue, M.H., Goumon, Y., Lugardon, K., Strub, J.M. and Aunis, D. (1998) Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol*, 18, 249-266.
- Metz-Boutigue, M.H., Shooshtarizadeh, P., Prevost, G., Haikel, Y. and Chich, J.F. (2010) Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. *Curr Pharm Des*, 16, 1024-1039.
- Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G.B. and Chen, W. (2007) Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J Gastroenterol*, 13, 1477-1486.
- Mogi, T. and Kita, K. (2009) Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, 66, 3821-3826.
- Molinari, G. (2009) Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Adv Exp Med Biol*, 655, 13-27.
- Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S.K. and Anouar, Y. (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)*, 192, 309-324.
- Mookherjee, N., Wilson, H.L., Doria, S., Popowych, Y., Falsafi, R., Yu, J.J., Li, Y., Veatch, S., Roche, F.M., Brown, K.L., Brinkman, F.S., Hokamp, K., Potter, A., Babiuk, L.A., Griebel, P.J. and Hancock, R.E. (2006) Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, 80, 1563-1574.
- Mor, A., Hani, K. and Nicolas, P. (1994) The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem*, 269, 31635-31641.
- Morel, J.-M. (2008) *Traité pratique de phytothérapie: Remèdes d'hier pour médecine de demain*.
- Mowat, A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3, 331-341.
- Mowery, B.P., Lee, S.E., Kissounko, D.A., Epan, R.F., Epan, R.M., Weisblum, B., Stahl, S.S. and Gellman, S.H. (2007) Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers. *J Am Chem Soc*, 129, 15474-15476.
- Mowery, B.P., Lindner, A.H., Weisblum, B., Stahl, S.S. and Gellman, S.H. (2009) Structure-activity relationships among random nylon-3 copolymers that mimic antibacterial host-defense peptides. *J Am Chem Soc*, 131, 9735-9745.
- Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., Minegishi, Y., Yonekawa, H. and Karasuyama, H. (2005) Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, 23, 191-202.

- Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y. and Karasuyama, H. (2009) New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy. *Allergol Int*, 58, 11-19.
- Muraina, I.A., Auda, A.O., Mamman, M., Kazeem, H.M., Picard, J., McGaw, L.J. and Eloff, J.N. (2010) Antimycoplasmal activity of some plant species from northern Nigeria compared to the currently used therapeutic agent. *Pharm Biol*, 48, 1103-1107.
- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. and Hirai, K. (2003) Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*, 171, 3977-3982.
- Nakano, I., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Ishida, K., Makk, G., Angwin, P., Chang, D. and Tatemoto, K. (1989) Isolation and characterization of bovine pancreastatin. *Regul Pept*, 25, 207-213.
- Nakata, A., Irie, M. and Takahashi, M. (2011) Psychological distress, depressive symptoms, and cellular immunity among healthy individuals: a 1-year prospective study. *Int J Psychophysiol*, 81, 191-197.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6, 173-182.
- Nelson, M.L. and Levy, S.B. (2011) The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci*, 1241, 17-32.
- Neuhaus, F.C. and Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 686-723.
- Ngono Ngane, A., Ebelle Etame, R., Ndifor, F., Biyiti, L., Amvam Zollo, P.H. and Bouchet, P. (2006) Antifungal Activity of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson (Asteraceae) of Cameroon. *Chemotherapy*, 52, 103-106.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. and Vogel, H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*, 29, 464-472.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K. and van Leeuwen, P.A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418-425.
- Ning, L., Chen, H. and Kunnimalaiyaan, M. (2010) Focal adhesion kinase, a downstream mediator of Raf-1 signaling, suppresses cellular adhesion, migration, and neuroendocrine markers in BON carcinoid cells. *Mol Cancer Res*, 8, 775-782.
- Nizet, V. (2006) Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol*, 8, 11-26.
- Nordahl, E.A., Rydengard, V., Nyberg, P., Nitsche, D.P., Morgelin, M., Malmsten, M., Bjorck, L. and Schmidtchen, A. (2004) Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16879-16884.
- Nwinyi, F., Binda, L., Ajoku, G., Aniagu, S., Enwerem, N., Orisandipe, A., Kubmarawa, D. and Gamaniel, K. (2004) Evaluation of the aqueous extract of *Boswellia dalzielii* stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects. *African Journal of Biotechnology*, 3.
- O'Connor, D.T., Kailasam, M.T., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Yanaihara, N. and Parmer, R.J. (2002) Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*, 20, 1335-1345.
- O'Grady, F.W. (1971) Mode of action of antibacterial agents. *Proc R Soc Med*, 64, 529-533.
- Obata, F. (2010) Influence of Escherichia coli shiga toxin on the mammalian central nervous system. *Adv Appl Microbiol*, 71, 1-19.
- Ogata, T. and Ogata, A. (1917) Henle's Reaction Of The Chromaffin Cells In The Adrenals, And The Microscopic Test For Adrenalin. *J Exp Med*, 25, 807-817.
- Olsen, C.A., Bonke, G., Vedel, L., Adsersen, A., Witt, M., Franzyk, H. and Jaroszewski, J.W. (2007) Alpha-peptide/beta-peptoid chimeras. *Org Lett*, 9, 1549-1552.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L. and Leung, D.Y. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 347, 1151-1160.
- Oren, Z. and Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47, 451-463.
- Orr, D.F., Chen, T., Johnsen, A.H., Chalk, R., Buchanan, K.D., Sloan, J.M., Rao, P. and Shaw, C. (2002) The spectrum of endogenous human chromogranin A-derived peptides identified using a modified proteomic strategy. *Proteomics*, 2, 1586-1600.

- Osbourn, A., Goss, R.J. and Field, R.A. (2011) The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep*, 28, 1261-1268.
- Ottiger, H.P., Battenberg, E.F., Tsou, A.P., Bloom, F.E. and Sutcliffe, J.G. (1990) 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci*, 10, 3135-3147.
- Owolabi, O.J., Nworgu, Z.A. and Odushu, K. (2010) Antidiarrheal evaluation of the ethanol extract of *Nauclea latifolia* root bark. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 32, 551-555.
- Owoyele, V.B., Adediji, J.O. and Soladoye, A.O. (2005) Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*. *Inflammopharmacology*, 13, 479-484.
- Padovan, L., Scocchi, M. and Tossi, A. (2010) Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci*, 11, 210-219.
- Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Basti, A.A. and Hadian, M. (2011) Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes. *Foodborne Pathog Dis*, 8, 283-290.
- Pan, E., Gorka, A.P., Alumasa, J.N., Slebodnick, C., Harinantenaina, L., Brodie, P.J., Roepe, P.D., Randrianaivo, R., Birkinshaw, C. and Kingston, D.G. (2011) Antiplasmodial and antiproliferative pseudoguaianolides of *Athrobisma proteiforme* from the Madagascar Dry Forest. *J Nat Prod*, 74, 2174-2180.
- Pan, J.Y., Chen, S.L., Yang, M.H., Wu, J., Sinkkonen, J. and Zou, K. (2009) An update on lignans: natural products and synthesis. *Nat Prod Rep*, 26, 1251-1292.
- Pando, S.C., Oliva, M.L., Sampaio, C.A., Di Ciero, L., Novello, J.C. and Marangoni, S. (2001) Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 57, 625-631.
- Panyaphu, K., On, T.V., Sirisa-ard, P., Srisa-nga, P., ChansaKaow, S. and Nathakarnkitkul, S. (2011) Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *J Ethnopharmacol*, 135, 226-237.
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., Chalupka, A., Ringstad, L. and Malmsten, M. (2009) End-tagging of ultra-short antimicrobial peptides by W/F stretches to facilitate bacterial killing. *PLoS One*, 4, e5285.
- Peeters, T. and Vantrappen, G. (1975) The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut*, 16, 553-558.
- Pelaez, F. (2006) The historical delivery of antibiotics from microbial natural products--can history repeat? *Biochem Pharmacol*, 71, 981-990.
- Peschel, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol*, 10, 179-186.
- Peschel, A. and Collins, L.V. (2001) Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides*, 22, 1651-1659.
- Peschel, A. and Sahl, H.G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4, 529-536.
- Peters, B.M., Shirliff, M.E. and Jabra-Rizk, M.A. (2010) Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog*, 6, e1001067.
- Pieroni, M., Corti, A., Tota, B., Curnis, F., Angelone, T., Colombo, B., Cerra, M.C., Bellocchi, F., Crea, F. and Maseri, A. (2007) Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur Heart J*, 28, 1117-1127.
- Pitt, S.C., Chen, H. and Kunnimalaiyaan, M. (2009) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling suppresses tumor cell proliferation and neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors. *Ann Surg Oncol*, 16, 2936-2942.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T. and Jerala, R. (2003) Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 530-536.
- Plessier, A., Cosnes, J., Gendre, J.P. and Beaugerie, L. (2002) [Intercurrent *Klebsiella oxytoca* colitis in a patient with Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol*, 26, 799-800.
- Pochet, L., Frederick, R. and Masereel, B. (2004) Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors. *Curr Pharm Des*, 10, 3781-3796.
- Poillot, C. and De Waard, M. (2011) [Potential of cell penetrating peptides for cell drug delivery]. *Med Sci (Paris)*, 27, 527-534.

- Porter, E.M., Bevins, C.L., Ghosh, D. and Ganz, T. (2002) The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*, 59, 156-170.
- Prommegger, R., Bale, R., Ensinger, C., Sauper, T., Profanter, C., Knoflach, M. and Moncayo, R. (2003) Gastric carcinoid type I tumour: new diagnostic and therapeutic method. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15, 705-707.
- Putsep, K., Carlsson, G., Boman, H.G. and Andersson, M. (2002) Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*, 360, 1144-1149.
- Radek, K.A., Lopez-Garcia, B., Hupe, M., Niesman, I.R., Elias, P.M., Taupenot, L., Mahata, S.K., O'Connor, D.T. and Gallo, R.L. (2008) The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*, 128, 1525-1534.
- Radzishewsky, I., Krugliak, M., Ginsburg, H. and Mor, A. (2007) Antiplasmodial activity of lauryl-lysine oligomers. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1753-1759.
- Radzishewsky, I.S., Rotem, S., Bourdetsky, D., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y. and Mor, A. (2007) Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers. *Nat Biotechnol*, 25, 657-659.
- Rajanbabu, V. and Chen, J.Y. (2011) Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32, 415-420.
- Rambaud, J.-C., Biuts, J.-P., Corthier, G. and Flourié, B. (2004) *Flore microbienne intestinale*.
- Rangon, C.M., Haik, S., Fauchoux, B.A., Metz-Boutigue, M.H., Fierville, F., Fuchs, J.P., Hauw, J.J. and Aunis, D. (2003) Different chromogranin immunoreactivity between prion and α -beta amyloid plaque. *Neuroreport*, 14, 755-758.
- Rao, F., Wen, G., Gayen, J.R., Das, M., Vaingankar, S.M., Rana, B.K., Mahata, M., Kennedy, B.P., Salem, R.M., Stridsberg, M., Abel, K., Smith, D.W., Eskin, E., Schork, N.J., Hamilton, B.A., Ziegler, M.G., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T. (2007) Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation*, 115, 2271-2281.
- Reeves, P. (1995) Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends Microbiol*, 3, 381-386.
- Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O. and Regeat, E. (1996) Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd.Nut.*, 32, 17-27.
- Repetto, M.G. and Llesuy, S.F. (2002) Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 35, 523-534.
- Revillard, J.-P. and Revillard, J.-P.R. (2001) *Immunologie*. De Boeck Université.
- Ridley, F. (1928) Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears, and its Relation to Infection of the Human Eye. *Proc R Soc Med*, 21, 1495-1506.
- Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O. and Solcia, E. (1986) Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry*, 85, 19-28.
- Rishi, P., Preet, S., Bharrhan, S. and Verma, I. (2011) In vitro and in vivo synergistic effects of cryptdin 2 and ampicillin against Salmonella. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 4176-4182.
- Robinson, J.A. (2008) Beta-hairpin peptidomimetics: design, structures and biological activities. *Acc Chem Res*, 41, 1278-1288.
- Robinson, J.A. (2009) Design of protein-protein interaction inhibitors based on protein epitope mimetics. *ChemBiochem*, 10, 971-973.
- Robinson, J.A., Demarco, S., Gombert, F., Moehle, K. and Obrecht, D. (2008) The design, structures and therapeutic potential of protein epitope mimetics. *Drug Discov Today*, 13, 944-951.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. and Male, D.K. (1985) *Immunologie fondamentale et appliquée*. MEDSI.
- Rosa, P. and Zanini, A. (1981) Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. II. Sulfated and glycosylated polypeptides. *Mol Cell Endocrinol*, 24, 181-193.
- Rosjo, H., Husberg, C., Dahl, M.B., Stridsberg, M., Sjaastad, I., Finsen, A.V., Carlson, C.R., Oie, E., Omland, T. and Christensen, G. (2010) Chromogranin B in heart failure: a putative cardiac biomarker expressed in the failing myocardium. *Circ Heart Fail*, 3, 503-511.

- Rundle, S., Somogyi, P., Fischer-Colbrie, R., Hagn, C., Winkler, H. and Chubb, I.W. (1986) Chromogranin A, B and C: immunohistochemical localization in ovine pituitary and the relationship with hormone-containing cells. *Regul Pept*, 16, 217-233.
- Saeed, R.W., Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., Tracey, K.J., Al-Abed, Y. and Metz, C.N. (2005) Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med*, 201, 1113-1123.
- Sahoo, S., Mishra, S.K., Panda, P.K., Tripathy, S., Mishra, S.R., Ellaiah, P. and Dash, S.K. (2008) Antimycotic potential of *Crataeva religiosa* Hook and Forst against some selected fungal pathogens. *Acta Pol Pharm*, 65, 245-247.
- Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S. and Lee, Y.S. (2005) An update on bioactive plant lignans. *Nat Prod Rep*, 22, 696-716.
- Salzman, R.A., Koiwa, H., Ibeas, J.I., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2004) Inorganic cations mediate plant PR5 protein antifungal activity through fungal Mnn1- and Mnn4-regulated cell surface glycans. *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 780-788.
- Sanders, V.M. and Straub, R.H. (2002) Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun*, 16, 290-332.
- Sanderson, J.M. (2005) Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Org Biomol Chem*, 3, 201-212.
- Sarig, H., Rotem, S., Ziserman, L., Danino, D. and Mor, A. (2008) Impact of self-assembly properties on antibacterial activity of short acyl-lysine oligomers. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 4308-4314.
- Sarma, B.K., Yousufuddin, M. and Kodadek, T. (2011) Acyl hydrazides as peptoid sub-monomers. *Chem Commun (Camb)*, 47, 10590-10592.
- Sarma, J.V. and Ward, P.A. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res*, 343, 227-235.
- Sathish, R., Vyawahare, B. and Natarajan, K. (2011) Antiulcerogenic activity of *Lantana camara* leaves on gastric and duodenal ulcers in experimental rats. *J Ethnopharmacol*, 134, 195-197.
- Savina, A. and Amigorena, S. (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*, 219, 143-156.
- Scarpa, M., Grillo, A., Scarpa, M., Brun, P., Castoro, C., Pozza, A., Cavallo, D., Faggian, D., Ruffolo, C., D'Inca, R., Bardini, R., Castagliuolo, I. and Angriman, I. (2011) Innate Immune Environment in Ileal Pouch Mucosa: alpha5 Defensin Up-regulation as Predictor of Chronic/Relapsing Pouchitis. *J Gastrointest Surg*.
- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Macagno, E., Salzet, M. and Tasiemski, A. (2008) Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J Immunol*, 181, 1083-1095.
- Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A. and (Editeurs). (2008) *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11 (1). Plantes médicinales 1*. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas.
- Schmidtchen, A., Frick, I.M. and Bjorck, L. (2001) Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol*, 39, 708-713.
- Schmidtchen, A., Pasupuleti, M., Morgelin, M., Davoudi, M., Alenfall, J., Chalupka, A. and Malmsten, M. (2009) Boosting antimicrobial peptides by hydrophobic oligopeptide end tags. *J Biol Chem*, 284, 17584-17594.
- Schroder, J.M. (2011) Antimicrobial peptides in healthy skin and atopic dermatitis. *Allergol Int*, 60, 17-24.
- Schulte, B.M., Kramer, M., Ansems, M., Lanke, K.H., van Doremalen, N., Piganelli, J.D., Bottino, R., Trucco, M., Galama, J.M., Adema, G.J. and van Kuppeveld, F.J. (2010) Phagocytosis of enterovirus-infected pancreatic beta-cells triggers innate immune responses in human dendritic cells. *Diabetes*, 59, 1182-1191.
- Schweizer, F. (2009) Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol*, 625, 190-194.
- Sciola, V., Massironi, S., Conte, D., Caprioli, F., Ferrero, S., Ciafardini, C., Peracchi, M., Bardella, M.T. and Piodi, L. (2009) Plasma chromogranin a in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 867-871.

- Scocchi, M., Tossi, A. and Gennaro, R. (2011) Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2317-2330.
- Shafer, W.M., Qu, X., Waring, A.J. and Lehrer, R.I. (1998) Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1829-1833.
- Shai, Y. (1999) 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*, 1462, 55-70.
- Sharma, O., Dawra, R., Kurade, N. and Sharma, P. (1998) A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. *Nat Toxins*, 6, 1-14.
- Shaw, S.Y., Blanchard, J.F. and Bernstein, C.N. (2012) Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 106, 2133-2142.
- Shimizu, K., Namimatsu, S., Kitagawa, W., Akasu, H., Takatsu, K., Sugisaki, Y. and Tanaka, S. (2002) Immunohistochemical, biochemical and immunoelectron microscopic analysis of antigenic proteins on neuroendocrine cell tumors using monoclonal antibody HISL-19. *J Nihon Med Sch*, 69, 365-372.
- Shirin, T., Rahman, A., Danielsson, A., Uddin, T., Bhuyian, T.R., Sheikh, A., Qadri, S.S., Qadri, F. and Hammarstrom, M.L. (2011) Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*.
- Shooshtarizadeh, P., Zhang, D., Chich, J.F., Gasnier, C., Schneider, F., Haikel, Y., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (2010) The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. *Regul Pept*, 165, 102-110.
- Shuey, S.W., Delaney, W.J., Shah, M.C. and Scialdone, M.A. (2006) Antimicrobial beta-peptoids by a block synthesis approach. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 1245-1248.
- Siddique, Z.L., Drozdov, I., Floch, J., Gustafsson, B.I., Stunes, K., Pfragner, R., Kidd, M. and Modlin, I.M. (2009) KRJ-I and BON cell lines: defining an appropriate enterochromaffin cell neuroendocrine tumor model. *Neuroendocrinology*, 89, 458-470.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J. and Potempa, J. (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4673-4679.
- Sigafoos, J., Merrill, B.M., Taylor, L., Diliberto, E.J., Jr. and Viveros, O.H. (1991) A novel tetradecapeptide isolated from bovine adrenal medulla chromaffin vesicles with strong homology to an internal sequence coded by the rat 1B1075 (Preprosecretogranin III) gene. *Mol Cell Neurosci*, 2, 511-516.
- Silva, E.J., Queiroz, D.B., Rodrigues, A., Honda, L. and Avellar, M.C. (2011) Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology. *J Androl*, 32, 614-624.
- Silva, M.T. (2011) Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol*, 89, 675-683.
- Silva, S.R., Bowen, K.A., Rychahou, P.G., Jackson, L.N., Weiss, H.L., Lee, E.Y., Townsend, C.M., Jr. and Evers, B.M. (2011) VEGFR-2 expression in carcinoid cancer cells and its role in tumor growth and metastasis. *Int J Cancer*, 128, 1045-1056.
- Sim, R.B., Day, A.J., Moffatt, B.E. and Fontaine, M. (1993) Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol*, 223, 13-35.
- Simon, G.L. and Gorbach, S.L. (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, 86, 174-193.
- Simon, J.P. and Aunis, D. (1989) Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem J*, 262, 1-13.

- Simon, R.J., Kania, R.S., Zuckermann, R.N., Huebner, V.D., Jewell, D.A., Banville, S., Ng, S., Wang, L., Rosenberg, S., Marlowe, C.K. and et al. (1992) Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9367-9371.
- Sinha, S., Cheshenko, N., Lehrer, R.I. and Herold, B.C. (2003) NP-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 494-500.
- Skurnik, D. (2009) Les intégrons: structure et épidémiologie. *Antibiotiques*, 11, 116-129.
- Song, X., Zhang, Y. and Wang, Y. (2011) [Antimicrobial peptides peptaibols from trichoderma--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 51, 438-444.
- Sorensen, O.E., Cowland, J.B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T. and Borregaard, N. (2003) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol*, 170, 5583-5589.
- Spiller, R. (2008) Serotonin and GI clinical disorders. *Neuropharmacology*, 55, 1072-1080.
- Splith, K. and Neundorff, I. (2011) Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur Biophys J*, 40, 387-397.
- Sreeja, S. and Sreeja, S. (2009) An in vitro study on antiproliferative and antiestrogenic effects of *Boerhaavia diffusa* L. extracts. *J Ethnopharmacol*, 126, 221-225.
- Srikanta, S., Krisch, K. and Eisenbarth, G.S. (1986) Islet cell proteins defined by monoclonal islet cell antibody HISL-19. *Diabetes*, 35, 300-305.
- Srinivasa Rao, K., Chaudhury, P.K. and Pradhan, A. (2009) Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. *Food Chem Toxicol*, 48, 729-732.
- Steinstraesser, L., Koehler, T., Jacobsen, F., Daigeler, A., Goertz, O., Langer, S., Kesting, M., Steinau, H., Eriksson, E. and Hirsch, T. (2008) Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*, 14, 528-537.
- Steinstraesser, L., Kraneburg, U., Jacobsen, F. and Al-Benna, S. (2011) Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 216, 322-333.
- Strub, J.M., Hubert, P., Nullans, G., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (1996) Antibacterial activity of secretolysin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. *FEBS Lett*, 379, 273-278.
- Strub, J.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M.H. (1997) Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J Biol Chem*, 272, 11928-11936.
- Su, L.H., Teng, W.S., Chen, C.L., Lee, H.Y., Li, H.C., Wu, T.L. and Chiu, C.H. (2011) Increasing ceftriaxone resistance in salmonellae, taiwan. *Emerg Infect Dis*, 17, 1086-1090.
- Suankratay, C., Mold, C., Zhang, Y., Lint, T.F. and Gewurz, H. (1999) Mechanism of complement-dependent haemolysis via the lectin pathway: role of the complement regulatory proteins. *Clin Exp Immunol*, 117, 442-448.
- Suksamrarn, A., Chotipong, A., Suavansri, T., Boongird, S., Timsuksai, P., Vimuttipong, S. and Chuaynugul, A. (2004) Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch Pharm Res*, 27, 507-511.
- Sutcliffe, J.A. (2005) Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr Opin Microbiol*, 8, 534-542.
- Sychev, I.A., Poryadin, G.V. and Smirnov, V.M. (2006) Effect of polysaccharides on the blood system in rats. *Bull Exp Biol Med*, 141, 592-595.
- Taiwe, G.S., Bum, E.N., Talla, E., Dimo, T., Weiss, N., Sidiki, N., Dawe, A., Moto, F.C., Dzeufiet, P.D. and De Waard, M. (2011) Antipyretic and antinociceptive effects of *Nanuclea latifolia* root decoction and possible mechanisms of action. *Pharm Biol*, 49, 15-25.
- Takeda, K. and Akira, S. (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16, 3-9.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- Taleb-Contini, S.H., Kanashiro, A., Kabeya, L.M., Polizello, A.C., Lucisano-Valim, Y.M. and Oliveira, D.C. (2006) Immunomodulatory effects of methoxylated flavonoids from two *Chromolaena* species: structure-activity relationships. *Phytother Res*, 20, 573-575.
- Tan, K.K., Sin, K.S., Ng, A.J., Yahya, H. and Kaur, P. (1994) Non-O1 *Vibrio cholerae* septicaemia: a case report. *Singapore Med J*, 35, 648-649.

- Tan, P.V. and Nyasse, B. (2000) Anti-ulcer compound from *Voacanga africana* with possible histamine H2 receptor blocking activity. *Phytomedicine*, 7, 509-515.
- Tan, T.Y., Ng, L.S., Tan, E. and Huang, G. (2007) In vitro effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 60, 421-423.
- Tani, K., Murphy, W.J., Chertov, O., Salcedo, R., Koh, C.Y., Utsunomiya, I., Funakoshi, S., Asai, O., Herrmann, S.H., Wang, J.M., Kwak, L.W. and Oppenheim, J.J. (2000) Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. *Int Immunol*, 12, 691-700.
- Taupenot, L., Harper, K.L. and O'Connor, D.T. (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, 348, 1134-1149.
- Thang, T.P., Margaret, A.H., George, W.C., Trung T. Le and Pham, H.M. (1996) The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 2, 335-343.
- Theurl, M., Schgoer, W., Albrecht, K., Jeschke, J., Egger, M., Beer, A.G., Vasiljevic, D., Rong, S., Wolf, A.M., Bahlmann, F.H., Patsch, J.R., Wolf, D., Schratzberger, P., Mahata, S.K. and Kirchmair, R. (2010) The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *Circ Res*, 107, 1326-1335.
- Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55, 4-30.
- Tota, B., Cerra, M.C. and Gattuso, A. (2010) Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a 'whip-brake' system of the endocrine heart. *J Exp Biol*, 213, 3081-3103.
- Tran, V.S., Marion-Audibert, A.M., Karatekin, E., Huet, S., Cribier, S., Guillaumie, K., Chapuis, C., Desnos, C., Darchen, F. and Henry, J.P. (2004) Serotonin secretion by human carcinoid BON cells. *Ann NY Acad Sci*, 1014, 179-188.
- Tsakris, A., Poulou, A., Markou, F., Pitiriga, V., Piperaki, E.T., Kristo, I. and Pournaras, S. (2011) Dissemination of Clinical Isolates of *Klebsiella oxytoca* Harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-Type Variant in the Community. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3164-3168.
- Tsigelny, I., Mahata, S.K., Taupenot, L., Preece, N.E., Mahata, M., Khan, I., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T. (1998) Mechanism of action of chromogranin A on catecholamine release: molecular modeling of the catestatin region reveals a beta-strand/loop/beta-strand structure secured by hydrophobic interactions and predictive of activity. *Regul Pept*, 77, 43-53.
- Tsuchiya, H. and Inuma, M. (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7, 161-165.
- Tuffs, A. (2002) Three out of four Germans have used complementary or natural remedies. *Bmj*, 325, 990.
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A. and Menichini, F. (2008) Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Rev Med Chem*, 8, 399-420.
- Twardzik, D.R., Brown, J.P., Ranchalis, J.E., Todaro, G.J. and Moss, B. (1985) Vaccinia virus-infected cells release a novel polypeptide functionally related to transforming and epidermal growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 5300-5304.
- Uchida, M., McDermott, G., Wetzler, M., Le Gros, M.A., Myllys, M., Knoechel, C., Barron, A.E. and Larabell, C.A. (2009) Soft X-ray tomography of phenotypic switching and the cellular response to antifungal peptoids in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19375-19380.
- Ullman, T.A. and Itzkowitz, S.H. (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, 140, 1807-1816.
- Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D. and Fidler, I.J. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res*, 51, 3062-3066.
- Van Gossum, A. (2007) Probiotics and Inflammatory Bowel Diseases (IBD). *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21, 81-84.
- Wafo, P., Kamdem, R.S., Ali, Z., Anjum, S., Begum, A., Oluyemisi, O.O., Khan, S.N., Ngadjui, B.T., Etoa, X.F. and Choudhary, M.I. (2011) Kaurane-type diterpenoids from *Chromolaena*

- odorata*, their X-ray diffraction studies and potent alpha-glucosidase inhibition of 16-kauren-19-oic acid. *Fitoterapia*, 82, 642-646.
- Walter, M.H. and Strack, D. (2011) Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep*, 28, 663-692.
- Wang, K.J., Huang, W.S., Yang, M., Chen, H.Y., Bo, J., Li, S.J. and Wang, G.Z. (2007) A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*. *Mol Immunol*, 44, 1961-1968.
- Wang, P., Hu, L., Liu, G., Jiang, N., Chen, X., Xu, J., Zheng, W., Li, L., Tan, M., Chen, Z., Song, H., Cai, Y.D. and Chou, K.C. (2011) Prediction of antimicrobial peptides based on sequence alignment and feature selection methods. *PLoS One*, 6, e18476.
- Wang, Y., Chen, S. and Yu, O. (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 949-956.
- Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J.M., Lane, W.S. and Hook, V. (2007) Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters. *J Proteome Res*, 6, 1652-1665.
- Wehkamp, J., Schmid, M., Fellermann, K. and Stange, E.F. (2005) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol*, 77, 460-465.
- Weniger, B., Lagnika, L., Vonthron-Senecheau, C., Adjobimey, T., Gbenou, J., Moudachirou, M., Brun, R., Anton, R. and Sanni, A. (2004) Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their in vitro antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol*, 90, 279-284.
- WHO. (2000) Overcoming Antimicrobial Resistance: World Health Report on Infectious Diseases. *World Health Organization*. WHO.
- WHO. (2004) WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. World Health Organization, Geneva.
- Wiesner, J. and Vilcinskas, A. (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1, 440-464.
- Willis, M., Leitner, I., Jellinger, K.A. and Marksteiner, J. (2011) Chromogranin peptides in brain diseases. *J Neural Transm*, 118, 727-735.
- Wimley, W.C. and Hristova, K. (2011) Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J Membr Biol*, 239, 27-34.
- Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. (1992) The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, 49, 497-528.
- Wostmann, B.S. and Pleasants, J.R. (1991) The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198, 539-546.
- Wu, S.V., Yuan, P.Q., Lai, J., Wong, K., Chen, M.C., Ohning, G.V. and Tache, Y. (2011) Activation of Type 1 CRH receptor isoforms induces serotonin release from human carcinoid BON-1N cells: an enterochromaffin cell model. *Endocrinology*, 152, 126-137.
- Xiong, N., Brewer, M.T., Anderson, K.L., Watrous, G.K., Weeks, K.E., Barnhill, A.E., Day, T.A., Kimber, M.J. and Carlson, S.A. (2011) Beta-lactam antibiotics prevent *Salmonella*-mediated bovine encephalopathy regardless of the beta-lactam resistance status of the bacteria. *Vet J*.
- Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R.I. and Hong, M. (2002) Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry*, 41, 9852-9862.
- Yamshchikov, A.V., Kurbatova, E.V., Kumari, M., Blumberg, H.M., Ziegler, T.R., Ray, S.M. and Tangpricha, V. (2010) Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am J Clin Nutr*, 92, 603-611.
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 55, 27-55.
- Yeung, A.T., Gellatly, S.L. and Hancock, R.E. (2011) Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2161-2176.
- Yigit, H., Queenan, A.M., Rasheed, J.K., Biddle, J.W., Domenech-Sanchez, A., Alberti, S., Bush, K. and Tenover, F.C. (2003) Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3881-3889.
- Yoon, J.H., Gray, T., Guzman, K., Koo, J.S. and Nettekheim, P. (1997) Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16, 724-731.

- Younes, A., Hamouda, A. and Amyes, S.G. (2011) First Report of a Novel Extended-Spectrum Beta-Lactamase KOXY-2 Producing *Klebsiella oxytoca* that Hydrolyses Cefotaxime and Ceftazidime. *J Chemother*, 23, 127-130.
- Yount, N.Y., Bayer, A.S., Xiong, Y.Q. and Yeaman, M.R. (2006) Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*, 84, 435-458.
- Yu, H.Y., Huang, K.C., Yip, B.S., Tu, C.H., Chen, H.L., Cheng, H.T. and Cheng, J.W. (2010) Rational design of tryptophan-rich antimicrobial peptides with enhanced antimicrobial activities and specificities. *ChemBiochem*, 11, 2273-2282.
- Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M., Pistolic, J., Li, Y., Rehaume, L. and Hancock, R.E. (2007) Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol*, 179, 7684-7691.
- Yuan, J.Q., Yang, J.S. and Miao, J.H. (2007) [Studies on flavonoids of *Eupatorium odoratum* L]. *Zhong Yao Cai*, 30, 657-660.
- Zaiou, M. (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)*, 85, 317-329.
- Zanetti, M., Gennaro, R. and Romeo, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, 374, 1-5.
- Zarebczan, B., Pinchot, S.N., Kunnimalaiyaan, M. and Chen, H. (2011) Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. *Am J Surg*, 201, 329-332; discussion 333.
- Zasloff, M. (1992) Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 4, 3-7.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.
- Zhang, D., Lavaux, T., Voegeli, A.C., Lavigne, T., Castelain, V., Meyer, N., Sapin, R., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H. and Schneider, F. (2008) Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem*, 54, 1497-1503.
- Zhang, D., Shooshtarizadeh, P., Laventie, B.J., Colin, D.A., Chich, J.F., Vidic, J., de Barry, J., Chasserot-Golaz, S., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Schneider, F., Helle, K., Aunis, D., Prevost, G. and Metz-Boutigue, M.H. (2009) Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One*, 4, e4501.
- Zhang, X., Oglecka, K., Sandgren, S., Belting, M., Esbjorner, E.K., Norden, B. and Graslund, A. (2010) Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 2201-2208.
- Zins, M. and Balaton, A. (2010) Les tumeurs carcinoïdes du grêle: formes révélatrices. *Journal de Radiologie*, 90, 1314.
- Zuckermann, R.N. (2011) Peptoid origins. *Biopolymers*, 96, 545-555.

Annexes



Manuscrit 1

Chromogranin A-Derived Peptides Are Involved in Innate Immunity

(publié dans **Current Medicinal Chemistry**)

Aslam, Rizwan¹, **Atindehou, Ménonvé¹**, Lavaux, Thomas^{1,2}, Haïkel Youssef^{1,3},
Schneider, Francis^{1,2}, Metz-Boutigue, Marie-Hélène^{1#}

La chromogranine A est une protéine libérée par les cellules nerveuses, endocrines, neuroendocrines et immunitaires. Ses peptides dérivés, produits après maturation protéolytique, interviennent dans de nombreux processus biologiques et jouent un rôle important dans l'immunité innée. En effet, nous avons établi les activités antibactériennes et antifongiques de plusieurs peptides dérivés de la chromogranine A (CGA). Ces activités décrites dans cette revue pointent plus précisément la chromofungine (CGA₄₇₋₆₆) et la catestatine (bCGA₃₄₄₋₃₆₄). Ces deux peptides se comportent comme des "*cell penetrating peptides*" et déstabilisent les membranes bactériennes, permettant ainsi au peptide de pénétrer dans les bactéries. Sur la base de ces résultats, cet article décrit également l'étude des interactions peptide-bactérie et bactérie-peptide pour *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica*. Il en ressort que les bactéries produisent des protéases qui dégradent les peptides pour les rendre inefficaces. Parmi, les peptides étudiés, la cateslytine, la partie active de la catestatine résiste mieux à la dégradation. De plus, la protéase Glu-C de *Staphylococcus aureus*, en dégradant les peptides antimicrobiens provoquent l'apparition de peptides ayant un effet antifongique. Cet article montre aussi que l'utilisation des peptides en association avec les antibiotiques conventionnels est utile pour diminuer les doses d'antibiotiques et accroître leur efficacité.



Chromogranin A-Derived Peptides Are Involved in Innate Immunity

Aslam, Rizwan¹, **Atindehou, Mènonvé¹**, Lavaux, Thomas^{1,2}, Haïkel Youssef^{1,3},
Schneider, Francis^{1,2}, Metz-Boutigue, Marie-Hélène^{1#}

¹University of Strasbourg, Biomatériaux et ingénierie Tissulaire, Inserm U977, Strasbourg, France.

²University of Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Service de Réanimation médicale, Strasbourg, France.

³University of Strasbourg, Faculty of Odontology, Strasbourg, France.

Aslam, Rizwan

Email: rizwangorsi@yahoo.com

Phone: +33 368 85 54 76

Fax: +33 368 85 54 72

Atindehou, Mènonvé

Email: Menonve.Atindehou@inserm.u-strasbg.fr

Phone: +33 368 85 54 75

Fax: +33 368 85 54 72

Lavaux, Thomas

Email: thomas.lavaux@chru-strasbourg.fr

Phone: +33 368 85 54 78

Fax: +33 368 85 54 72

Haïkel, Youssef

Email: haikel.youssef@unistra.fr

Phone: +33 368 85 38 68

Fax: +33 368 85 39 00

Schneider, Francis

Email: francis.schneider@chru-strasbourg.fr

Phone: +33 388 12 79 22

Fax: +33 388 12 79 08

≠ Corresponding author:

Metz-Boutigue, Marie-Hélène

E-mail: marie-helene.metz@inserm.fr

Phone: +33 368 85 54 71

Fax: +33 368 85 54 72

University of Strasbourg, Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire, Inserm U977, Faculté de chirurgie dentaire, Bâtiment Leriche, Hôpital Civil, Porte de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France.

Running title: Chromogranin A-Derived Peptides in Innate Immunity

**Abstract**

New endogenous antimicrobial peptides (AMPs) derived from chromogranin A (CGA) are secreted by nervous, endocrine and immune cells during stress. They display antimicrobial activities by lytic effects at micromolar range using a pore-forming mechanism against Gram-positive bacteria, filamentous fungi and yeasts. AMPs can also penetrate quickly into neutrophils (without lytic effects), where, similarly to “cell penetrating peptides”, they interact with cytoplasmic Calmodulin, and induce calcium influx *via* Store Operated Channels therefore triggering neutrophils activation. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritis* are bacterias responsible for severe infections. We investigated here the effects of *S. aureus* and *S. enteritis* bacterial proteases on CGA-derived peptides and evaluated their antimicrobial activities. We showed that the Glu-C protease produced by *S. aureus* V8 induces the loss of the AMPs antibacterial activities and produces new antifungal peptides. In addition, four antimicrobial CGA-derived peptides (chromofungin, pro-Catestatin, human/bovine catestatin) are degraded when treated with bacterial supernatants from *S. aureus* and *S. enteritis*, whereas, Cateslytin, the short active form of Catestatin, resists to this degradation. Finally, we demonstrate that several antimicrobial CGA-derived peptides are able to act synergistically with antibiotics against bacteria and fungi indicating their roles in innate defense.

Keywords: Innate immunity, antimicrobial peptides, antibiotics, chromogranins, catestatin, chromofungin, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritis*, neutrophils, bacterial proteases, synergy, neuroendocrine system, immune system.



Introduction

The innate immune system, since 2 billion years, is the primary defense mechanism in most living organisms. Antimicrobial peptides (AMPs) are fundamental components of this system in both animals and plants [1-3]. Multidrug antibiotic resistance is a worldwide health problem, therefore the need to produce new efficient antibiotics, acting alone or in combination, is pressing. A major factor in the emergence of antibiotic resistant organisms is the overuse of antibiotics in hospitals and communities. To overcome this abuse, numerous efforts are undertaken to reduce antibiotics prescription and/or to promote their synergistic effects with others molecules. In this context, AMPs represent a promising way considering their direct lytic effect against pathogens in combination with their immunomodulatory properties,

The antimicrobial peptides (AMPs) are highly conserved throughout evolution ensuring organism's defense against a large number of pathogens in various conditions. In addition to their direct antimicrobial activity, they also have a wide range of endogenous functions, notably the modulation of both innate and adaptive immunity. To date more than 1414 antibacterial, 560 antifungal and 107 antiviral peptides have been identified, (antimicrobial peptides database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Among them, cytokines, chemokines, several neuropeptides and fragments derived from proteins exhibit antimicrobial activity. The folding of many AMPs adopts an amphipathic profile important for their antimicrobial activity: their cationic properties induce an electrostatic attraction to the negatively-charged phospholipids of microbial membranes while their hydrophobicity favors their integration into the microbial cell membrane, leading to membrane disruption. Furthermore, the amphipathic structure also allows the peptides to be soluble in both aqueous environments and lipid membranes [4]. In mammals, the most well-studied AMPs are human defensins and cathelicidins [5, 6]. Several proteins



such as lysozyme, caseins, hemoglobin, lactalbumin, secretory phospholipase A2 and lactoferrin also display antimicrobial activity against multiple microorganisms.

Structural and biological properties of the antimicrobial peptides derived from chromogranins/secretogranins

Chromogranins/secretogranins (CGs/SGs) of the granin family are acidic proteins present in secretory vesicles of nervous, endocrine and immune cells [7]. The natural processing of bovine CGs is well described in granules of particular endocrine cells, the sympathoadrenal medullary chromaffin cells (referred as chromaffin cells). In these cells, CGs are cleaved in the chromaffin granules by prohormone convertases (PC1/3 and PC2) and carboxypeptidase E (CPE) and the resulting peptides are co-secreted with the catecholamines [8, 9, 10]. Moreover, secretogranin II (SGII), the third member of the chromogranin family, is also processed to generate several natural fragments [11-13]. In the late 80's, the discovery of pancreastatin, a chromogranin A (CGA)-derived peptide inhibiting insulin secretion from pancreatic beta-cells, initiated the concept of prohormone [14, 15].

In vivo studies reported numerous peptides produced by CGA cleavage, some of which displaying dual biological activities. These peptides modulate homeostatic processes, [16] but are also considered as defense molecules of an infected host. During the past decade, our laboratory has characterized new antimicrobial CGs-derived peptides [16, 17-20] (Figure 1) and has also reported host defense agents derived from CGA during infections [21].

The AMPs derived from CGA act at micromolar range against bacteria, fungi, yeasts and are non-toxic for mammalian cells. They are found in biological fluids involved in

defense mechanisms (serum, saliva) and in supernatants of stimulated human neutrophils [19, 20].

These new AMPs are well integrated in the innate immune system, highlighting the key role of the adrenal medulla which releases large amount of IL-6 and TNF-alpha in response to pro-inflammatory stimuli such as LPS, IL-1 alpha and beta [22]. The discovery of the AMPs together with the presence of TLRs on adrenal cortex cells indicate that the adrenal gland is involved in innate immunity by the activation of the innate immune response and by the clearing of infectious agents [22].

Sequences of CGA-derived AMPs are highly conserved during evolution. Interestingly, the main cleavage site in bovine CGA (bCGA) at position 78-79 and the subsequent removal of the two basic residues K77 and K78 by the carboxypeptidase H [8] produces two antimicrobial fragments: vasostatin-I (VS-I; bCGA1-76) [19] and prochromacin (Prochrom; bCGA79-431) [23]. These large N- and C-terminal antimicrobial domains contain shorter active fragments: bCGA4-40 (NCA) [24, 25], bCGA47-66 (chromofungin; CHR) in VS-I and bCGA173-194 (chromacin; Chrom) and bCGA344-364 (catestatin; CAT) in ProChrom [25]. VS-I and NCA contain the unique disulfide bridge and two post-translational modifications are important for the antibacterial activity of Chrom: the phosphorylation of Y173 and the O-glycosylation of S186 [23].

Vasostatin-I

Vasostatin-I (VS-I) displays antimicrobial activity against (i) Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* and *Bacillus megaterium*) with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.1-1 μ M; (ii) filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria brassicola*, *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*) with a MIC of 0.5-3 μ M and (iii) yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*,

Candida albicans) with a MIC of 2 μ M [19]. However VS-I is unable to inhibit the growth of *Escherichia coli* SBS363. VS-I presents AMPs-specific structural features, such as a global positive charge (+3), an equilibrated ratio of polar and hydrophobic residues (20:23) and the presence of a helical region CGA40-65 corresponding to a calmodulin-binding sequence [26, 27] (Figure 1). Furthermore, we have demonstrated that the N-terminal bCGA1-40 fragment interacts with a model of phospholipid membrane in a concentration range relevant for biological activity in mammalian tissue [28].

Chromofungin

Treatment of VS-I by endoprotease Glu-C from *Staphylococcus aureus* generates the evolutionary conserved and shortest VS-I peptide, chromofungin (CHR), suggesting that this peptide may be released during infections by *S. aureus*. CHR presents antifungal activity at 2-15 μ M against filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria brassicola*, *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*) and yeast cells (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida neoformans*) [26].

Catestatin

Two CGA-derived fragments bCGA333-364 and bCGA343-362 were characterized after the extensive processing of bCGA by prohormone convertases (PC 1/3 or 2) in chromaffin granules [29]. More recently, it has been shown that cathepsin L co-localizes with CGA in chromaffin granules. Digestion of recombinant human CGA (hCGA) *in vitro* generates a catestatin (CAT)-derived fragment hCGA360-373 [30]. In addition to the inhibitory effect of bovine catestatin (bCAT) on catecholamine release from chromaffin cells [31], we have shown that this peptide, highly conserved through

evolution [20] and its shorter active sequence bCGA344-358 (cateslytin, CTL), (Figure 1) present a potent antimicrobial activity with a MIC in the low-micromolar range against Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* at concentration of 0.8 μM), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* D22 at concentration of 8 μM), filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Nectria haematococca* at concentration of 0.2-10 μM) and yeasts (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida neoformans* at concentration of 1.2-8 μM). The two human variants of CAT, P370L and G364S, present antibacterial activity against *M. luteus* with a MIC of 2 and 1 μM , respectively, and against *E. coli* with a MIC of 20 and 10 μM , respectively [20]. The shorter peptide, CTL, from bovine origin, is the most active. Bovine CTL contains a cationic sequence with a global net charge of +5 (R344, R347, R351, R353, R358) and five hydrophobic residues (M346, L348, F360, Y355, F357) (Figure 1), and is able to completely kill bacteria at concentration lower than 10 μM even in the presence of NaCl (0-150 mM) [20].

C-terminal CGA-derived fragment

CCA, the C-terminal CGA-derived fragment bCGA418-427 (Figure 1), with a remarkable net charge of -2, displays antifungal activity and belongs to the less abundant anionic AMPs family. CCA is conserved through evolution and is homologous to both the C-terminal sequence of CGB and the antibacterial peptide SEC (secretolytin) (Figure 1) [17]. *In vitro*, this peptide was generated from chromaffin secretory vesicles after digestion, by the *S. aureus* protease Glu-C. As previously hypothesized for CHR, CCA could be generated during infections induced by *S. aureus*.

Antimicrobial peptides derived from bovine chromogranin B

To date, the natural C-terminal fragment of bovine CGB (CCB; bCGB564-626), isolated from chromaffin granules of the adrenal medulla, presents antibacterial activity against both *M. luteus* and *E. coli*. The complete inhibition of bacterial growth was observed at a concentration of 1.8 μM [17]. This large fragment contains the natural short antibacterial peptide secretolytin (SEC, bCGB614-626) with a net positive charge (+3) (Figure 1). A structure-activity analysis suggests that an alpha-helical amphipathic structure, common to SEC and cecropins, may account for the antibacterial activity [17].

Antimicrobial peptides derived from bovine secretogranin II

The weak expression of bSGII in the intragranular matrix of chromaffin secretory vesicles (2% of total proteins) prevents the detection of its endogenous AMPs by classical methods. However, *in-silico* analysis allowed the identification and preparation of two synthetic peptides with cationic amphipathic sequences: Rrf and Kvk, corresponding respectively to the sequences bSGII131-138 (net charge +4.5) and bSGII430-443 (net charge + 4) (Figure 1). Rrf completely inhibits the bacterial growth of *M. luteus* and *B. megaterium* with a MIC of 5 and 15 μM , respectively, while Kvk displays antifungal properties at 19 μM against *N. crassa* [25]. Like numerous AMPs, antimicrobial CGs/SGs derived peptides are expressed as pro-peptides which undergo subsequent proteolytic processing to release active molecules.

The CGA-derived peptides: production and molecular mechanism of the antimicrobial activities

Previously, we have identified a number of AMPs derived from Chromogranins (CGs), proenkephalin-A and ubiquitin which are co-secreted with catecholamines upon stimulation of chromaffin cells from the adrenal medulla [20, 25]. It should be noted that the pro-sequences of several active peptides derived from CGA (Chrom, CAT, CCA), CGB (SEC) and SGII (Rrf) are composed of anionic amino acids similar to those observed in pre-prodefensins [32] (Figure 2).

When polymorphonuclear neutrophils, known to accumulate at sites of infection, are stimulated by bacterial agents, such as Panton-Valentine leucocidin (PVL), they produce and secrete complete and processed forms of CGA, notably vasostatin-I (residues 1-76), vasostatin-II (residues 1-113) [19] and cateslytin (residues 344-358) [20] (Figure 3A). Others experiments have detected catestatin in infected skin [21] consistent with the presence of CGA in keratinocytes. Catestatin present an antimicrobial activity against skin microbes, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast, and fungi. In human skin, CGA was found to be proteolytically processed to produce catestatin. Interestingly, catestatin expression in murine skin is increased in response to injury and infections, potentially providing protection against infection (Figure 3B). These results demonstrate that a neuroendocrine peptide with antimicrobial function is upregulated upon injury, suggesting a direct link between the neuroendocrine and cutaneous immune systems [21].

Antimicrobial peptides have two modes of action on microorganisms [33]. They can either target and permeabilize cell membranes following several described mechanisms [34] or alternatively they can act on intracellular targets to induce DNA binding, enzyme inactivation and inhibition of cell wall synthesis. These two mechanisms can be illustrated by the antimicrobial action of chromofungin (CHR) and catestatin (CAT),

two AMPs derived from CGA. The NMR structure of CHR showed a helical amphipathic character in the presence of trifluoroethanol [26]. This property allows the peptide to bind and to cross fungal membranes (*Aspergillus fumigatus*) [26] (Figure 4B). CHR penetrates into microorganisms creating holes, through which the inactive rhodaminated CGB602–626 peptide is able to pass (Figure 4C and D) inducing cell wall and membrane destabilization. In order to kill the microorganism, the membrane destabilization is completed by the interaction of CHR with calmodulin, an intracellular target [26]. CAT acts similarly to CHR [20].

Biological roles of CHR and CAT with neutrophils

On mammalian cells, CHR and CAT act following different ways: (i) membrane crossing and stimulation of innate immunity [35], (ii) binding to AchR and/or surrounding lipids, acting as an anti-stress hormone [36] and (iii) modulating myocardial cells by a yet unknown mechanism [37].

In 2009, our group has investigated the effects of CHR and CAT on PMNs activation using a broad range of techniques (biochemistry, confocal microscopy, flow cytometry, calcium imaging, surface plasmon resonance and proteomic analysis) [35]. By confocal microscopy, we first demonstrated the uptake of rhodaminated-labeled CHR and CAT into isolated PMNs (Figure 5). We showed that these CGA-derived peptides stimulate exocytosis from PMNs by triggering a transient Ca^{2+} influx, independent from intracellular vesicles release. For the two peptides, the molecular mechanisms involve calmodulin-binding, subsequent activation of the calcium-independent phospholipase A2 and opening of the store-operated channels which induce the secretion of numerous factors involved in innate immunity. The complete mechanism is reported in Figure 6. Stress and infection lead to two different pathways stimulating PMNs secretion: release of CGA and CGA-derived peptides from the adrenal medulla, as indicated by 1a–6a

(black), and PVL leucocidin stimulation by *S. aureus* infections, as indicated by 1b–3b (grey), respectively. The stress-stimulated pathway leads to the penetration of P into the cytoplasm (2a), resulting in the removal of inhibitory CaM, the activation of iPLA2 to produce LysoPL (3a) and the activation of Ca²⁺ influx through SOC (4a), finally converging on the activated docking of secretory granules (5a) and subsequent release of proteins relevant for innate immunity (6a). The negative feedback induced by P' on nicotinic cholinergic receptor in chromaffin cell is also indicated (7a). The infective route leads to the activation of the putative PVL receptor triggering the opening of Ca²⁺-channels and subsequent increase in intracellular Ca²⁺ (3b) leading to the docking of secretory granules and secretion of proteins relevant for innate immunity (6a) [35].

Host-pathogen interactions: the degradation of antimicrobial CGA-derived peptides by bacterial proteases.

The AMPs avoidance mechanisms deployed by bacteria include the proteolytic degradation of the active forms by the bacterial proteases. To examine the effects of bacterial proteases, we have tested *Staphylococcus aureus* V8 protease Glu-C and supernatants S1 and S2 from *S. aureus* on isolated AMPs derived from CGs using biochemical methods. In addition, supernatants from *Salmonella enteretica*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella sonnei* and *Vibrio cholera* were also tested.

Interaction of antimicrobial CGs-derived peptides with proteases from Staphylococcus aureus

After incubation of intragranular chromaffin cell contents with *S. aureus* V8 protease Glu-C 21 new peptides, located along the CGA sequence (Figure 8), were isolated by HPLC (Figure 7) and analyzed by sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. These peptides were tested against Gram positive bacteria (*Micrococcus luteus* and *S.*

aureus), Gram negative bacteria (*Escherichia coli*), fungi (*Neurospora crassa*) and yeast (*Candida albicans*). Surprisingly, they do not present any antibacterial activity; however 5 peptides corresponding to CGA47-60, CGA418-426 and CGB279-291, CGB450-464 and CGB470-486 showed antifungal activity at the micromolar range against *N. crassa*. Thus, *S. aureus* subverts innate immunity by degrading the antibacterial CGs-derived peptides to produce new antifungal molecules. Finally *S. aureus* protects itself by degrading endogenous antibacterial peptides and generating new products presenting antifungal properties.

Degradation of the natural antimicrobial peptide Vasostatin-I [19] generates the peptides 1-13, 14-20 linked to 38-40 by a disulfide bridge, 21-37, 47-60 and 61-71 (Figure 8). Prochromacin, the antimicrobial C-terminal domain [23] was also degraded to form 14 peptides (79-85, 89-101, 89-104, 148-154, 157-180, 200-207, 228-244, 245-254/264, 274-283, 284-303, 334-378, 379-391, 387-394 and 418-426) (Figure 8). Chromacin (CGA₁₇₃₋₁₉₄), [23] was proteolysed after the residue E₁₈₀ and pro-Catestatin (CGA₃₃₄₋₃₇₈) was resistant to the proteolysis by *S. aureus* V8 protease Glu-C in our experimental conditions (Figure 8).

In a second series of experiments three antimicrobial CGA-derived peptides (bCAT, hCAT and CTL) were incubated in the presence of staphylococcal supernatants S1 (a Methicillin resistant strain, MRSA) and S2 (a non-resistant strain). Bacteria were isolated from patients of the Strasbourg Civil Hospital and the supernatants were prepared by the Bacteriology Institute at University of Strasbourg, (EA-4438). CTL (CGA₃₄₄₋₃₅₈), the active domain of CAT, is able to kill *S. aureus* (strain ATCC 49775) at 30 μ M, but the two others peptides (bCAT and hCAT) are inactive. By proteomic analysis (HPLC, sequencing and mass spectrometry), we demonstrated that the two fragments bCGA₃₄₄₋₃₆₄ (bCAT) and hCGA₃₅₂₋₃₇₂ (hCAT) were cleaved at

the L-S bond by S1 and at the S-F/G-F bonds by S2. In contrast, CTL was very weakly degraded by both S1 and S2 supernatants (Figure 9). These data suggest that the C-terminal sequence of CAT (GPGP/LQL) induces a conformation of the total peptide that might be cleaved by *S. aureus* proteases, whereas CTL remains stable. Using the GOR secondary structure prediction method [38], it appears that the CTL domain with extended strand prediction corresponds to 60.3% of the total sequence compared with 38% for the 2 CAT sequences. Consistently, previous reports indicated the importance of an extended strand for several classes of protease inhibitors [39]. Our observation indicates that the structure of CTL might present a protease inhibitor activity.

Interaction of antimicrobial CGs-derived peptides with proteases from diarrheogenic bacteria

Bacteria were isolated from patients of the Strasbourg Civil Hospital by the Bacteriology Institute, University of Strasbourg, (EA-4438). *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholera* infections have a clinical interest as they cause other symptoms beside diarrhea. *Klebsiella oxytoca* may be commensal [42] and is involved in post-antibiotic diarrheas [40], as well as nosocomial infections in newborns and adults [41]. *K. oxytoca* has also been associated with hemorrhagic colitis [43] and intercurrent colitis in Crohn's disease [44]. *Salmonella enterica* destroys infected cells and causes gastrointestinal infections which propagates through blood (sepsis) or through lymphatic vessel (typhoid fever). *Shigella sonnei* and *Vibrio cholera* non O1 produce Shiga toxin which causes inflammation of the intestinal mucosa. *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholera* all develop an antibiotic resistance. *Salmonella* was reported to be resistant to the action of Ciprofloxacin [45] and Ceftriaxone [46].

We tested the antimicrobial activity of bovine (bCGA344-364), rat (rCGA344-364) and human (hCGA352-372) CAT, bovine CTL (bCGA344-358), two short fragments hCGA360-372 and the conserved tetrapeptide LSFR (bCGA348-351) against the four bacterial strains mentioned above. In addition, we tested a scrambled peptide relative to the sequence of bovine CAT and the procatestatin fragment bCGA332-364. We found antimicrobial activities only for bovine CAT and CTL, indicating that CTL, the shorter fragment, corresponds to the active domain of CAT. Procatestatin was inactive in similar experimental conditions. Bovine CAT and CTL were active against *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* and *Vibrio cholera* at 100 μ M and 30 μ M respectively and against *Shigella Sonnei* at 50 μ M and 25 μ M. In addition, CHR and the C-terminal fragment (CGA387-431) were inactive for concentration below 100 μ M. We then compared the profiles of the peptides alone and with the inoculated medium, using HPLC.

These experiments showed that all the peptides were completely degraded by the bacteria, except for CTL. The degradation by bacterial proteases was observed by the HPLC profiles of proCAT (CGA332-364) after incubation with *Salmonella enterica* (Figure 10). The complete peptide and the processed forms were analyzed by sequencing and mass spectrometry (MALDI-TOF) (Figure 10).

Synergy of the combination of antimicrobial CGA-derived peptides with antibiotics

The high toxic effects of antibiotics have shifted the research focus towards the discovery of new combination of antimicrobial agents with broad spectrum of activity and less toxicity. Synergy is the combined activity of two agents which is higher than the added activity of each agent separately [47]. Considering the direct interaction of AMPs with membranes, they represent good candidates to potentiate antibiotics activity through synergistic actions. To demonstrate that antimicrobial peptides are able to

reduce the doses of antibiotics used and to potentiate their activity, we evaluated the synergistic effects of three CGA-derived peptides (CAT, CTL and amidated CTL) together with Minocyclin and Voriconazole. Antimicrobial tests were carried out using the antimicrobial peptides (at concentration below MIC), the antibiotics or a combination of both, evaluating the fractional inhibitory concentration (FIC): $FIC \leq 0.5$ corresponds to a synergistic effect, between 0.5 and 2 to an additive effect, and > 2 to an antagonistic effect [47]. Importantly, the combination of amidated CTL and Minocyclin led to a FIC of 0.37 against *S. aureus*. In addition, for CTL and Voriconazole, we obtained a FIC of 0.25 and 0.5 against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, respectively.

One could imagine a mechanism by which the AMPs could favor the destabilization of the membrane allowing the antibiotics to rapidly penetrate inside the bacterial cells and more efficiently reach its site of action. Together our results suggest that CGA-derived peptides could potentiate the effects of antibiotics by favoring membrane destabilization.

Conclusions

The natural antimicrobial peptides derived from chromogranin-A are important components in innate immunity. These peptides act rapidly to destroy microorganisms after destabilization of their outer membrane. AMPs are non-toxic for the host cells and stimulate neutrophils *via* a calcium influx and store operated channels.

Together with recent data reporting that numerous antifungal peptides correspond to short sequences (<25 residues), we showed that *S.aureus* is able to degrade antibacterial peptides producing smaller fragments with antifungal activities [48]. Thus, a new concept might be proposed in which the proteolytic degradation of long natural and

antibacterial peptides by host pathogens might produce new antifungal fragments. Our studies show that, unlike larger CAT peptides, the short CTL peptide resists to bacterial supernatants. Its secondary structure prediction corresponds to a larger domain of extended strand, characterized by proteolytic inhibitory properties. Finally CAT and CTL peptides might be used with antibiotics to synergistically destabilize the pathogen's membrane allowing the drug to rapidly penetrate inside the microorganisms.

Acknowledgments

This study was funded by INSERM (MHMB) and the Faculty of Odontology (YH) of the University of Strasbourg. We are grateful to financial assistance from the Hospital of Strasbourg (FS, TL). We thank Charlotte Bach for the excellent technical assistance and Bernard Guérold for the preparation of the synthetic peptides.

Legends of figures

Figure 1: The antimicrobial bovine CGs-derived peptides according to the sequences reported in the Protein Knowledge Base UniprotKB for CGA (P05059), CGB (P23389) and CGC (P20616). For each AMP, the sequence, the location and net charge are indicated. *, cysteine residues of the disulfide bridge; phosphorylated residue are underlined and the glycosylated residue is in bold. This figure was originally published in Regul. Peptides, Shooshtarizadeh P et al., The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. Regul. Peptides, 2010 165(1), 102-110.

Figure 2: Anionic pro-peptides sequences found in bovine CGs-derived peptides. The sequence of each antimicrobial peptide is indicated in grey. The acidic residues present in the propeptide sequence are underlined. (A), CGA-derived fragments (Chrom, CAT, CCA); (B), CGB-derived fragment (SEC); (C), CGC/SGII-derived fragment (Rrf). Arrows represent natural cleavage sites occurring during the storage in chromaffin granules. This figure was originally published in Regul. Peptides, Shooshtarizadeh P et al., The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. Regul. Peptides, 2010 165(1), 102-110.

Figure 3: Production of catestatin by neutrophils and keratinocytes. (A), Western blot analysis (12%, SDS-PAGE) with polyclonal anti-catestatin antibody. 1st lane, Molecular weight standards (MW); 2nd lane, soluble proteins from chromaffin granular matrix (PSG); 3rd lane, secretions from PMNs activated by Panton-Valentine leucocidin. (B), CAT staining is shown at (a) baseline, (b) 3 hours post-tape stripping. This work was originally published in Cell. Mol. Life Science, Briolat J. et al, New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptides from chromogranin A, 2005,

(21), 377-385 and in J. Invest. Dermatol., Radek, K.A. et al., J. Invest. Dermatol. 2008, 128(6), 1525-1534.

Figure 4: Phase-contrast (*left*) and fluorescence confocal laser (*right*) micrographs of *Aspergillus fumigatus* after incubation with rhodamine-labeled synthetic peptides (CHR and CGB602–626, as a control). (A), in the absence of rhodamine-labeled synthetic peptide; (B), after incubation with 10 μ M rhodaminated CGA47–66 during 1 h; (C), after incubation with 10 μ M rhodaminated CGB602–626 for 1 h. (D), *A. fumigatus* was examined after 24 h in cultured medium (30 °C) and preincubated during 1 h at 30 °C with 100 μ M unlabeled CGA47–66 and 10 μ M rhodaminated CGB602–626. An intense staining was observed, indicating that CHR induced cell wall and membrane destabilization with formation of holes through which rhodaminated CGB602–626 peptide is able to pass. This research was originally published in J. Biol. Chem. Lugardon K. et al., Structural and biological characterization of chromofungin, the anti-fungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. 2001, J. Biol. Chem. 276(38), 35875-35882.

Figure 5: Fluorescence confocal microscopy of PMNs after incubation with 20 μ M rhodaminated labeled CHR (A) and CAT (B). Unactive rhodaminated HCNP (Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide) was used as control (C). This research was originally published in PLoS One. Zhang, D. et al., Two Chromogranin A-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin regulated calcium independent phospholipase A2. PLoS One., 2009, 4(2):e4501.

Figure 6: Model for the activation of PMNs by CHR and CAT. P (CHR), P' (CAT), CPP (cell penetrating peptide, CaM (calmodulin), iPLA2 (calcium independent phospholipase A2), LysoPL (lysophospholipids), GC, Golgi complex, PVL, Panton-

Valentine leucocidin, R (receptor). Stress and infection lead to two different pathways for stimulation of PMN secretion, by release of CGA and CGA-derived peptides from the adrenal medulla, as indicated by 1a–6a (black), and by PVL leucocidin stimulation by *S. aureus* infections, as indicated by 1b–3b (grey), respectively. Abbreviated symbols: P (CHR, CAT), P' (CAT), CPP (Cell Penetrating Peptide), CaM (calmodulin), iPLA2 (calcium independent phospholipase A2) LysoPL (lysophospholipids); GC (Golgi complex); PVL (Panton-Valentine leucocidin), R (receptor). The stress-stimulated pathway leads to penetration of P into the cytoplasm (2a), resulting in removal of inhibitory CaM, activation of iPLA2 to produce LysoPL (3a) and activation of Ca^{2+} influx through SOC (4a), converging on activated docking of secretory granules (5a) and subsequent release of proteins of relevance for innate immunity (6a). The negative feedback induced by P' on nicotinic cholinergic receptor of chromaffin cell is also indicated (7a). The infective route leads to activation of the putative PVL receptor coupled to opening of Ca^{2+} -channels and a rise in intracellular Ca^{2+} (3b) that converges on docking of secretory granules and subsequent secretion of proteins of relevance for innate immunity (6a). This research was originally published in *PIOs One*. Zhang, D. et al., Two Chromogranin A-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One.*, 2009, 4(2):e4501.

Figure 7: Separation by HPLC of bovine chromaffin intragranular matrix (grey curve) and of V8 protease Glu-C digest of bovine chromaffin intragranular matrix (1 mg, black curve). HPLC was performed on a Macherey Nagel Lichrospher 100-5-RP-C18 column (4 x 250 mm; particle size 5 μm and pore size 100 nm). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% (v/v) acetonitrile and 30% (v/v) water (solvent B). Absorbance was monitored at

214 nm and elution was performed with a linear gradient as indicated on the right-hand scale.

Figure 8: Sequence alignment of the identified peptides produced after incubation of the stimulated chromaffin cell secretions with *S. aureus* V8 protease Glu-C. Antimicrobial regions Vasostatin and Prochromacin are marked by grey lines and the new generated peptides are in black. Arrows indicate cleavage site by Glu-C protease.

Figure 9: Degradation analysis of bCAT, hCAT and CTL with S1 and S2 two *Staphylococcus aureus* supernatants. Arrows indicate cleavage sites produced by proteases from S1 and S2. CTL resists to the proteolytic degradation.

Figure 10: Analysis by HPLC of the procatostatin (proCAT) and degradation by *Salmonella enterica*. The HPLC system is composed by a Dionex chromatogram, (Germerong, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 μm, porosity 300 Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 μL min⁻¹ using the gradient indicated on the chromatogram. Arrows correspond to the cleavage sites induced by *S. enteretica*.

References

- 1-Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, **2004**, *198*, 169-184
- 2-Aerts, A.M.; François, I.E.; Cammue, B.P.; Thevissen, K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*(12), 2069-2079
- 3-Manners, J.M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome Biol.*, **2007**, *8*(9), 225
- 4-Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, **2003**, *55*(1), 27-55
- 5-Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak, L.W.; Oppenheim, J.J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.*, **2002**, *23*(6), 291-296
- 6-Zanetti, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukocyte Biol.*, **2004**, *75*(1), 39-48
- 7-Helle, K.B. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol. Rev. Camb. Philo. Soc.*, **2004**, *79*(4), 769-794
- 8-Metz-Boutigue, M.H.; Garcia-Sablone, P.; Hogue-Angeletti, R.; Aunis, D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *217*(1), 247-257
- 9-Strub, J.M.; Garcia-Sablone, P.; Lonning, K.; Taupenot, L.; Hubert, P.; Van Dorsselaer, A.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, *229*(2), 356-368

- 10- Seidah, N.G.; Chretien, M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.*, **1999**, 848(1-2), 45-62
- 11- Anouar, Y.; Yon, L.; Desmoucelles, C.; Leprince, J.; Breault, L.; Gallo-Payet, N.; Vaudry, H. Identification of a novel secretogranin II-derived peptide in the adult and fetal human adrenal gland. *Endocr. Res.* **1998**, 24(3-4), 731-736
- 12- Marksteiner, J.; Kirchmair, R.; Mahata, S.K.; Mahata, M.; Fischer-Colbrie, R.; Hogue-Angeletti, R.; Saria, A.; Winkler, H. Distribution of secretoneurin, a peptide derived from secretogranin II, in rat brain: an immunocytochemical and radioimmunological study. *Eur. J. Neurosci.*, **1993**, 54(4), 923-944
- 13- Yajima, A.; Ikeda, M.; Miyazaki, K.; Maeshima, T.; Narita, N.; Narita, M.; Manserin, a novel peptide from secretogranin II in the neuroendocrine system. *Neuroreport*, **2004**, 15(11), 1755-1759
- 14- Eiden, L.E. Is chromogranin a prohormone? *Nature*, **1987**, 325(6102), 301
- 15- Tatemoto, K.; Efendić, S.; Mutt, V.; Makk, G.; Feistner, G.J.; Barchas, J.D. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, **1986**, 324(6096), 476-478
- 16- Helle, K.B.; Corti, A.; Metz-Boutigue, M.H.; Tota, B. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, 64(22), 2863-2886
- 17- Strub, J.M.; Hubert, P.; Nullans, G.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. *FEBS Lett.*, **1996**, 379(3), 273-278

- 18- Metz-Boutigue, M.H.; Goumon, Y.; Lugardon, K.; Strub, J.M.; Aunis, D. Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **1998**, *18*(2), 249-266
- 19- Lugardon, K.; Raffner, R.; Goumon, Y.; Corti, A.; Delmas, A.; Bulet, P.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*(15), 10745-10753
- 20- Briolat, J.; Wu, S.D.; Mahata, S.K.; Gonthier, B.; Bagnard, D.; Chasserot-Golaz, S.; Helle, K.B.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**, *62*(3), 377-385
- 21- Radek, K.A.; Lopez-Garcia, B.; Hupe, M.; Niesman, I.R.; Elias, P.M.; Taupenot, L.; Mahata, S.K.; O'Connor, D.T.; Gallo, R.L. The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J. Invest. Dermatol.*, **2008**, *128*(6), 1525-1534
- 22- Sternberg, E.M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, *6*(4), 318-328
- 23- Strub, J.M.; Goumon, Y.; Lugardon, K.; Capon, C.; Lopez, M.; Moniatte, M.; Van Dorsselaer, A.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*(45), 28533-28540
- 24- Maget-Dana, R.; Metz-Boutigue, M.H.; Helle, K.B. The N-terminal domain of chromogranin A (CGA1-40) interacts with monolayers of membrane lipids of fungal and mammalian compositions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2002**, *971*, 352-354

- 25- Shooshtarizadeh, P.; Zhang, D.; Chich, J.F.; Gasnier, C.; Schneider, F.; Haïkel, Y.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. *Regul. Peptides*, **2010**, *165*(1), 102-110
- 26- Lugardon, K.; Chasserot-Golaz, S.; Kieffer, A.E.; Maget-Dana, R.; Nullans, G.; Kieffer, B.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.H. Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*(38), 35875-35882
- 27- Yoo, S.H. Identification of the Ca(2+)-dependent calmodulin-binding region of chromogranin A. *Biochemistry*, **1992**, *31*(26), 6134-6140
- 28- Blois, A.; Holmsen, H.; Martino, G.; Corti, A.; Metz-Boutigue, M.H.; Helle, K.B. Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Regul. Peptides*, **2006**, *134*(1), 30-37
- 29- Taylor, C.V.; Taupenot, L.; Mahata, S.K.; Mahata, M.; Wu, H.; Yasothornsrikul, S.; Toneff, T.; Caporale, C.; Jiang, Q.; Parmer, R.J.; Hook, V.Y.; O'Connor, D.T. Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*(30), 22905-22915
- 30- Biswas, N.; Rodriguez-Flores, J.L.; Courel, M.; Gayen, J.; Vaingankar, S.M.; Mahata, M.; Torpey, J.W.; Taupenot, L.; O'Connor, D.T.; Mahata, S.K. Cathepsin L colocalizes with chromogranin A in chromaffin vesicles to generate active peptides. *Endocrinology*, **2009**, *150*(8), 3547-3557
- 31- Mahata, S.K.; O'Connor, D.T.; Mahata, M.; Yoo, S.H.; Taupenot, L.; Wu, H.; Gill, B.M.; Parmer, R.J. Novel autocrine feedback control of catecholamine release.

A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J. Clin. Invest.*, **1997**, *100*(6), 1623-1633

32- Valore, E.V.; Ganz, T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood*, **1992**, *79*, 1538-1544

33- Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev. Microbiol.*, **2005**, *3*, 238-250

34- Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491-511

35- Zhang, D. ; Shooshtarizadeh, P. ; Laventie, B.J. ; Colin, D.A. ; Chich, J.F. ; Vidic, J. ; de Barry, J. ; Chasserot-Golaz, S. ; Delalande, F. ; Van Dorsselaer, A. ; Schneider, F. ; Helle, K. ; Aunis, D. ; Prévost, G. ; Metz-Boutigue, M.H. Two Chromogranin A-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One.*, **2009**, *4*(2), e4501

36- Herrero, C.J.; Ales, E.; Pintado, A.J.; Lopez, M.G.; Garcia-Palomero, E.; Mahata, S.K.; O'Connor, D.T.; Garcia, A.G.; Montiel, C. Modulatory mechanism of the endogenous peptide catestatin on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and exocytosis. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 377-388

37- Angelone, T.; Quintieri, A.M.; Brar, B.K.; Limchaiyawat, P.T.; Tota, B.; Mahata, S.K.; Cerra, M.C. The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism. *Endocrinology*, **2008**, *149*, 4780-4793

38- Gorkiewicz, G. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **2009**, *33*(Suppl 1), S37-41

- 39- Garnier, J.; Gibrat, J.F.; Robson, B.; GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology*, **1996**, *266*, 540-553, Doolittle R. F. Ed.
- 40- Fairlie, D.P.; Tyndall, J.D.; Reid, R.C.; Wong, A.K.; Abbenante, G.; Scanlon, M.J.; March, D.R.; Bergman, D.A.; Chai, C.L.; Burkett, B.A. Confirmational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes: implications for drug design and polypeptide processing. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*(7):1271-1281
- 41- Biran, V.; Gaudin, A.; Mariani-Kurdjian, P.; Doit, C.; Bingen, E.; Aujard, Y. Implication of extended-spectrum beta-lactamase enterobacteriaceae in nosocomial infections in neonates. *Arch. Pediatrice*, **2010**, *17* (Suppl 4), S150-153
- 42- Tsakris, A.; Poulou, A.; Markou, F.; Pitiriga, V.; Piperaki, E.T.; Kristo, I.; Pournaras, S. Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*(7), 3164-3168
- 43- Hoffmann, K.M.; Deutschmann, A.; Weitzer, C.; Joainig, M.; Zechner, E.; Hogenauer, C.; Hauer, A.C. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*, **2010**, *125*(4), e960-963
- 44- Plessier, A.; Cosnes, J.; Gendre, J.P.; Beaugerie, L. Intercurrent *Klebsiella oxytoca* colitis in a patient with Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **2002**, *26*(8-9), 799-800
- 45- Medalla, F.; Sjölund-Karlsson, M.; Shin, S.; Harvey, E.; Joyce, K.; Theobald, L.; Nygren, B.N.; Pecic, G.; Gay, K.; Austin, J.; Stuart, A.; Blanton, E.; Mintz, E. D.; Whichard, J. M.; Barzilay, E. J. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhi, United States, 1999-2008. *Emerging Infectious Diseases*, **2011**, *17*(6), 1095-1098

- 46- Su, L.H.; Teng, W.S.; Chen, C.L.; Lee, H.Y.; Li, H.C.; Wu, T.L.; Chiu, C.H. Increasing ceftriaxone resistance in Salmonellae, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.*, **2011**, *17*(6), 1086-1090
- 47- Serra, P.; Brandimarte, C.; Martino, P.; Carlone, S.; Giunchi, G. Synergistic treatment of enterococcal endocarditis: in vitro and in vivo studies. *Arch. Intern. Med.*, **1977**, *137*(11), 1562-1567.
- 48- Desbois AP, Tschörner D, Coote PJ. Survey of small antifungal peptides with chemotherapeutic potential. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*(8):1263-1291.

Figure 1:

Peptide	Location	Sequence	Net charge
CGA			
VS-I	1-76	LPVNSPMNKGDTVEVMKC*IVEVISDTLSKPSMPVSKEC*FETLRGDERILSILRHQNLKELQDLALQGAKERTHQ	+3
NCA	4-40	NSPMNKGDTVEVMKC*IVEVISDTLSKPSMPVSKEC*FE	-1
CHR	47-66	RILSILRHQNLKELQDLAL	+1.5
Chrom	173-194	YPGPQAKEDSEGSPSQGPASREK	-1
CAT	344-364	RSMRLSFRARGYGFRGPGQL	+5
CCA	418-427	LEKVAHQLEE	-2
ProChrom	79-431	HSSYEDELSEVLEK.....	-37
CGB			
Chromb	564-626	SAEFPDFYDSEEQMSPQHTAENEEKAGQGVLTETEEKELENLAAMDLELQKIAEKFSGTRRG	-12
SEC	614-626	QKIAEKFSGTRRG	+3
CGC			
Rrf	131-138	RKLKHMRF	+4.5
Kvk	430-443	KVLSRLPYGGRSK	+4

Figure 2:



Figure 3:

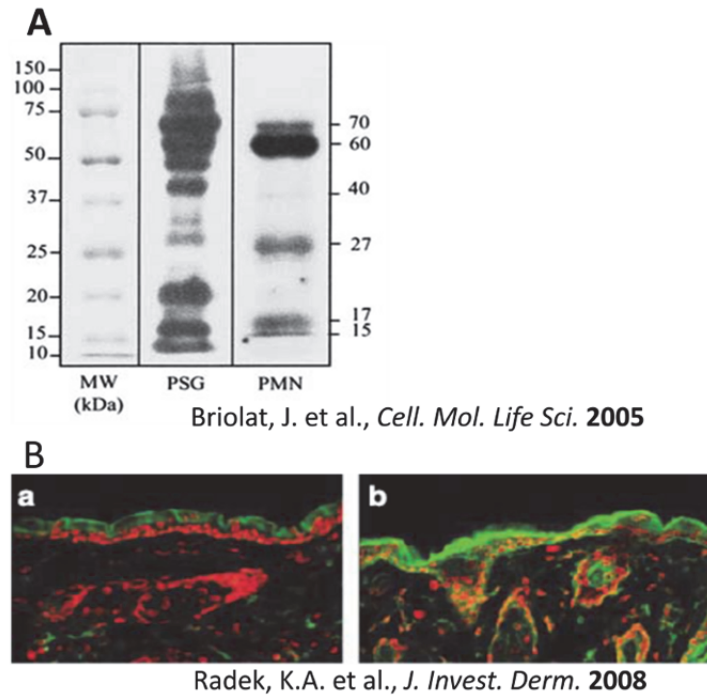


Figure 4:

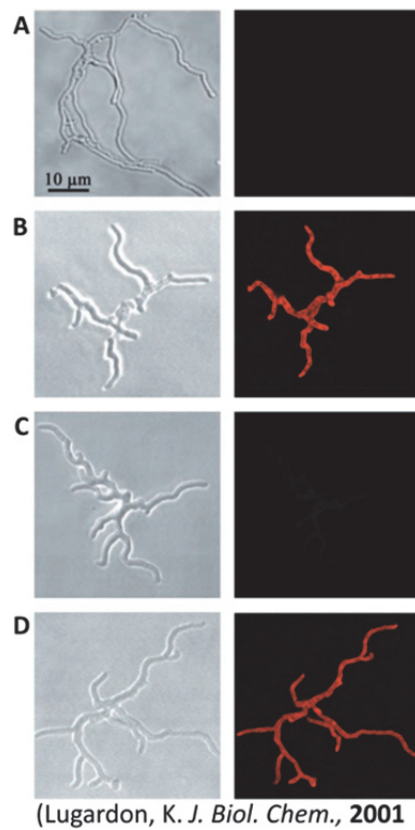


Figure 5:

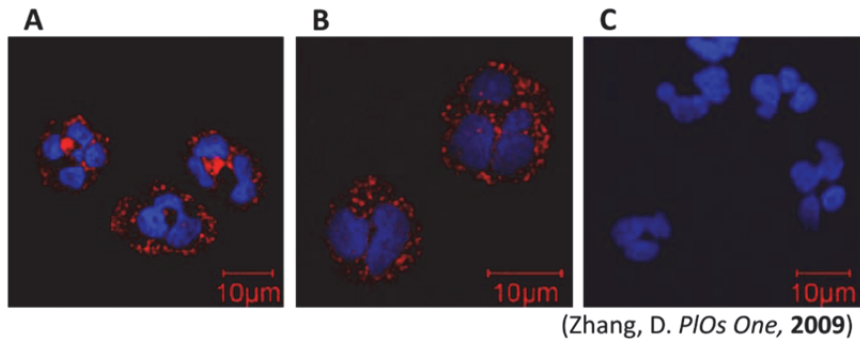


Figure 6:

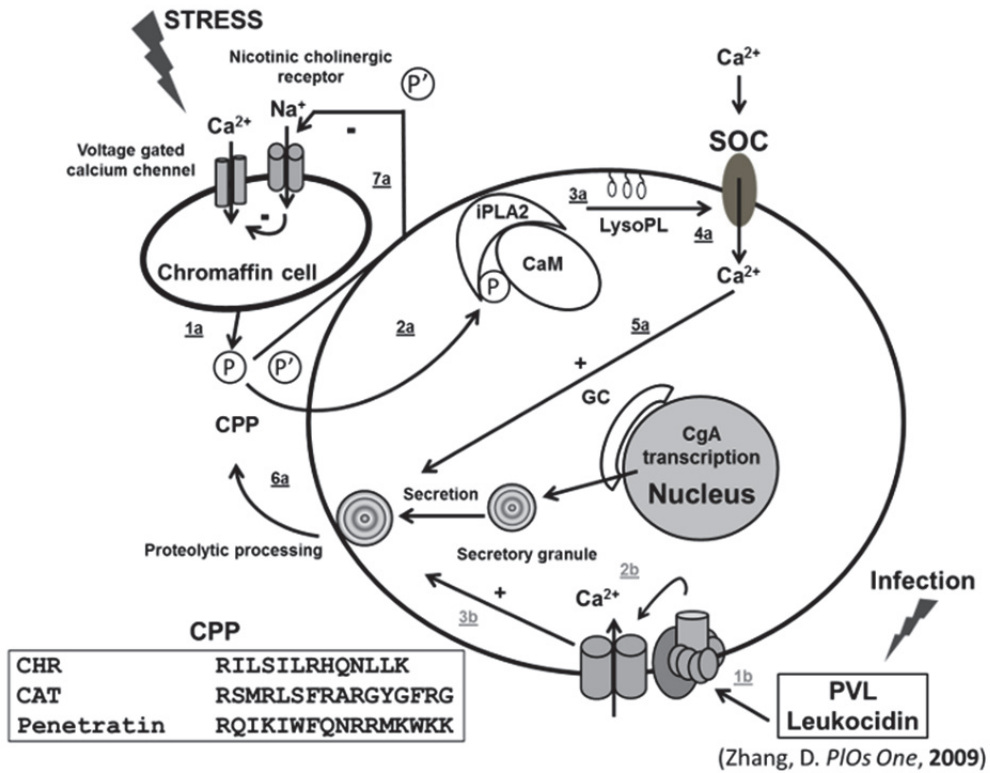


Figure 7:

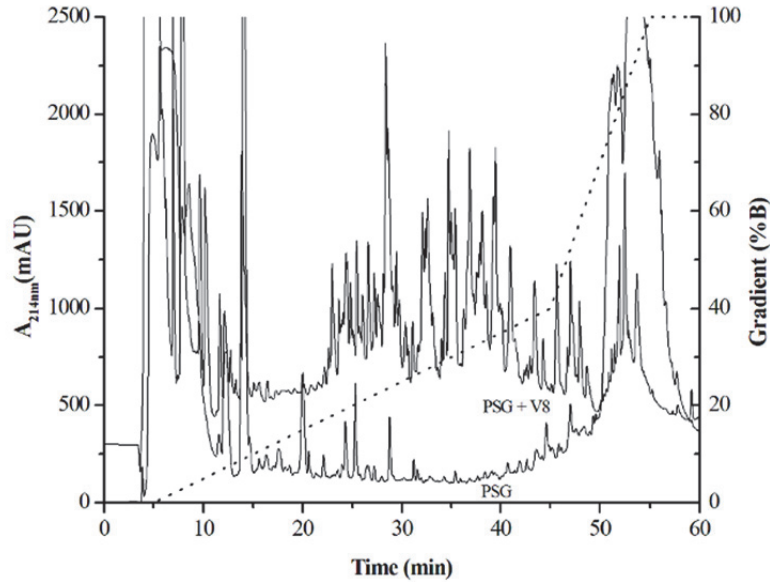


Figure 8:

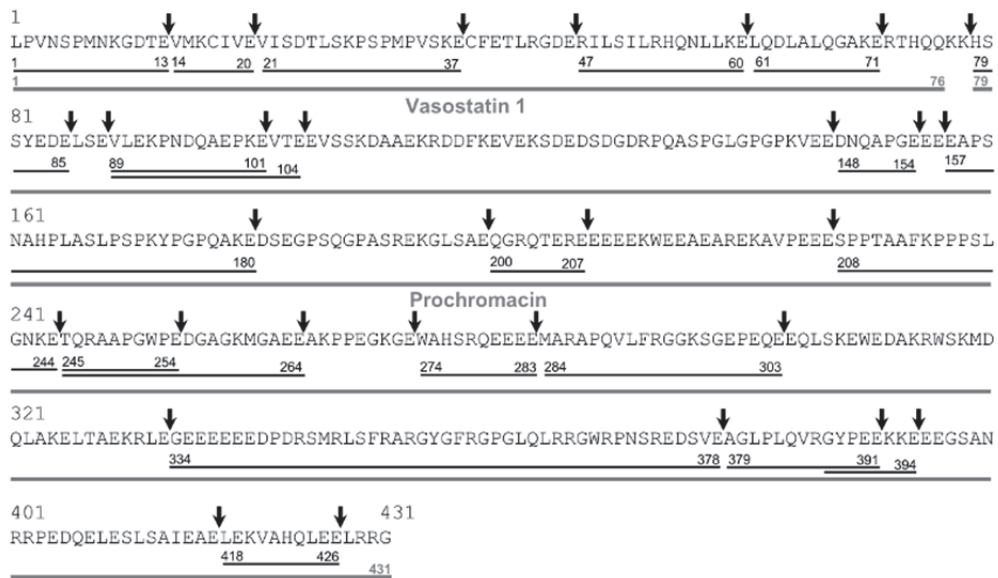


Figure 9:

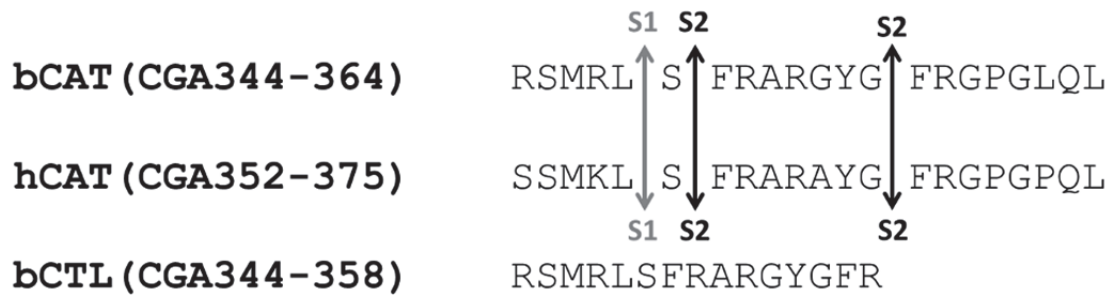
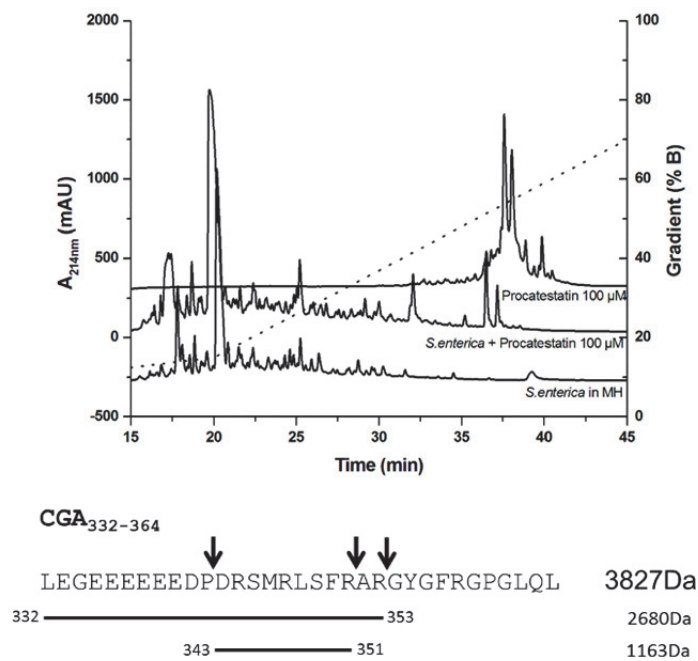


Figure 10:



Manuscrit 2

The natural antimicrobial chromogranins/secretogranins-derived peptides: production, lytic activity and processing by bacterial proteases

Ménonvè Atindehou*¹, Rizwan Aslam*¹, Jean-François Chich¹, Gilles Prévost², Francis Schneider³, Marie-Hélène Metz-Boutigue¹ §

Book **Antibacterial Agents, Book 1, Intech** ISBN 979-953-307-281-3

Review paper

Cet article constitue le chapitre d'un livre consacré aux agents antibactériens.

De nombreuses études ont montré l'utilité des peptides antimicrobiens pour combattre les infections et leurs implications dans d'autres pathologies. Parmi ces peptides les plus étudiés sont les défensines et les cathélicidines. Ce chapitre de livre a pour but d'apporter un éclairage sur les granines et leurs peptides dérivés et leurs implications dans la lutte contre les infections. Il s'agit d'une recherche translationnelle qui assure un continuum des études fondamentales et cliniques. Sur la base des résultats antérieurs du laboratoire et en s'appuyant sur la bibliographie, nous présentons les propriétés structurales et biologiques des granines et de leurs peptides dérivés.

Nous avons montré que la chromogranine A est un marqueur de gravité du choc septique et su SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*). L'interaction des peptides dérivés des chromogranines A et B avec des bactéries et champignons a été décrite et l'importance des associations d'antibiotiques avec les peptides est montrée. La dernière partie de ce chapitre de livre est consacrée aux applications thérapeutiques envisagées sur la base des résultats obtenus. Au vu des résultats obtenus, les prochains travaux de notre équipe viseront à implanter les peptides dérivés de la chromogranine A dans les biomatériaux utilisés en milieux hospitaliers (cathéters, prothèses, valves cardiaques) afin de combattre les infections nosocomiales.

The Natural Antimicrobial Chromogranins/Secretogranins-Derived Peptides – Production, Lytic Activity and Processing by Bacterial Proteases

Ménonvè Atindehou^{*}, Rizwan Aslam^{*}, Jean-François Chich, Youssef Haïkel, Francis Schneider and Marie-Hélène Metz-Boutigue

^{*} These authors contributed equally
*Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire, University of Strasbourg, Strasbourg
France*

1. Introduction

1.1 Multidrug antibiotic resistance and innate immunity

Multidrug-resistant organisms, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have important infection control implications in all healthcare settings. Multidrug antibiotic resistance is a worldwide crucial health problem and the production of new potent antibiotics, acting alone or in combination is urgent. In addition, a major factor in the emergence of antibiotic resistant organisms is the overuse of antibiotics in the hospital or the community. To overcome this abuse, numerous efforts are undertaken to reduce antibiotics prescription and/or promote synergistic effects by others molecules.

Indeed, stimulating organism defense is a promising way to struggle against pathogens. The innate immune system is, since 2 billion years, the primary defense in most living organisms and antimicrobial peptides (AMPs) are fundamental components of the innate immune defense of multicellular organisms, either animal or vegetal (Bulet et al., 2004; Aerts et al. 2008; Manners, 2007).

1.2 The antimicrobial peptides

The antimicrobial peptides (AMPs) have been well conserved throughout the evolution and they ensure the organism's defense against a large number of pathogens. They serve as endogenous antibiotics that are able to rapidly kill bacteria, fungi and viruses. Interestingly, they are not toxic for the host cells. Taking into consideration the diversity of the living beings, it is presumed that a large number of specific antibiotic peptides have been developed during evolution, allowing a protection of each organism in various conditions and the last years it has clearly appeared that many of these peptides, in addition to their direct antimicrobial activity, also have a wide range of functions in modulating both innate and adaptive immunity. Most of these are small molecules (less than 40 aminoacids) but some can be proteins. To date more than 1414 antibacterial, antifungal and 107 antiviral peptides have been identified, (antimicrobial peptides database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), including peptides from several tissues and cell types from invertebrates, plants and mammals (Wang Z. & Wang G. 2004). Among them are found cytokines and chemokines, several neuropeptides and fragments derived from proteins exhibiting antimicrobial activity. They carry an average of 40-50 percent hydrophobic residues in such a structure that the folded peptide adopts an amphipathic profile. These properties are important for their microbial killing mechanism: the cationic character of AMPs induces an electrostatic attraction to the negatively-charged phospholipids of microbial membranes and their hydrophobicity aids the integration into the microbial cell membrane, leading to membrane disruption. Furthermore, the amphipathic structure also allows the peptides to be soluble both in aqueous

environments and in lipid membranes (Yeaman & Yount 2003). In mammals, the most well studied AMPs are human defensins and cathelicidins (Zanetti, 2004; Yang et al., 2002). Furthermore, some large proteins such as lysozyme, caseins, hemoglobin, lactalbumin, secretory phospholipase A2 and lactoferrin display antimicrobial activity against numerous microorganisms. Several of them, such as lysozyme and phospholipase A2 are ubiquitous and secreted by a large number of cells (*i.e.* epithelial cells, leukocytes and Paneth cells in the small intestine) (Keshav, 2006). Because a large number of AMPs were identified in gut and skin, in the first part of this chapter we report a review of the well-studied AMPs expressed in these tissues and in the second part we present recent data relative to the new active CGs-derived peptides in relation with pathogens involved with intestine diseases, skin infections and sepsis.

1.3 Gut and antimicrobial peptides

Gastrointestinal mucosa is a large host-environmental interface, showing a remarkable organization (Figure 1) and operating several functions including the digestive absorptive processes and the nutrients peristalsis, but also a physical and immunological protection of the body against microbes and a reconnaissance between commensal and pathogenic microorganisms.

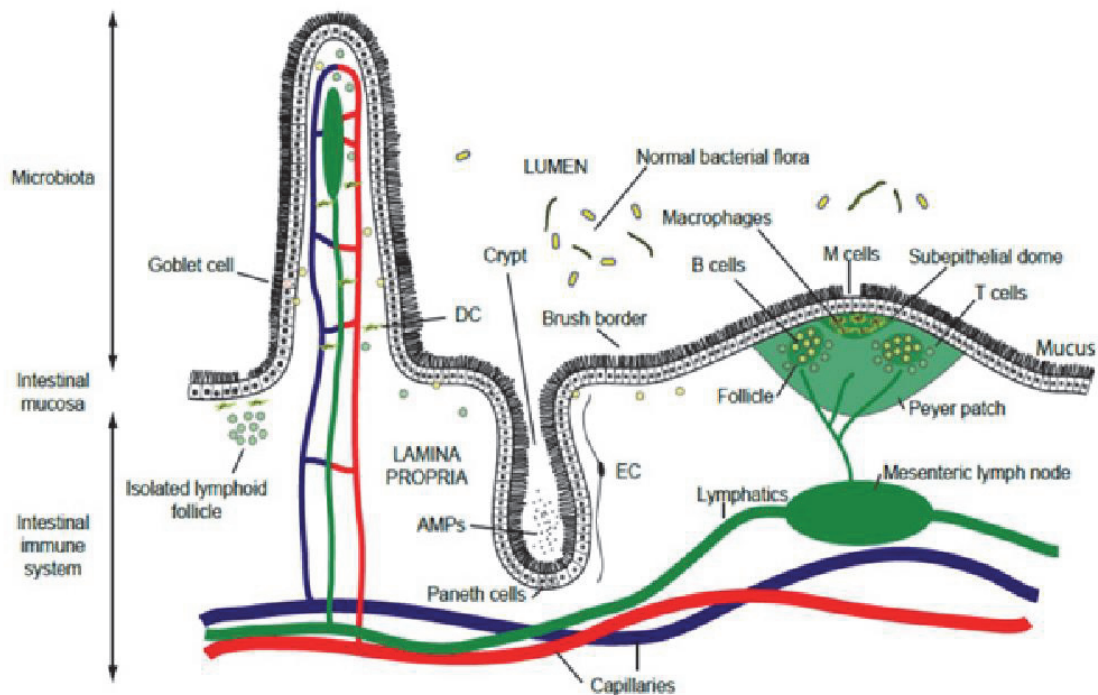


Fig. 1. Schematic representation of the gut epithelium. The different cellular actors involved in innate and/or adaptative immunity are represented. (DC: dendritic cells; EC: enterochromaffin cells.) (According to Metz-Boutigue, M.H. et al., *Curr Pharm Des.*2010;16(9):1024-39).

The Natural Antimicrobial

Lamina propria is a conjunctive tissue composed of fibroblasts, immune cells and collagen. It also contains capillaries and lymphatic vessels. Epithelial cells, or enterocytes, are disposed on a single layer separating the *lumen* from the *lamina propria*. These cells are tightly bound by tight junctions forming an impermeable barrier to commensal flora and to pathogens. Brush-border *microvilli* are present on the apical

surface of absorptive enterocytes, representing a large absorbing surface and allowing of microorganisms to the gut. In contrast, microfold cells are not present in *microvilli* (Figure 1); these cells express cathepsin E (a proteolytic enzyme) and Toll-like receptors able to secrete proinflammatory cytokines and chemokines. The main function of microfold cells is the transport of antigens from the lumen to the subepithelial lymphoid tissue and thus to the adaptive immune system. Several anatomical structures are present along the gastrointestinal tractus. Peyer's patches are lymphoid structures containing B and T cells, macrophages and dendritic cells (Figure 1). Lieberkühn crypts are found in the small intestine and they constitute the basis of the intestinal *villi* (Figure 1). They contain multipotent stem cells and cells, involved in gastrointestinal immunity. Two other cellular types are also present in intestine: i) goblet cells synthesize and secrete large quantities of mucin, ii) enterochromaffin cells that originate from neural crest synthesize serotonin (5-HT) and numerous neuropeptides (Figure 1). In addition to humoral and cellular immunity, non-immunological defense mechanisms represent an important line of intestinal defenses. Some of these protective factors have amply been documented: pancreatic and gastric juices, intestinal motility and intestinal flora (Sarker, 1992). Mucosal epithelial cells and Paneth cells produce a variety of AMPs (defensins, cathelicidins, cryptdin related peptides, bactericidal/permeability increasing protein (BPI), chemokine CCL20 and bacteriolytic enzymes such as lysozyme and group IIA phospholipase A2 (Müller et al., 2005). In addition to their direct role in killing pathogenic microorganisms, AMPs are involved in attraction of leukocytes, alarming the adaptive immune system and neutralizing the proinflammatory bacterial molecules (Müller et al., 2005).

Lysozyme

Lysozyme is synthesized and secreted by Paneth cells, macrophages, neutrophils and epithelial cells (Mason & Taylor, 1975; Satoh et al., 1988). Its role and selectivity towards microbes are the same as in skin.

Lactoferrin

Lactoferrin (LF) exhibits a wide spectrum of antimicrobial and immunotropic properties (Artym et al., 2005). In contrast to caseins, LF is particularly resistant to proteolytic degradation in alimentary tract. LF is absorbed from the intestine by means of specific receptors located on brush border cells. Orally administered LF stimulates both local and systemic immune responses. It suppresses the growth of pathogenic bacteria, while promoting the multiplication of non-pathogenic *Lactobacillus sp.* and *Bifidobacterium sp.* (Artym et al., 2005). Studies on mice showed LF to be protective against bacteremia and endotoxemia. LF inhibits the activity of proinflammatory cytokines, nitric oxide and reactive forms of oxygen. Furthermore, LF promotes the differentiation of T and B cells from their immature precursors and increases the activity of NK and LAK (lymphokine activated killer) cells (Artym et al., 2005).

Phospholipase A2

The hydrophobic layer of phosphatidylcholine (PC) overlies and protects the surface of the gastrointestinal (GI) tract, contributing to barrier integrity. In addition, phospholipase A2 is synthesized by Paneth cells and this enzyme hydrolyses bacterial membrane phospholipids to generate both free fatty acids and lysophospholipids. An important prerequisite for the action of phospholipase A2 is the successful binding to the phospholipids surface. *In vitro* studies utilizing recombinant enzymes and artificial phospholipids substrates shown that phospholipases act on anionic phospholipids

(phosphatidylglycerol, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine), but are inactive with phosphatidylcholine due to the lack of high affinity binding (Wu et al., 2010). During critical illness such as sepsis, gut barrier integrity may be compromised, which could be related to degradation of PC. Pretreatment with an orally active sPLA(2) inhibitor blocks the LPS-induced increase in GI permeability, and may suggest a new approach to reinforce the GI mucosal barrier and prevent complications from endotoxin in trauma and other patients (Zayat et al., 2008).

Cathelicidins

Cathelicidin LL-37/hCAP18 is synthesized by neutrophils, where it was first identified (Romeo et al., 1988) and epithelial cells of the colon (Hase et al., 2002). *In vitro*, it has chemotactic properties for monocytes, macrophages and T cells (Koczulla et al., 2003). LL-37 is found in sites of inflammation where it modifies dendritic cells (DCs) differentiation, relying innate and adaptive immunity. *In vitro*, modified DCs had, among others characteristics induced by the peptide, enhanced secretion of Th-1 inducing cytokines and promoted Th1 responses (Davidson et al., 2004). LL-37 acts synergistically with IL-1-beta to increase the production of suppressive cytokines (IL-6 and IL-10) and chemokines MCP-1 and MCP-3 by macrophages (Yu et al., 2007). It acts *via* the transcription factor CREB and the activation of phosphorylation of the kinase Akt. In LPS-stimulated monocytes, LL-37 inhibits the release of TNF-alpha modulating inflammatory response induced by LPS, endotoxins and other agonists of TLRs (Mookherjee et al., 2006).

RNases

Angiogenin-4 (Ang-4) is a member of the ribonucleases family. This protein is synthesized by Paneth cells and is similar to RNase 7 found in skin. Its secretion is stimulated by exposure to LPS. Ang-4 kills *E. faecalis* or *L. monocytogenes* at concentrations as low as 1 μ M, whereas its concentration in crypts can be 1000 times greater (Hooper et al., 2003). Similarly to defensins, it is sensitive to salt concentration and is potentially cytotoxic to eukaryotic cells (Saxena et al., 1992).

C-type lectins

C-type lectins HIP/PAP are synthesized in human by enterocytes and Paneth cells. The same protein exists in mouse and is named RegIII gamma. These lectins bind Gram-positive peptidoglycan and act by direct killing. Several members of this family are found in gastrointestinal tissues (Dieckgraefe et al., 2002).

Defensins

As in skin, defensins have a direct antimicrobial role as well as immunomodulatory function. Alpha-defensins are synthesized by Paneth cell in the gastrointestinal tractus (Porter et al., 2002). Alpha-defensin expression does not require microbe induction since they are synthesized in germ-free conditions (Putsep et al., 2000) and/or prenatally (Mallow et al., 1996). In transfected mouse, it was shown that the alpha-defensin hBD-5 protects efficiently against *Salmonella typhimurium*, demonstrating the direct antimicrobial effect of this peptide. In mouse, alpha-defensins are named cryptdins and several families of peptides related to cryptdins are regrouped under the term CRS (Cryptdin Related Sequences). Interestingly, these CRS can form homo- or heterodimers, thus allowing a combinatorial diversity to struggle against pathogens (Hornef et al., 2004).

Beta-defensins are expressed in enterocytes of the small and large intestines. 28 beta-

defensin encoding genes have been identified in human genome, but only 8 were found to be expressed. hBD-1 is constitutively expressed in absence of stimulus or bacterial infection (O'Neil et al., 1999), while some nutrients can stimulate its production in cell lines (Sherman et al., 2006). In mouse, an infection by the *Cryptosporidium* parasite resulted in a down-regulation of mBD-1 (Zaalouk et al., 2004), while *in vitro*, sporozoites are killed by this defensin. Some authors conclude on an unique and important regulation of hBD-1, during small intestine infections (Dann et Eckmann, 2007). hBD-2 is not constitutively expressed, but is induced by an infection or by proinflammatory stimuli (O'Neil et al., 1999). hBD-3 and -4 are inducible and particularly expressed in crypt regions (Fahlgren et al., 2004). Defensins can also act as chemotactic agents for immune cells in a similar way to that described for the skin.

Bactericidal Permeability Increasing Protein

Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a constituent of primary neutrophil granules, is a potent natural antibiotic and anti-BPI antibodies are detected during infectious enteritis. In addition, BPI is a target antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis (Walmsley et al., 1997).

Neuropeptides

Enterochromaffin cells (EC) (Siddique et al., 2009) (Figure 1) are enteroendocrine cells present in the intestine, especially colon (Kuramoto et al., 2007) and containing large amounts of serotonin (5-HT). These cells can sense luminal content before its basolaterally release, and activate afferent neuron endings within *lamina propria*, allowing information exchange between gut and central nervous system (Hansen & Witte et al., 2008). Besides this important role, EC secrete also numerous others products, among which VIP (Zanner et al., 2004), Substance P (Heitz et al., 1976), CGA, CgB and secretogranin II/CgC (Cetin & Grube, 1991) and melatonin (Raikhlin et Kvetnoy, 1976). Despite the crucial role of these cells, their sparse repartition and their low number did not allowed their extensive study. However, the BON cells were proposed as a model (Kim et al., 2001), that will enhance further research. When EC were stimulated by odors, they released serotonin, showing that these cells can also be stimulated by spices and fragrances (Braun et al., 2007). Moreover, a new method was proposed allowing isolating and purifying EC from biopsies (Modlin et al., 2006).

1.4 Skin and antimicrobial peptides

Mammal skin is an essential defense barrier against external aggressions, such as microbial pathogens, oxidant stress, chemical aggressions, mechanical insults, burns etc. For a long time, skin was considered as a simple physical barrier, but it is in a process of continual regeneration and has its own immunological, histological and nervous responses to environment.

Skin is composed of three layers, from inside to outside (Figure 2): i) *hypodermis* or subcutaneous tissue, ii) *dermis*, or *corium*, with a 3 to 5 mm thickness, iii) *epidermis*, with a thickness varying from 0.06 to 0.8 mm. *Epidermis* can be subdivided itself into four layers : *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* and *stratum corneum* (Figure 2). The deeper layers are composed of keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells, Merkel cells and malpighian cells (Figure 2). *Epidermis* is composed as a gradient of differentiated keratinocytes, synthesizing keratine in *stratum granulosum*, and losing nuclei and organelles. Skin, and more specifically *stratum corneum*, acts as a barrier in several ways (Elias, 2007). Corneocytes and extracellular

matrix represent a physical barrier (“brick wall” model) (Figure 2).

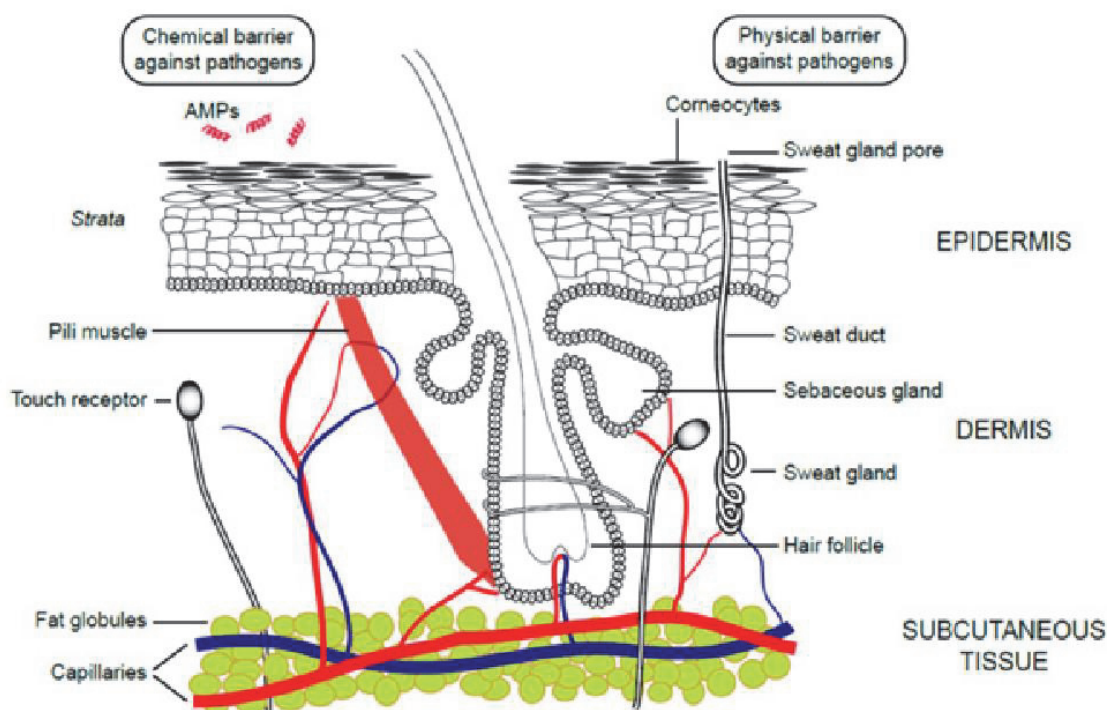


Fig. 2. Schematic representation of the different skin layers, adapted from different sources. A: Epidermis, dermis and subcutaneous tissues are shown with the different structures composing them. (According to Metz-Boutigue, M.H. et al., *Curr Pharm Des.* 2010; 16(9):1024-39).x

The slightly acidic surface (pH~ 5.0), as well as the low hydration level of the skin represents a hostile area for pathogens, such as *Staphylococcus aureus*. Lipids (ceramides, cholesterol, free fatty acids) and their metabolic products present in *stratum corneum* act also as antimicrobial defense. Last, constitutive (and/or inducible) expression of antimicrobial peptides and proteins helps to maintain skin integrity and to prevent pathogen colonization. On the contrary, the surface of healthy skin is ideal for the growth of the normal cutaneous microflora (*Micrococcacea*, i.e. *Staphylococcus epidermidis* and *Corynebacteriaceae*) that colonizes skin, competes with pathogens for nutrients and synthesizes antimicrobial compounds. These evolutionary conserved components of the innate immune system can act as direct antimicrobial agents and exert a role as immunomodulatory molecules in normal skin and during skin diseases, such as atopic dermatitis or psoriasis.

Lysozyme

Lysozyme is the first antimicrobial protein found in human skin. It was located in cytoplasm of epidermal cells in granular layers and in malpighian cells present in the *stratum spinosum* layer (Ogawa et al., 1971; Papini et al., 1982). Lysozyme is mainly active against Gram- positive bacteria (*S. aureus*), but is also active against Gram-negative bacteria, acting probably as a control of bacterial growth. Still recently, the contribution of lysozyme to cutaneous defense was subjected to debate since it was not detected in *stratum corneum* as well as in washing fluid. However, it was recently detected in skin wash of adults, and lysozyme concentration was 5 times higher in

newborn skin than in adult (Walker et al., 2008), confirming its status of antimicrobial molecule, as well as giving it an important role in preventing infections in newborn children.

Lactoferricin

Lactoferricin is an antimicrobial peptide originally produced by pepsin digestion of lactoferrin. It is active against Gram-positive, Gram-negative bacteria and also against *Candida albicans* (Bellamy et al., 1993). This molecule was also detected in skin wash of adult and newborn children (Walker et al., 2008). Synthesized by melanocytes, cutaneous lactoferrin is an iron-binding protein with antibacterial properties due to its ability to sequester iron in biological fluids or to destabilize bacterial membranes, limiting microorganism proliferation and adhesion. It has also immunomodulatory properties by up and down regulating immune cells involved in inflammatory processes (Legrand et al., 2005). The protective anti-inflammatory role of lactoferrin is due to its ability to bind free ferric ion acting as an anti-oxidant (Walker et al., 2008). It can bind to LPS and their receptors during an infection as well (Legrand et al., 2005). Expression of virulence factors of *S. aureus* is modulated by transferrin and lactoferrin (Kansal et al., 2005), demonstrating that these iron-binding proteins play an important role in the host-pathogen interaction in skin and in mucosal tissue probably by LPS or its receptors binding.

Dermcidin and its derived peptides

Dermcidin, is constitutively and specifically expressed in the eccrine sweat glands within the dermis of human skin, secreted into the sweat and transported *via* sweat to the epidermal surface (Schitteck et al., 2001). It is a 47 amino acids peptide produced from hydrolysis of a 9.3 kDa precursor by cathepsin D (Baechle et al., 2006). It possesses antibacterial properties at low concentration against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* and *C. albicans*. The *in vivo* importance of DCD in prevention of infections has been demonstrated by its low expression in patients with atopic dermatitis. It was shown that dermcidin induces the production by *S. aureus* of SepA, a proteolytic virulence factor that cleaves and inactivates dermcidin (Lai et al., 2007). In the eccrine sweat, several proteolytically generated DCD fragments (DCD-1, DCD-1L) have been identified. DCD-1L is the most abundant antimicrobial peptide present in sweat, but other peptides derived from dermcidin by proteolysis are also found (Baechle et al., 2006; Rieg et al., 2006). The distribution of these peptides was found to be different according to the individuals. Most of them have 2 to 4 of the major DCD-derived peptides with the constant presence of at least one of the following peptides: DCD-1L (63-110), LEK-45 (66-110) and SSL-29 (63-91). The authors also showed that the distribution of these peptides is dependent on the body sites, which correlates with the presence of eccrine sweat glands and not with apocrine glands. Body parts in contact with pathogens (arms, face etc.) produce high levels of DCD-derived peptides. The molecular analysis of the antimicrobial activity of dermcidin-derived peptides showed that peptides like DCD-1L or SSL-23 do not disrupt bacterial membranes, but kill bacteria by still unknown mechanisms (Steffen et al., 2006).

Recently, by using a proteomic approach, a dermcidin precursor was found in human cervico-vaginal fluid (Shaw et al., 2007), together with haptoglobin, neutrophil defensin, lysozyme and lactoferrin. Dermcidin precursor was also found in human gestational tissue (Lee Motoyama et al., 2007), where it is proposed to play a role in pregnancy by regulating trophoblastic functions.

Cathelicidin, LL-37, hCAP18

Cathelicidin is found in eccrine gland cells, but also released into circulation. The CAP18 precursor is produced in skin by keratinocytes and is processed within neutrophils, keratinocytes and mast cells by inflammation or injury. In circulation, the mature form is LL-37, after processing of CAP18 by neutrophil-derived elastase and proteinase-3, but other proteases can also produce KS-30 and RK-21, two peptides active against pathogenic bacteria. Cathelicidin expression is also regulated at the transcriptional level by bacterial LPS, cutaneous injury and pro-inflammatory mediators (IL-6, retinoic acid). The LL-37 is intensively studied and besides its wide antibacterial spectrum, it is considered as a mediator between innate and adaptive immunity (Kai-Larsen & Agerberth, 2008) and cell differentiation can also regulate its activity.

RNase A superfamily

Eight known functional RNase A ribonucleases genes are encoding small polypeptides of 15 kDa (Dyer & Rosenberg, 2006). Besides their well-documented ribonuclease activity, some of these proteins display unexpected antimicrobial activities unrelated to their primary function. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and eosinophil cationic peptide (ECP/RNase 3) are proteins secreted by eosinophilic leukocytes and were primarily tested for their toxic role against parasites. *In vitro*, ECP has also an activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Lehrer et al., 1989).

RNase A7 was identified as a major agent of the innate immune response of the skin acting on Gram-positive and Gram-negative bacteria and also on *C. albicans* (Harder & Schröder, 2002). RNase 7 transcripts were induced in keratinocyte culture by addition of TNF-alpha, interferon-gamma, interleukin-1 beta and in the presence of bacteria (Harder & Schröder, 2002). More recently, RNase 5 was added to the list of antimicrobial molecules present in skin (*stratum corneum*), and the same authors showed that skin proteases are involved in inhibition of RNases 5 and 7 (Abtin et al., 2009).

Psoriasin (S100A7)

Psoriasin belongs to the S100 family of calcium-binding proteins. This family is composed of 21 genes and 11 proteins that have been found to be expressed in human epidermis or in cultured keratinocytes. Langerhans cells and melanocytes (Boni et al., 1997; Broome et al., 2003) express S100B and Meissner's corpuscles (sensorial receptors localized in the upper part of dermis) express S100P (Del Valle et al., 1994). These proteins possess two EF hands (helix-loop-helix calcium binding domains) and they act probably as calcium sensors. Several functions have been proposed for S100 proteins in keratinocytes, the main role being an implication in skin inflammatory processes (Jinquan et al., 1996). Another role could be keratinocytes membrane remodeling, that occurs during differentiation: psoriasin and another member of the S100 family, calgranulin-A (S100A9), have been shown to have their expression correlated with the degree of keratinocyte differentiation, suggesting that they are involved in this process (Martinsson et al., 2005]. A third role could be an involvement in the formation of calcium channels, in conjunction with annexins. Other postulated roles concern S100 proteins as substrate for transglutaminase, resulting in an incorporation of S100 in the cornified envelope; a last role could be a response to exogenous agents that modulate S100 proteins distribution and consequently their function (Eckert et al., 2004). Psoriasin has been found to be overexpressed in psoriasis. It is produced in *stratum corneum* by keratinocytes (Martinsson et al., 2005) and its basal expression is influenced by extracellular calcium level. Its expression in normal

adult tissue is low, but high expression levels were detected in fetal skin, as for transferrin, suggesting a protective role in innate immunity. Psoriasin was found to be the main *E. coli*-cidal agent in the skin. It is a chemotactic agent for neutrophils and CD4⁺ T cells (Jinquan et al., 1996). Moreover, psoriasin mediates the production of several inflammatory cytokines and chemokines from neutrophils *via* MAPK p38 and ERK activation. It also induces reactive oxygen species production and the exocytosis of alpha-defensins from neutrophils (Zheng et al., 2008).

Defensins

To date 4 defensins (hBD-1 to -4) in neutrophils and 2 defensins (hBD-5 and hBD-6) produced by Paneth cells were identified. The first inducible human defensin, hBD-2, was identified in psoriatic lesions as the most abundant AMP. It was found to be expressed in terminally differentiated keratinocytes, in a structure located in *stratum corneum*, lamellar bodies that contain lipid-rich secretory granules. It is probably released with lipid-like content of these lamellar bodies (Oren et al., 2003). hBD-2 is also up-regulated locally by infections (Radek & Gallo, 2007) or wounds (Butmarc et al., 2004). It has preferential bactericidal properties against Gram-negative bacteria (Harder et al., 1997) and like LL-37, its effect is sensitive to the concentration of NaCl. hBD-2 derived from neutrophils, promotes prostaglandins production and histamine release from mast cells, playing a role in allergic response (Bals et al., 1998). hBD-2 has also chemotactic properties for immature dendritic cells and memory T cells; it was described to bind to CCR-6, the receptor for macrophage inflammatory protein 3 alpha. In monocytes, hBD-2 expression is stimulated by several cytokines (Ganz, 2003; Kanda & Watanabe, 2008) and Il-1 seems to be the major inducer of hBD-2 production. Bacteria can also stimulate the expression of hBD-2 by epithelial cells, in a cytokine-independent pathway. *P. aeruginosa* is a powerful inducer of hBD-2 by primary keratinocytes (Schroeder & Harder, 2006).

hBD-1 was considered as a constitutively expressed antimicrobial peptide and in particular not induced by proinflammatory cytokines. However, its production can be induced by peptidoglycan or LPS exposure (Sorensen et al., 2005). It is expressed in malpighian layer and in *stratum corneum* (Ali et al., 2001) and this expression is induced by increasing concentration of calcium (Harder et al., 2004), condition that provokes keratinocyte differentiation *in vitro* (Lichti et al., 2008). hBD-3 has its expression induced by EGF that provokes keratinocytes proliferation in skin wounds (Sorensen et al., 2006). It has chemotactic properties for monocytes (Garcia et al., 2001). While its expression is not induced by infection, hBD-3 displays a broad spectrum of antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as against fungi (Harder et al., 2001). Regarding the adaptive immune system, hBD-2, 3 and 4 stimulate expression of proinflammatory cytokines, IL-10 and MCP-1 (Niyonsaba et al., 2007). They also stimulate the phosphorylation of STAT-1 and STAT-3 that induce keratinocytes migration and proliferation.

Neuropeptides in skin immunity

It was reported that neuropeptides display antimicrobial activities, linking together nervous and immune system (Radek & Gallo, 2007; Sternberg, 2006). Both systems can influence each other: brain and peripheral nervous system directly influence the activity of innate and adaptive immune system. Immune system can relay signals to the nervous system *via* the production of growth factors and cytokines. For example, stress can induce alterations in the immune response (Webster et al. 2002), or can be elicited by infection or injury with release of neuropeptides (Brogden et al., 2005).

Exchange between both systems can occur at systemic, as well as at regional or local levels (Sternberg, 2006). The first, global level gathers sympathetic nervous system, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and circulating AMPs. The second, local level is composed of nervous endings, neuropeptide-releasing cells and receptors-exhibiting cells. At the skin level, important structures, such as Merkel cells (Lucarz & Brand, 2007) localized at the basement membrane, separating epidermis from dermis, are neuropeptide-producing cells, cutaneous nervous cells and target cells. Merkel cells have characteristics of both epidermal and neuroendocrine cells. They are connected to nervous system with terminal sensory synapses and dense-core granules contain CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), VIP (VasoIntestinal Peptide), and CGA (Chromogranin A)-derived peptides (Hartschuh et al., 1989a; Hartschuh et al., 1989b). Alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH), a 13 amino-acids peptide, is synthesized by keratinocytes, melanocytes, monocytes and astrocytes (Wikberg et al., 2000). This peptide derives from the pro-opiomelanocortin (POMC) after a processing by a proteolytic cascade (Pritchard & White, 2007), producing also five other peptides. Alpha-MSH acts as an AMP by inhibiting *S. aureus* and *C. albicans* growth at picomolar concentration (Cutuli et al., 2000). Interestingly, the tripeptide KPV (alpha-MSH 11-13) exhibited similar antimicrobial properties (Hiltz & Lipton, 1990; Mandrika et al., 2001; Mugridge et al., 1991), without effect on melanocytes (Sawyer et al. 1990). Alpha-MSH acts in two ways; it has a direct antimicrobial effect at very low concentration and reduces inflammatory responses associated with UV induced epithelial injury (Radek & Gallo, 2007).

2. Structural and biological properties of the antimicrobial peptides derived from chromogranins/secretogranins

2.1 Introduction

Chromogranins/secretogranins (CGs/SGs) constitute the granin family of genetically distinct acidic proteins present in secretory vesicles of nervous, endocrine and immune cells (Helle, 2004). The natural processing of bovine CGs is well described in granules of sympathoadrenal medullary chromaffin cells, where the resulting peptides are cosecreted with the catecholamines (Metz-Boutigue et al., 1993). The numerous cleavage sites are consistent with the specificity of prohormone convertases (PC1/3 and PC2) and carboxypeptidase E (CPE), that reside within chromaffin granules (Metz-Boutigue et al., 1993; Seidah & Chretien 1999). Secretogranin II (SgII), the third member of the chromogranin family is also processed to generate several natural fragments (Metz-Boutigue et al., 1993; Anouar et al., 1998; Marksteiner et al., 1993; Yajima et al., 2004). The discovery that pancreastatin, a chromogranin A (CGA)-derived peptide inhibits insulin secretion from pancreatic beta-cells, initiated the concept of prohormone (Eiden, 1987; tatemoto et al., 1986). The release of these CGs-derived peptides from chromaffin cells results from the nicotinic cholinergic stimulation and regulates several neuroendocrine functions (Helle & Serck-Hanssen, 1975).

Numerous cleavage products of the granins have been characterized, among which some display biological activities (Tatemoto et al., 1986; Aardal et al., 1993; Curry et al., 1992; Fasciotto et al., 1993; Lugardon et al., 2001; Mahata et al., 1997; Strub et al., 1996a,b). Neuroendocrine activities are reported from *in vivo* studies, with modulations of homeostatic processes, such as calcium regulation and glucose metabolism (Helle et al., 2007), cardiovascular functions (Brekke et al., 2002; Corti et al., 2004), gastrointestinal motility (Amato et al., 2005; Ghia et al., 2004a), nociception (Ghia et al., 2004b) tissue repair (Gasparri et al., 1997; Ratti et al., 2000), inflammatory responses (Ceconi et al., 2002; Corti et al., 2000) and as host defense agents during

infections (Radek et al., 2008). During the past decade, our laboratory has characterized new antimicrobial CGs-derived peptides (Strub et al., 1996a,b; Metz-Boutigue et al., 1998; Lugardon et al., 2000, 2001; Briolat et al., 2005; Helle et al., 2007) (Figure 3).

Peptide	Location	Sequence	Net charge
CGA			
VS-I	1-76	LPVNSPMNKGDTVEVMKC*IVEVISDTLSKPSMPVSKEC*FETLRGDERILSILRHQNLKELQDLALQAKERTHQQ	+3
NCA	4-40	NSPMKNKGDTVEVMKC*IVEVISDTLSKPSMPVSKEC*FE	-1
CHR	47-66	RILSILRHQNLKELQDLAL	+1.5
Chrom	173-194	<u>YPGPQAKEDSEGF</u> S QGPASREK	-1
CAT	344-364	RSMRLSFRARGYGFRGPGQLQ	+5
CCA	418-427	LEKVAHQLEE	-2
ProChrom	79-431	HSSYEDELSEVLEK.....	-37
CGB			
Chromb	564-626	SAEFPDFYDSEEQMSFQHTAENEENEKAGQGVLTETEEKELENLAAMDLELQKIAEKFSGTRRG	-12
SEC	614-626	QKIAEKFSGTRRG	+3
CGC			
RrF	131-138	RKLKHMRF	+4.5
Kvk	430-443	KVLSRLPYGPGRSK	+4

Fig. 3. The antimicrobial bovine CGs-derived peptides according to the sequence of CGA (P05059), CGB (P23389) and CGC ((P20616). For each antimicrobial peptide the sequence, the location and net charge are indicated. *, cysteine residues of the disulfide bridge; phosphorylated residue are underlined and the glycosylated residue is in bold.

They act at micromolar range against bacteria, fungi, yeasts and are non-toxic for mammalian cells. They are recovered in biological fluids involved in defense mechanisms (serum, saliva) and in secretions of stimulated human neutrophils (Briolat et al., 2005; Lugardon et al., 2000). These new AMPs are integrated in the concept that highlights the key role of the adrenal medulla in the immunity (Sternberg, 2006) as previously reported for adrenaline and neuropeptide Y that regulate immunity systemically once released from the adrenal medulla. Furthermore, the adrenal medulla contains and releases large amounts of IL-6 and TNF-alpha in response to pro-inflammatory stimuli such as LPS, IL-1 alpha and IL-1 beta (Metz-Boutigue et al., 1998). The discovery of the presence of TLRs on the adrenal cortex cells raises the interesting possibility that the adrenal gland might have a direct role in the response to pathogens, activation of innate immune response and clearing of infectious agents (Sternberg, 2006).

2.2 Antimicrobial peptides derived from chromogranin A

Several new antimicrobial peptides isolated from the granules of chromaffin cells of the bovine adrenal medulla correspond to CGA-derived peptides (Figure 3). The corresponding sequences are highly conserved in human. Interestingly, the main cleavage site in position 78-79 of bCGA and the subsequent remove of the two basic residues K77 and K78 by the carboxipeptidase H (Metz-Boutigue et al., 1993) produces two antimicrobial fragments: vasostatin-I (VS-I; bCGA1-76) (Lugardon et al., 2000) and prochromacin (Prochrom; bCGA79-431) (Strub et al., 1996b). For these N- and C-terminal domains with antimicrobial activities several shorter active fragments were identified: for VS-I, bCGA1-40 (N CGA; NCA) (Shooshtarizadeh et al., 2010), bCGA47-66 (chromofungin; CHR) and for ProChrom, bCGA173-194 (Chromacin;

Chrom) (Strub et al., 1996b) and bCGA344-364 (Catestatin; CAT) (Shooshtarizadeh et al., 2010). The unique disulfide bridge of bCGA is present in VS-I and NCA sequences. Two post-translational modifications are important for the expression of the antibacterial activity of Chrom: the phosphorylation of Y173 and the O-glycosylation of S186 [130] (Strub et al., 1996a). Furthermore, it is important to point out that a dimerization motif GXXXG similar to that reported for Glycophorin A (Brosig & Langosch, 1998) is present in the Chrom sequence (G184-G188).

Vasostatin-I

Vasostatin-I (VS-I) displays antimicrobial activity against (i) Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* and *Bacillus megaterium*) with a minimal inhibitory concentration (MIC) in the range 0.1-1 μ M; (ii) against filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria brassicola*, *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*) with a MIC of 0.5-3 μ M and (iii) against yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) with a MIC of 2 μ M (Lugardon et al., 2000). However VS-I is unable to inhibit the growth of *Escherichia coli* SBS363 and *Escherichia coli* D22. VS-I (Figure 3) possesses structural features specific for antimicrobial peptides, such as a global positive charge (+3), an equilibrated number of polar and hydrophobic residues (20:23) and the presence of a helical region CGA40-65 characterized to be a calmodulin-binding sequence (Lugardon et al., 2001; Yoo, 1992). The loss of the antibacterial activity of CGA7-57 suggests that the N- and C-terminal sequences are essential, nevertheless CGA7-57 is less efficient than VS-I against fungi. Besides, the disulfide bridge is essential for the antibacterial, but not the antifungal property. Altogether, these data suggest that antibacterial and antifungal activities of VS-I have different structural requirements (Lugardon et al., 2001). Interestingly, two helix-helix dimerization motifs important for the interaction with membranes such as LxxxxxxL, present in DAT and dopamine transporter sequences (Torres et al., 2003) are present in the bovine and human VS-I sequences (L42-L49; L57-L64). Surface interaction of rhodamine-labelled bCGA1-40 was demonstrated using confocal microscopy after incubation of the labeled peptide with *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria brassicola* and *Neurospora crassa* (Blois et al., 2006). In addition, the interaction of bCGA1-40 with monolayers of phospholipids and sterols, as models for the interaction with mammalian and fungal membranes was investigated by the surface tension technique (Blois et al., 2006; Maget-Dana et al., 1999). These studies demonstrated that the N-terminal bCGA1-40 fragment interacts with model membrane phospholipids in a manner consistent with an amphiphilic penetration into membranes in a concentration range relevant for biological activity in mammalian tissue (Blois et al., 2006).

Chromofungin

When VS-I was treated with the endoprotease Glu-C from *Staphylococcus aureus*, one of the generated peptide, chromofungin (CHR), is the shortest active VS-I-derived peptide with antimicrobial activities (Figure 3). It is well conserved during evolution and displays antifungal activity at 2-15 μ M against filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria brassicola*, *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*) and yeast cells (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida neoformans*) (Lugardon et al., 2001). Since this peptide was generated after digestion of the material present in chromaffin secretory vesicles by the endoprotease Glu-C from *S. aureus*, it may be hypothesized that it is produced during infections by this class of pathogens.

The 3-D structure of CHR has been determined in water-trifluoroethanol (50:50) by using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. This analysis revealed the amphipathic helical structure of the sequence 53-56, whereas the segment 48-52 confers hydrophobic character (Lugardon et al., 2001). The importance of the amphipathic sequence for antifungal activity was demonstrated by the loss of such activity against *N. crassa* when two proline residues were substituted for L61 and L64, disrupting the helical structure, the amphipathic character and the dimerization motif helix-helix L57-L64 (Lugardon et al., 2001).

Catestatin

Two CGA-derived fragments bCGA333-364 and bCGA343-362 were characterized after the extensive processing of bCGA by prohormone convertases (PC 1/3 or 2) in chromaffin granules (Taylor et al., 2000). More recently, it was shown that cathepsin L colocalizes with CGA in chromaffin granules. *In vitro* it is able to generate after digestion of recombinant hCGA, a catestatin (CAT)-derived fragment hCGA360-373 (Biswas et al., 2009). In addition to the inhibitory effect of CAT on catecholamine release from chromaffin cells (Mahata et al., 1997), we have shown for this peptide and its shorter active sequence bCGA344-358 (cateslytin, CTL), (Figure 3) a potent antimicrobial activity with a MIC in the low-38 micromolar range against Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* at concentration of 0.8 μM), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* D22 at concentration of 8 μM), filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Nectria haematococca* at concentration of 0.2-10 μM) and yeasts (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida neoformans* at concentration of 1.2-8 μM). The sequence of CAT (Figure 3) has been highly conserved during evolution (Briolat et al., 2005). The two human variants P370L and G364S display antibacterial activity against *M. luteus* with a MIC of 2 and 1 μM , respectively, and against *E. coli* with a MIC of 20 and 10 μM , respectively (Briolat et al., 2005). However, the most active peptide corresponds to the bovine sequence. Bovine CTL, a cationic sequence with a global net charge of +5 (R344, R347, R351, R353, R358) and five hydrophobic residues (M346, L348, F360, Y355, F357) (Figure 3), is able to completely kill bacteria at concentration lower than 10 μM even in the presence of NaCl (0-150 mM) (Briolat et al., 2005). The C-terminal sequence bCGA352-358 is inactive, whereas the N-terminal sequences bCGA344-351 and bCGA 348-358 are antibacterial at 20 μM .

C-terminal CGA-derived fragment

CCA, the C-terminal CGA-derived fragment bCGA418-427 (Figure 3), with a remarkable net charge of -2, displays antifungal activity and belongs to the less abundant anionic AMPs family. It is well conserved during evolution and is homologous to the C-terminal sequence of CGB and the antibacterial peptide SEC (secretolytin) [(Strub et al., 1996b). This peptide was generated *in vitro* after digestion, by the protease Glu-C from *S. aureus*, of the material present in chromaffin secretory vesicles. As previously postulated for CHR, CCA could be generated during infections induced by this pathogen.

2.3 Antimicrobial peptides derived from bovine chromogranin B

To date, the natural C-terminal fragment of bovine CGB (CCB; bCGB 564-626), isolated from chromaffin granules of the adrenal medulla, was found to display antibacterial activity against both *M. luteus* and *E. coli*. The complete inhibition of bacterial growth was observed at a concentration around 1.8 μM (Strub et al., 1996b).

This large fragment contains the natural short antibacterial peptide secretolytin (SEC, bCGB614-626) with a net positive charge (+3) (Figure 3). We observed the natural formation of a pyrrolidone glutamic acid at the N-terminal end of SEC and both forms displayed antibacterial activity against *M. luteus*, reaching 100% of growth inhibition at 2 μ M (Strub et al., 1996ab). A structure-activity analysis suggests that an alpha-helical amphipathic structure common to SEC and cecropins may account for the antibacterial activity (Strub et al., 1996b).

2.4 Antimicrobial peptides derived from bovine secretogranin II

Because bSGII is weakly expressed in the intragranular matrix of chromaffin secretory vesicles (2% of total proteins), the detection of endogenous AMPs by classical methods was unsuccessful. After *in-silico* analysis, two synthetic peptides with cationic amphipathic sequences were prepared: Rrf and Kvk, which correspond to the sequences bSGII131-138 and bSGII430-443 with respective net charges of +4.5 and 4 (Figure 3). Rrf, completely inhibits the bacterial growth of *M. luteus* and *B. megaterium* with a MIC of 5 and 15 μ M, respectively, and Kvk displays antifungal properties at 19 μ M against *N. crassa* (Shooshtarizadeh et al., 2010).

3. Interaction of antimicrobial chromogranins-derived peptides with bacterial proteases

The AMPs avoidance mechanisms deployed by bacteria include the proteolytic degradation of the active forms by the bacterial proteases. In order to examine the effects of bacterial proteases on the isolated AMPs derived from CGs, we have tested the effects of *Staphylococcus aureus* V8 protease Glu-C and several supernatants from *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella sonnei* and *Vibrio cholera*. By using biochemical methods we have analyzed the degradation of the peptide in presence of bacteria.

Interaction of antimicrobial CGs-derived peptides with proteases from diarrheogenic bacteria

Bacteria were isolated from patients of the Strasbourg Civil Hospital by the Bacteriology Institute, University of Strasbourg, (EA-4438). The four strains have a clinical interest because apart from inducing diarrhea, they may cause other infections. Thus, *Klebsiella* was involved in the occurrence of post-antibiotic diarrheas (Gorkiewicz 2009). Many studies show that *Klebsiella oxytoca* is also involved in nosocomial infections for newborns or adults (Biran et al., 2010) *Klebsiella* infections may also be commensal (Tsakris et al., 2011). *Klebsiella oxytoca* has also been associated with hemorrhagic colitis (Hoffmann et al., 2010) and intercurrent colitis in Crohn's disease (Plessier et al. 2002). *Salmonella* destroys infected cells and the infection continues through blood (sepsis) or through lymphatic vessel (typhoid fever). *Salmonella* cause also gastrointestinal infections. *Shigella sonnei* and *Vibrio cholera* non O1 cause inflammation of the intestinal mucosa by producing the Shiga toxin. *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholera* develop phenomena of antibiotic resistance. Thus, *Salmonella* was reported to be resistant for the action of Ciprofloxacin (Medalla et al., 2011) and Ceftriaxone (Su et al., 2011). Concerning CGA, we have tested bovine, rat and human CAT corresponding to the sequences bCGA344-364, rCGA6344-364 and hCGA352-372, bovine CTL located at bCGA344-358, two short fragments hCGA360-372 and the conserved tetrapeptide LFR (bCGA348-351). In addition, we have tested a scrambled peptide relative to the sequence of bovine CAT and the procatenastatin fragment bCGA332-364. We have found

antimicrobial activities only for the bovine CAT and CTL, showing that CTL is the shorter active fragment and that it corresponds to the active domain of CAT. Procatestatin was inactive in similar experimental conditions. Bovine CAT and CTL were active against *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* and *Vibrio cholera* at 100 μM and 50 μM respectively and against *Shigella Sonnei* at 50 μM and 25 μM . In addition, CHR and the C-terminal fragment (CGA387-431) were inactive for concentration up to 100 μM . In contrast, CTL is active at 30 μM against the four pathogens. Three CgB-derived peptides (CgB58-62, CgB279-291, and CgB547-560) and secretoneurin corresponding to SgII189-254 were examined against the four strains in order to analyse their degradation by bacterial proteases. By using HPLC we have compared the profiles of the peptide alone and the peptide with the inoculated buffer. These experiments show that except CTL all the peptides are completely degraded by the bacteria. To illustrate these data, we present on Figure 4, the profiles relative to CAT and CTL in presence of buffer with *Salmonella enterica*. The complete peptide and the processed form are analysed by sequencing and mass spectrometry (MALDI-TOF).

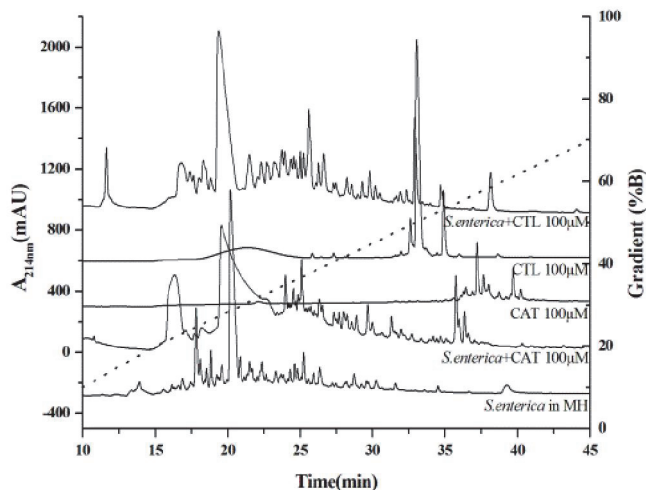


Fig. 4. Analysis by HPLC of the catestatin (CAT) and cateslytin (CTL) degradation by *Salmonella enterica*. The HPLC system is composed by a Dionex chromatogram, Germerong, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 μm , porosity 300Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 $\mu\text{L min}^{-1}$ using the gradient indicated on the chromatogram.

3.1 Interaction of antimicrobial Cgs-derived peptides with proteases from *Staphylococcus aureus*

After incubation with *S. aureus* V8 protease Glu-C of the proteic intragranular material of chromaffin cells present in the adrenal medulla, 21 new peptides were isolated by HPLC and analysed by sequencing and mass spectrometry. These peptides were tested against Gram positive bacteria (*Micrococcus luteus* and *S. aureus*), Gram negative bacteria (*Escherichia coli*), fungi (*Neurospora crassa*) and yeast (*Candida albicans*). They are not antibacterial but 5

peptides corresponding to CGA47-60, CGA418-426 and CgB 279-291, CgB 450-464 and

CgB470-486 display antifungal activity at the micromolar range against *N. crassa*.

Thus, *S. aureus* subverts innate immunity to degrade the antibacterial Cgs/Sgs-derived peptides and produce new antifungal peptides (manuscript in preparation). Four antimicrobial CGA derived peptides (CHR CGA47-66, bovine CAT CGA344-364, human CGA352-372 and CTL CGA344-358) were incubated in presence of staphylococcal supernatants from S1 (a Methicillin resistant strain) and S2 (a non-resistant strain). CTL, the active domain of CAT, is able to completely kill *S. aureus* at 30 μ M, but the two others peptides are inactive. By using a proteomic analysis (HPLC, sequencing and mass spectrometry) we demonstrated that CHR and CTL were not degraded by supernatants, whereas bovine and human CAT are processed to produce several fragments (Figure 5).

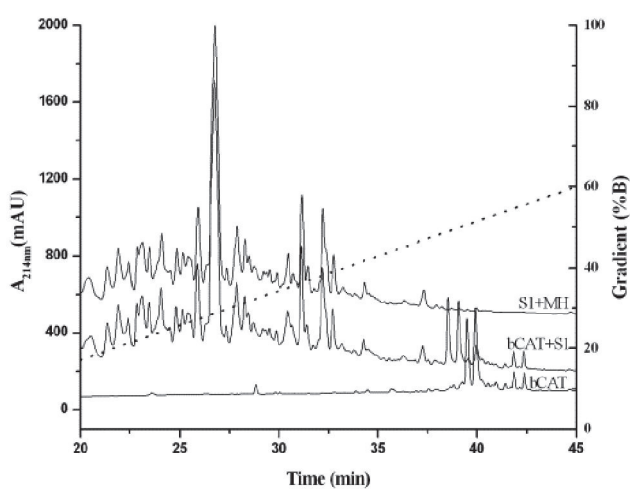


Fig. 5. Analysis by HPLC of the catestatin (CAT) degradation by a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The HPLC system is composed by a Dionex chromatograph, (Germerong, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 μ m, porosity 300 Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 μ L min⁻¹ using the gradient indicated on the chromatogram.

4. Synergy of the combination of antimicrobial peptides with antibiotics

The emergence of multi-drug resistance bacteria (MDR), with therapeutic failure against *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* have paved the way to develop new therapeutic agents by the help of the synergism. In addition the highly toxic effects of antibiotics have shifted the research focus to discover new peptides with broad spectrum of activity and less toxicity. Synergy is the combined activity of two antimicrobial agents that can never be attained by any one of them singly (Serra et al., 1977). Numerous AMPs demonstrate broad spectrum of activity against pathogens, interacting directly with membranes or acting with a specific mode. They represent interesting candidates to synergistically act with antibiotics.

4.1 For *Staphylococcus aureus* MRSA

Most of the patients can prone to serious bacterial infections caused mainly by the multi-resistant microorganisms, *Staphylococcus aureus* coagulase negative spp are one

of them. These coagulase negative strains (MRSA) have got approximately 90% of methicillin resistance due to β -lactam resistance (Silva et al., 2011). Story just not stopped here, but still it continues, some of the staphylococcal strains got resistance to the other drugs such as Vancomycin, which was previously widely used against the MRSA infections, and to treat infections of central nervous system, bone infections and sometimes for the pulmonary infections which require a more concentrations to get treated (Dehority, 2010). *S. aureus* have also developed resistance to the Vancomycin due to the use at low level concentrations and recently, *S. aureus* was isolated that had got the *VanA* gene from the *Enterococcus spp* (Sievert et al., 2008) which leads to drug resistance.

In our group, we have examined the synergically effects of three CGA-derived peptides (CAT, CTL and CHR) with Minocyclin, Amoxicillin and Linezolid. To demonstrate that antimicrobial peptides are able to reduce the doses of antibiotics used and to potentiate the activity of antibiotics, antimicrobial tests were carried out by combining the antibiotic peptides at doses below the MIC. The comparison was made with the antibiotic or peptide separately at the same doses.

Minocyclin has a MIC of 2 $\mu\text{g/ml}$ alone against the *S. aureus* ATCC 49775, but when it was combined with CTL at a concentration corresponding to 75% of the MIC, the concentration of Minocycline was lowered to 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Similar data were obtained by the use of the two others peptides (Figure 6). Thus we demonstrate that amidated bCTL acts synergistically with Minocycline against *S. aureus*. In addition CTL acts synergistically with Voriconazole against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.

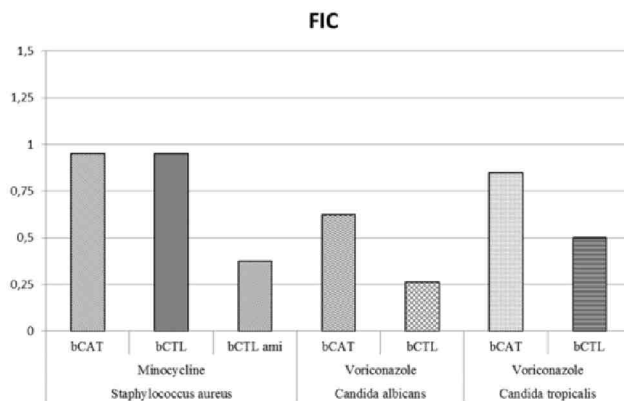


Fig. 6. Fractional inhibitory concentration (FIC) of the chromogranin derived peptides combined with the antimicrobials (Minocycline against the *Staphylococcus aureus* and Voriconazole against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*). FIC in range of ≤ 0.5 gives a synergistic effect, $\leq 0.5 - < 2$ is an additive effect but if more than 2 have an antagonistic effect.

4.2 From *Shigella*

Some of the strains of *Shigella* got resistance to antibiotics. A 9-year study of shigellosis in

Malaysia, show that 58.4% of the studied strains were resistant to tetracyclin and 53.8% to trimetropin-sulfamethoxazol (Banga Singh et al., 2011). In China, another study establish for *Shigella* the resistance to aztreonam (30,8%), ampicillin (92,3%), piperacilline (61,5%), ceftazidime (30,8%), cefotaxime (30,8%), gentamicine (53,8%) (Zhang et al., 2011). Furthermore, *Vibrio cholera* was also described to develop several resistances against antibiotics (Lamrani et al., 2010).

In conclusion these studies show that CGA-derived AMPs potentiate the effects of

antibiotic drugs. One could imagine a mechanism in which the peptide would favor the destabilization of the membrane allowing the antibiotic to rapidly penetrate inside the bacterial cells and thus to reach its site of action.

5. Chromogranin A, a new marker of severity

In clinical practice, CGA has been used as a marker of pheochromocytomas (O'Connor et al., 1984), carcinoid tumors (O'Connor & Deftos, 1986; Syversen et al., 1993), neuroblastomas (Hsiao et al., 1990), neuroendocrine tumors (Berruti et al., 2005), and neurodegenerative diseases (Rangon et al., 2003). Recent data have shown CGA to be a useful prognostic indicator in patients with chronic heart failure (Ommand et al., 2003), suggesting that CGA may have some association with cardiovascular diseases. Furthermore, a pilot study has shown CGA to be a predictor of mortality in patients with acute myocardial infarction (Estensen et al., 2006). Characterization of the severity of organ failures and prediction of patient outcome are of major importance for physicians who care for critically ill patients. Multiple organ failure (MOF) remains the main problem in intensive care because of its impact on morbidity, mortality, and resources (Baue et al., 1998). MOF can develop as a consequence of multiple causes, such as infection, systemic inflammatory response syndrome (SIRS), myocardial infarction, septic shock, leading to the activation of various endogenous cascades, cellular dysfunction and death (Baue et al., 1998). In a recent study we have evaluated whether unselected critically ill patients at ICU (Haute-pierre Hospital, Strasbourg, France) admission demonstrate increased plasma CGA concentrations and whether CGA can be of any interest in the care of patients at high risk of death. Patients older than 18 years were recruited consecutively over 3 months during 2007. Exclusion criteria included: duration of stay >24 h and conditions known to increase CGA concentrations independently of acute stress [i.e., a history of documented neuroendocrine tumors (O'Connor & Deftos, 1986) or chronic treatment with proton pump inhibitors before admission (Giusti et al., 2004)]. Patients who required surgical interventions were also excluded. Of the 120 participants included in the study, 70 patients had a primary diagnosis severe infection, and 50 had a SIRS. Serum CGA concentrations were measured with a commercial sandwich RIA kit (a gift of Cisbio Bioassays, Marcoule, France). In the central 95% of the healthy population, serum CGA concentrations range from 19 µg/L to 98 µg/L. In neuroendocrine system tumors, the CGA serum concentration varies from the typical range up to 1200 µg/L, depending on the biological and structural characteristics of the tumor, as well as on the extent of tumor spread (Degorce et al., 1999). As a control Prolactin (PCT) concentrations were measured on the Kryptor system (Brahms Diagnostic) with the time-36 resolved amplified cryptate emission methodology in accordance with the manufacturer's recommendations. The Simplified Acute Physiological Score II (SAPS II) and the Logistic Organ Dysfunction System (LODS) score were calculated at admission according to published standards (Levy et al., 2003; Le Gall et al., 1993). Our data show that CGA concentration was positively but weakly correlated with age, PCT concentration, creatinine concentration, SAPS II, and LODS score ($P < 0.001$ for all variables) and was correlated with CRP concentration (Zhang et al., 2008). Thirty-three deaths occurred during the median follow-up time of 23 days. The death rates for CGA and PCT are shown by quartiles in Figure 7. Statistical analysis revealed a significant difference in death rates between CGA quartile 4 and CGA quartiles 1, 2, and 3 ($P < 0.001$, log-rank test). The death rate for CGA quartile 3 was also significantly different from that of CGA quartile 1 ($P = 0.033$).

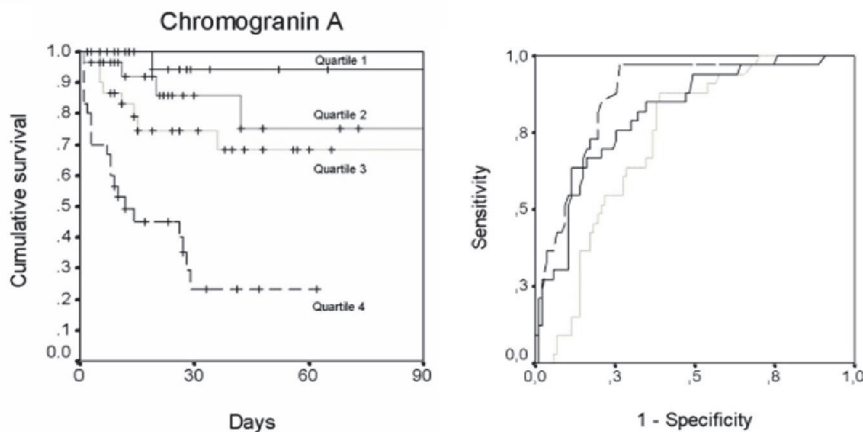


Fig. 7. Kaplan–Meier analysis: cumulative incidence of death by CGA and PCT quartiles.

(A), Median (interquartile range) for CGA concentration data: quartile 1, 35 $\mu\text{g/L}$ (30–53 $\mu\text{g/L}$); quartile 2, 84 $\mu\text{g/L}$ (77–94 $\mu\text{g/L}$); quartile 3, 174 $\mu\text{g/L}$ (151–197 $\mu\text{g/L}$); quartile 4, 563 $\mu\text{g/L}$ (355–974 $\mu\text{g/L}$). Each quartile includes 30 patients. (B), ROC curve to test the ability of CGA (black line), SAPS II (black dashed line), and PCT (gray dashed line) to predict outcome. ROC curves for CGA, PCT, and SAPS II are shown in Figure 7. To assess the best positive likelihood ratio, we chose the cutoff value that was associated with the best specificity. For CGA, we chose a cutoff value of 255 $\mu\text{g/L}$, which produced a sensitivity of 0.63 and a specificity of 0.89 (positive likelihood ratio, 5.73; negative likelihood ratio, 0.42; AUC, 0.82). A cutoff value of 65 for SAPS II produced a sensitivity of 0.61 and a specificity of 0.85 (positive likelihood ratio, 4.07; negative likelihood ratio, 0.46; AUC, 0.87). For a PCT cutoff value of 4.82 $\mu\text{g/L}$, sensitivity and specificity were 0.60 and 0.71, respectively (positive likelihood ratio, 2.07; negative likelihood ratio, 0.56; AUC, 0.73). To conclude, in this clinical study of critically ill nonsurgical patients, we demonstrate that plasma CGA is a strong and independent prognostic in consecutive critically ill nonsurgical patients. The over expression of complete CGA suggests that for these patients the processing machinery to produce antimicrobial peptides is not correct.

6. Insertion of synthetic antimicrobial chromogranins-derived peptides in biomaterials

The surface of medical devices is a common site of bacterial and fungal adhesion, first step to the constitution of a resistant biofilm leading frequently to chronic infections. In order to prevent such complications, several physical and chemical modifications of the device surface have been proposed. In a previous study, we experimented a new type of topical antifungal coating using the layer-by-layer technique. The nanometric multilayer film obtained by this technique is functionalized by the insertion of a CGA-derived antifungal peptide (CGA 47-66, Chromofungin). We show that the embedded peptide keeps its antifungal activity by interacting with the fungal membrane and penetrating into the cell. *In vitro* studies demonstrated that such an antifungal coating is able to inhibit the growth of yeast *Candida albicans* by 65% and completely stop the proliferation of filamentous fungus *N.crassa*. The cytotoxicity of such a coating was also assessed by growing human gingival fibroblasts at its surface. Finally, the antifungal coating of poly (methylmethacrylate), a widely used material for biomedical devices, is successfully tested in an *in vivo* oral candidiasis rat model (Etienne et al.,

2005).

7. Conclusions

CGs family emerges as prohormones able to modulate homeostatic processes in response to excessive stimulations such as microbial infections. The studies concerning the expression of CGs and their antimicrobial peptides in patients with inflammatory diseases and the correlation with the proteolytic processes occurring in these pathologies vs. controls are crucial to understand the involvement of these prohormones and their derived peptides in innate and adaptive immunities. Calcium is a universal secondary messenger involved in many cellular signal transduction pathways, regulating crucial functions such as secretion, cell motility, proliferation and cell death. The calcium-dependent immunomodulatory properties of CHR and CAT are important for the understanding of their involvement in inflammatory mechanisms. In sum, these linear peptides may represent prototypic lead molecules useful for the development of new therapeutic agents and also biomaterials.

8. Acknowledgement

This study was funded by INSERM, the University of Strasbourg (UDS) and INRA (JFC). We are grateful to financial assistance from the Odontology Faculty of the University of Strasbourg (MA, RA). We thank Charlotte Bach for the excellent technical assistance, Bernard Guérolde for the preparation of the synthetic peptides, Thomas Lavaux for fruitful discussions, Cisbio Bioassays Research and Development for providing the ELISA kit required for CGA dosages, EA44-38 for the isolation of bacteria and the preparation of bacterial supernatants and Martine Rivet for the preparation of the manuscript.

9. References

- Aardal, S., Helle, K.B., Elsayed, S., Reed, R.K. & Serck-Hanssen, G. (1993). Vasostatin, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 5, No. 4, (August 1993), pp. 405-412, ISSN: 0953-8194.
- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schroder, J.M. & Tschachler, E. (2009). Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 129, No. 9, (March 2009), pp. 2193-2201, ISSN: 0022-202X.
- Aerts A.M., François, I.E., Cammue, B.P. & Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Science*, Vol. 65, No. 12, (July 2008), pp. 2069-2079, ISSN: 1420-682X.
- Ali, R.S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C.E., Cerio, R. & Quinn, A.G. (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 117, No. 1, (July 2001), pp.106-111, ISSN: 0022-202X.
- Amato, A., Corti, A., Serio, R. & Mule, F. (2005). Inhibitory influence of chromogranin A N-terminal fragment (vasostatin-1) on the spontaneous contractions of rat proximal colon. *Regulatory Peptides*, Vol. 130, No.1-2, (August 2005), pp. 42-47, ISSN: 0167-0115.

- Anouar, Y., Yon, L., Desmoucelles, C., Leprince, J., Breault, L., Gallo-Payet, N. & Vaudry, H. (1998). Identification of a novel secretogranin II-derived peptide in the adult and fetal human adrenal gland. *Endocrinology Research* Vol. 24, No. 3-4, (August-November 1998), pp. 731-736, ISSN: 0743-5800.
- Artym, J., Zimecki, M., Kuryszko, J. & Kruzel, M.L. (2005). Lactoferrin accelerates reconstitution of the humoral and cellular immune response during chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant in mice. *Stem Cells Development*, Vol. 14, No.5, (October 2005), pp. 548-555, ISSN: 1547-3287.
- Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schittek, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G.A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C.A. & Kalbacher H. (2006). Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, No.9, (March 2006), pp. 5406-5415, ISSN: 0021-9258.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M. & Wilson, J.M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, No. 16, (August 1998), pp. 9541-9546, ISSN: 0027-8424.
- Banga Singh, K.K., Ojha, S.C., Deris, Z.Z., & Rahman, R.A. (2011). A 9-year study of shigellosis in Northeast Malaysia: Antimicrobial susceptibility and shifting species dominance, *Journal of Public Health*, Vol. 19, No. 3, (June 2011), pp. 231-236, ISSN: 1613-2238.
- Baue, A.E., Durham, R. & Faist, E. (1998). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*, Vol. 10, No. 2, (August 1998), pp. 79-89, ISSN: 1073-2322.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. & Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, Vol. 182, No .2, (May 1993), pp. 97-105, ISSN: 0300-8584.
- Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, Russo L, Cracco C, Bollito E, Scarpa RM, Angeli A, Dogliotti L. (2005). Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. *Endocrine Related Cancer*, Vol. 12, No. 1, (March 2005), pp.109-117, ISSN: 1351-0088.
- Biran, V., Gaudin, A., Mariani-Kurdjian, P., Doit, C., Bingen, E. & Aujard, Y. (2010). Implication of extended-spectrum beta-lactamase enterobacteriaceae in nosocomial infections in neonates]. *Archives de Pédiatrie*, Vol. 17 Suppl 4, (September 2010), pp. S150-153, ISSN: 0929-693X.
- Biswas, N., Rodriguez-Flores, J.L., Courel, M., Gayen, J., Vaingankar, S.M., Mahata, M., Torpey, J.W., Taupenot, L., O'Connor, D.T. & Mahata, S.K. (2009). Cathepsin L colocalizes with chromogranin A in chromaffin vesicles to generate active peptides. *Endocrinology*, Vol. 150, No. 8, (August 2009), pp. 3547-3557, ISSN: 0013-7227.
- Blois, A., Holmsen, H., Martino, G., Corti, A., Metz-Boutigue, M.H. & Helle, K.B. (2006). Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine.

- Regulatory Peptides*, Vol. 134, No. 1, (March 2006), pp. 30-37, ISSN: 0167-0115.
- Boni, R., Burg G., Doguoglu, A., Ilg, E.C., Schafer, B.W., Mülle, B. & Heizmann, C.W. (1997). Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *The British Journal of Dermatology*, Vol. 137, No. 1, (July 1997) pp. 39-43, ISSN: 0007-0963.
- Braun, T., Volland, P., Kunz, L., Prinz, C. & Gratzl, M. (2007). Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology*, Vol. 132, No. 5, (May 2007), pp. 1890-1901, ISSN: 0016-5085.
- Brekke, J.F., Osol, G.J. & Helle KB. (2002). N-terminal chromogranin-derived peptides as dilators of bovine coronary resistance arteries. *Regulatory Peptides*, Vol. 105, No. 2, (May 2002), pp. 93-100, ISSN: 0167-0115.
- Briolat, J., Wu, S.D., Mahata, S.K., Gonthier, B., Bagnard, D., Chasserot-Golaz, S., Helle, K.B., Aunis D & Metz-Boutigue MH. (2005). New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cellular and Molecular Life Science*, Vol. 62, No. 3, (February 2005), pp. 377-385, ISSN: 1420-682X.
- Broome, A.M., Ryan, D. & Eckert, R.L. (2003). S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 51, No. 5, (May 2003), pp. 675-685, ISSN: 0022-1554.
- Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, Vol. 198, (April 2004), pp. 169-184, ISSN: 0105-2896.
- Butmarc, J., Yufit, T., Carson, P. & Falanga, V. (2004). Human beta-defensin-2 expression is increased in chronic wounds. *Wound repair and regeneration*, Vol. 12, No. 4, (July August 2004), pp. 439-443, ISSN: 1067-1927.
- Ceconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G; & Corti A. (2002). Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *European heart journal*, Vol. 23, No. 12, (June 2002), pp. 967-974, ISSN: 0195-668X.
- Cetin, Y. & Grube, D. (1991). Immunoreactivities for chromogranin A and B, and secretogranin II in the guinea pig entero-endocrine system: cellular distributions and intercellular heterogeneities. *Cell and tissue research*, Vol. 264, No. 2, (May 1991), pp. 231-241, ISSN: 0302-766X.
- Corti, A., Ferrari, R. & Ceconi, C. (2000). Chromogranin A and tumor necrosis factor-alpha (TNF) in chronic heart failure. *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 482, pp. 351-359, ISSN: 0065-2598.
- Corti, A., Mannarino, C., Mazza, R., Angelone, T., Longhi, R. & Tota, B. (2004). Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *General and comparative endocrinology*, Vol. 136, No. 2, (April 2004), pp. 217-224, ISSN: 0016-6480.
- Curry, W.J., Shaw, C., Johnston, C.F., Thim, L. & Buchanan, K.D. (1992). Isolation and primary structure of a novel chromogranin A-derived peptide, WE-14, from a human midgut carcinoid tumour. *FEBS letters*, Vol. 301, No. 3, (April 1992), pp. 319-321, ISSN: 0014-5793.
- Cutuli, M., Cristiani, S., Lipton, J.M. & Catania, A. (2000). Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *Journal of leukocyte biology*, Vol. 67, No. 2, (February 2000), pp. 233-239, ISSN: 0741-5400.
- Dann, S.M. & Eckmann, L. (2007). Innate immune defenses in the intestinal tract.

- Current opinion in gastroenterology*, Vol. 23, No. 2, (March 2007), pp. 115-120, ISSN: 0267-1379.
- Davidson, D.J., Currie, A.J., Reid, G.S., Bowdish, D.M., MacDonald, K.L., Ma, R.C., Hancock, R.E. & Speert, D.P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *The journal of immunology*, Vol. 172, No. 2, (January 2004), pp. 1146-1156, ISSN: 0022-1767.
- Degorce, F., Goumon, Y., Jacquemart, L., Vidaud, C., Bellanger, L., Pons-Anicet, D., Seguin, P., Metz-Boutigue, M.H. & Aunis, D. (1999). A new human chromogranin A (CGA) immunoradiometric assay involving monoclonal antibodies raised against the unprocessed central domain (145-245). *British journal of cancer*, Vol. 79, No.1, (January 1999), pp. 65-71, ISSN: 0007-0920.
- Dehority, W. (2010). Use of vancomycin in pediatrics. *The pediatric infectious disease*, Vol. 29, No. 5, (May 2010), pp. 462-463, ISSN: 0891-3668.
- Del Valle, M.E., Vazquez, E., Represa, J., Malinovsky, L. & Vega, J.A. (1994). Immunohistochemical localization of calcium-binding proteins in the human cutaneous sensory corpuscles. *Neuroscience letters*, Vol. 168, No. 1-2, (February 1994), pp. 247-250, ISSN: 0304-3940.
- Dieckgraefe, B.K., Crimmins, D.L., Landt, V., Houchen, C., Anant, S., Porche-Sorbet, R. & Ladenson, J.H. (2002). Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *Journal of investigative medicine*, Vol. 50, No. 6, (November 2002), pp. 421-434, ISSN: 1081-5589.
- Dyer, K.D. & Rosenberg, H.F. (2006). The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Molecular diversity* Vol. 10, No. 4, (November 2006), pp. 585-597, ISSN: 1381-1991.
- Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D. & Lee, K. (2004). S100 proteins in the epidermis. *The journal of investigative dermatology*, Vol. 123, No. 1, (July 2004), pp. 23-33, ISSN: 0022-202X.
- Eiden, L.E. (1987). Is chromogranin a prohormone? *Nature*, Vol. 325, No. 6102, (January 1987), pp. 301, ISSN: 0028-0836.
- Elias, P.M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in immunopathology* Vol. 29, No. 1, (April 2007), pp. 3-14, ISSN: 1863-2297.
- Estensen, M.E., Hognestad, A., Syversen, U., Squire, I., Nq, L., Kickshus, Dickstein, K., Omland, T. (2006). Prognostic value of plasma chromogranin A levels in patients with complicated myocardial infarction. *American heart journal*, Vol. 152, No.5, (November 2006), pp. 927.e1-6, ISSN : 0002-8703.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J.C., Aunis, D., Schaaf, P., Metz-Boutigue, M.H., Bolcato-Bellemin, A.L. & Egles, C. (2005). Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*, Vol. 26, No. 33, (November 2005), pp. 6704-6412, ISSN: 0142-9612.
- Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A. & Hammarstrom, M.L. (2004). beta-8 Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*, Vol. 137, No. 2, (August 2004), pp. 379-385, ISSN: 0009-9104.
- Fasciotto, B.H., Trauss, C.A., Greeley, G.H. & Cohn, D.V. (1993). Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*, Vol. 133, No. 2, (August 1993), pp. 461-466, ISSN: 0013-7227.
- Forrester, J.S., Diamond, G., Chatterjee, K. & Swan, H.J. (1976). Medical therapy of

- acute myocardial infarction by application of hemodynamic subsets (second of two parts). *The New England journal of medicine*, Vol. 295. No. 25, (December 1976), pp.1404-1413, ISSN: 0028-4793.
- Ganz T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Review Immunology*, Vol. 3, No. 9, (September 2003), pp. 710-720, ISSN: 1474-1733.
- Garcia, J.R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodriguez-Jimenez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Kluver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.G, & Bals, R. (2001). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and tissue research*, Vol. 306, No. 2, (November 2001), pp. 257-264, ISSN: 0302-766X.
- Gasparri, A., Sidoli, A., Sanchez, L.P., Longhi, R., Siccardi, A.G., Marchisio, P.C. & Corti, A. (1997). Chromogranin A fragments modulate cell adhesion. Identification and characterization of a pro-adhesive domain. *The journal of biological chemistry*, Vol. 272, No. 33, (August 1997), pp. 20835-20843, ISSN: 0021-9258.
- Ghia, J.E., Crenner, F., Metz-Boutigue, M.H., Aunis, D., Angel, F. (2004b). The effect of a chromogranin A-derived peptide (CGA4-16) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Life Science*, Vol. 75, No.15, (August 2004), pp. 1787- 1799, ISSN: 0024-3205.
- Ghia, J.E., Crenner, F., Rohr, S., Meyer, C., Metz-Boutigue, M.H., Aunis, D. & Angel F. (2004a). A role for chromogranin A (4-16), a vasostatin-derived peptide, on human colonic motility. An in vitro study. *Regulatory Peptides*, Vol. 121, No. 1-3, (September 2004) pp. 31-39, ISSN: 0167-0115.
- Giusti, M., Sidoti, M., Augeri, C., Rabitti, C. & Minuto, F. (2004). Effect of short-term treatment with low dosages of the proton-pump inhibitor omeprazole on serum chromogranin A levels in man. *European journal of endocrinology*, Vol. 150, No. 3, (March 2004), pp: 299-303, ISSN: 0804-4643.
- Gorkiewicz, G. (2009). Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *International journal of antimicrobial agents*, Vol. 33, Suppl 1, (March 2009), pp. S37-41, ISSN: 0924-8579.
- Hansen, M.B. & Witte, A.B. (2008). The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta physiologica* Vol. 193, No. 4, (August 2008), pp. 311-323, ISSN: 1748- 1708.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, Vol. 387, No. 6636, (June 1997), pp. 861 ISSN: 0028-0836
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The journal of biological chemistry*, Vol. 276, No. 8, (February 2001), pp. 5707-5713, ISSN: 0021- 9258.
- Harder, J. & Schroder, J.M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The journal of biological chemistry*, Vol. 277, No. 48, (November 2002), pp. 46779-46784, ISSN: 0021-9258.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L. & Schroder, J.M. (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *The journal of investigative*

- dermatology*, Vol. 123, No. 3, (September 2004), pp. 522-529, ISSN: 0022-202X.
- Hartschuh, W., Weihe, E. & Yanaihara, N. (1989a). Immunohistochemical analysis of chromogranin A and multiple peptides in the mammalian Merkel cell: further evidence for its paraneuronal function? *Archives of histology and cytology*, Vol. 52, Suppl., pp. 423-431, ISSN: 0914-9465.
- Hartschuh, W., Weihe, E. & Egner, U. (1989b). Chromogranin A in the mammalian Merkel cell: cellular and subcellular distribution. *The journal of investigative dermatology*, Vol. 93, No. 5, (November 1989), pp. 641-648, ISSN: 0022-202X.
- Hase, K., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N. & Kagnoff, M.F. (2002). Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infection and Immunity*, Vol. 70, No. 2, (February 2002), pp. 953-963, ISSN: 0019-9567.
- Heitz, P., Polak, J.M., Timson, D.M. & Pearse, A.G. (1976). Enterochromaffin cells as the endocrine source of gastrointestinal substance P. *Histochemistry*, Vol. 49, No. 4, (November 1976), pp. 343-347, ISSN: 0301-5564.
- Helle, K.B. & Serck-Hanssen, G. (1975). The adrenal medulla: a model for studies of hormonal and neuronal storage and release mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 6, No. 2, (February 1975), pp. 127-146, ISSN: 0300-8177.
- Helle KB. (2004). The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biological review of the Cambridge Philosophical Society*, Vol. 79, No. 4, (November 2004), pp. 769-794, ISSN: 1464-7931.
- Helle, K.B., Corti, A., Metz-Boutigue, M.H., & Tota, B. (2007). The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cellular and molecular life science*, Vol. 64, No. 22, (November 2007), pp. 2863-2886, ISSN: 1420-682X.
- Hiltz, M.E. & Lipton, J.M. (1990). Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation and contact sensitivity. *Peptides*, Vol. 11, No. 5, (September-October 1990), pp. 979-982, ISSN: 0196-9781.
- Hoffmann, K.M., Deutschmann, A., Weitzer, C., Joainig, M., Zechner, E., Hogenauer, C. & Hauer, A.C. (2010). Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin- The Natural Antimicrobial Chromogranins/Secretogranins-Derived Peptides – Production, Lytic Activity... producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*, Vol. 125, No. 4, (April 2010), pp. e960-963, ISSN: 0031-4005.
- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V. & Gordon, J.I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature immunology*, Vol. 4, No. 3, (March 2003), pp. 269-273, ISSN: 1529-2908.
- Hornef, M.W., Putsep, K., Karlsson, J., Refai, E. & Andersson, M. (2004). Increased diversity of antimicrobial peptides by covalent dimer formation. *Nature immunology* Vol. 5, No. 8, (August 2004), pp. 836-843, ISSN: 1529-2908.
- Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C.G., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Gesser, B., Etzerodt, M., Honore, B., Celis, J.E. & Thestrup-Pedersen, K. (1996). Psoriasin: a novel chemotactic protein. *The journal of investigative dermatology*, Vol. 107, No. 1, (July 1996), pp. 5-10, ISSN: 0022-202X.
- Kai-Larsen, Y. & Agerberth, B. (2008). The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Frontiers in bioscience*, Vol. 1, No. 13, (May 2008), pp. 3760-3767, ISSN: 1093-154715.
- Kanda, N. & Watanabe, S. (2008). IL-12, IL-23, and IL-27 enhance human beta-defensin-2 production in human keratinocytes. *European journal of*

- immunology*, Vol. 38, No.5, (May 2008), pp. 1287-1296, ISSN: 0014-2980.
- Kansal, R.G., Aziz, R.K. & Kotb, M. (2005). Modulation of expression of superantigens by human transferrin and lactoferrin: a novel mechanism in host-Streptococcus interactions. *The Journal of infectious diseases*, Vol. 191, No.12, (June 2005), pp. 2121-2129, ISSN: 0022-1899.
- Keshav, S. (2006). Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *Journal of leukocyte biology*, Vol. 80, No. 3, (September 2006), pp. 500-508, ISSN: 0741- 5400.
- Kim, M., Cooke, H.J., Javed, N.H., Carey, H.V., Christofi, F. & Raybould, H.E. (2001). D-27 glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology*, Vol. 121, No.6, (Dec 2001), pp.1400-1406, ISSN 0016-5085
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrucker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P.S., Vogelmeier, C., Gallo, R.L., Clauss, M. & Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 111, No.11, (June 2003), pp.1665-1672, ISSN: 0021-9738.
- Kuramoto, H., Kadowaki, M., Sakamoto, H., Yuasa, K., Todo, A. & Shirai, R. (2007). Distinct morphology of serotonin-containing enterochromaffin (EC) cells in the rat distal colon. *Archives of histology and cytology*, Vol. 70, No.4, (November 2007), pp. 235-241, ISSN: 0914-9465.
- Lai, Y., Villaruz, A.E., Li ,M., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., & Otto, M. (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Molecular microbiology*, Vol. 63, No.2, (January 2007), pp. 497-506, ISSN: 0950-382X.
- Lamrani Alaoui, H., Oufdou, K., & Mezrioui, N.E. (2010). Determination of several potential virulence factors in non-o1 Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, faecal coliforms and streptococci isolated from Marrakesh groundwater. *Water science and technology*, Vol. 61, No.7, pp. 1895-1905, ISSN: 0273-1223.
- Lee Motoyama J.P., Kim-Motoyama, H., Kim, P., Nakagama, H., Miyagawa, K. & Suzuki, K. (2007). Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 357, No.4, (June 2007), pp. 828-833, ISSN: 0006-291X.
- Le Gall, J.R., Lemeshow, S. & Saulnier, F. (1993). A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a european/north american multicenter study. *The journal of the American medical association*. Vol. 27, No.17, (may 1994), pp.1321, ISSN: 0098-7484.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M. & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and molecular life science*, Vol. 62, No.22, (November 2005), pp. 2549-2559, ISSN: 1420-682X.
- Lehrer, R.I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K.J. & Gleich, G.J. (1989). Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *Journal of immunology*, Vol. 142, No.2, (June 1989), pp. 4428-4434, ISSN: 0022-1767.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D. Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L. & Ramsay, G. (2003). International sepsis definitions conference. *Intensive care*, Vol. 29, No.4, (april 2003), pp.530-538, ISSN: 0342-4642.
- Lichti, U., Anders, J. & Yuspa, S.H. (2008). Isolation and short-term culture of primary

- keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nature Protocols*, Vol. 3, No.5, (April 2008), pp. 799-810, ISSN: 1750-2799.
- Lucarz, A. & Brand, G. (2007). Current considerations about Merkel cells. *European journal of cell biology*, Vol. 86, No.5, (May 2007), pp. 243-251, ISSN: 0171-9335.
- Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Cort, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M.H. (2000). Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N- terminal fragment of chromogranin A. *Journal of biological chemistry*, Vol. 275, No. 15, (April 2000), pp. 10745-10753, ISSN: 0021-9258.
- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A.E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D. & Metz-Boutigue M.H. (2001). Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *Journal of biological chemistry*, Vol. 276, No.38, (September 2001), pp. 35875-35882, ISSN: 0021- 9258.
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochemica and biophysica acta*, Vol. 1462, No. 1-2, (December 1999), pp. 109-140, ISSN: 0006-3002.
- Maget-Dana, R., Metz-Boutigue, M.H. & Helle, K.B. (2002). The N-terminal domain of chromogranin A (CGA1-40) interacts with monolayers of membrane lipids of fungal and mammalian compositions. *Annals of New York Academy of Sciences*, Vol. 971, (October 2002), pp. 352-354, ISSN: 0077-8923.
- Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M. & Parmer, R.J. (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *Journal of clinical investigation*, Vol. 100, No. 6, (September 1996), pp. 1623-1633, ISSN: 0021-9738.
- Mallow, E.B., Harris, A., Salzman, N., Russell, J.P., DeBerardinis, R.J., Ruchelli, E. & Bevins, C.L. (1996). Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 271, No.8, (February 1996), pp. 4038-4045, ISSN: 0021-9258.
- Mandrika, I., Muceniece, R. & Wikberg, J.E. (2001). Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. *Biochemical pharmacology*, Vol. 61, No.5, (March 2001), pp. 613-621, ISSN: 0006-2952.
- Manners, J.M. (2007). Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome biology*, Vol. 8, No.9, pp. 225, ISSN: 1465-6906.
- Marksteiner, J., Kirchmair, R., Mahata, S.K., Mahata, M., Fischer-Colbrie, R., Hogue-Angeletti, R., Saria, A. & Winkler H. (1993). Distribution of secretoneurin, a peptide derived from secretogranin II, in rat brain: an immunocytochemical and radioimmunological study. *The European journal of neuroscience*, Vol. 54, No. 4, (June 1993), pp. 923-944, ISSN: 0306-4522.
- Martinsson, H., Yhr, M. & Enerback, C. (2005). Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Experimental dermatology*, Vol. 14, No. 3, (March 2005), pp. 161-168, ISSN: 0906-6705.
- Mason, D.Y. & Taylor, C.R. (1975). The distribution of muramidase (lysozyme) in

- human tissues. *Journal of clinical pathology*, Vol. 28, No.2, (February 1975), pp. 124-132, ISSN: 0021-9746.
- Medalla, F., Sjölund-Karlsson, M., Shin, S., Harvey, E., Joyce, K., Theobald, L., Nygren, B.N., Pecic, G., Gay, K., Austin, J., Stuart, A., Blanton, E., Mintz, E. D., Whichard, J. M. & Barzilay, E. J. (2011). Ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica Serotype Typhi, United States, 1999-2008. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, No. 6, (June 2011), pp. 1095-1098, ISSN: 1080-6040.
- Metz-Boutigue, M.H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R. & Aunis D. (1993). Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *European journal of biochemistry*, Vol. 217, No. 1, (October 1993), pp. 247-257, ISSN: 0014-2956.
- Metz-Boutigue, M.H., Goumon, Y., Lugardon, K., Strub, J.M. & Aunis, D. (1998). Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cellular and molecular neurobiology*, Vol. 18, No. 2, (April 1998), pp. 249-266, ISSN: 0272-4340.
- Modlin, I.M., Kidd, M., Pfragner, R., Eick, G.N. & Champaneria, M.C. (2006). The functional characterization of normal and neoplastic human enterochromaffin cells. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Vol. 91, No.6, (June 2006), pp. 2340-2348, ISSN: 0021-972X.
- Mookherjee, N., Brown, K.L., Bowdish, D.M., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F.M., Mu, R., Doho, G.H., Pistolic, J., Powers, J.P., Bryan, J., Brinkman, F.S. & Hancock, R.E. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the human defense peptide LL-37. *Journal of immunology*, Vol. 176, No. 4, (February 2006), pp. 2455-2464, ISSN: 0022-1767.
- Mugridge, K.G., Perretti, M., Ghiara, P. & Parente, L. (1991). Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces interleukin-1 beta effects on rat stomach preparations possibly through interference with a type I receptor. *European journal of pharmacology*, Vol. 197, No. 2-3, (May 1991), pp. 151-155, ISSN: 0014-2999.
- Müller, C.A., Autenrieth, I.B. & Peschel, A. (2005). Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cellular and molecular life sciences*, Vol. 62, No. 12, (June 2005), pp. 1297-1307, ISSN: 1420-682X.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K. & Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of investigative dermatology*, Vol. 127, No. 3, (March 2007), pp. 594-604, ISSN: 0022-202X.
- Ogawa, H., Miyazaki, H. & Kimura, M. (1971). Isolation and characterization of human skin lysozyme. *Journal of investigative dermatology*, Vol. 57, No. 2, (August 1971), pp. 111-116, ISSN: 0022-202X.
- Omland, T., Dickstein, K. & Syversen, U. (2003). Association between plasma chromogranin A concentration and long-term mortality after myocardial infarction. *The American journal of medicine*, Vol. 114, No. 1, (January 2003), pp. 25-30, ISSN: 0002-9343.
- O'Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T. & Kagnoff, M.F. (1999). Expression and regulation of human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *Journal of immunology*, Vol. 163, No. 12, (December 1999), pp. 6718-6724, ISSN: 0022-1767.
- Oren, A., Ganz, T., Liu, L. & Meerloo, T. (2003). In human epidermis, beta-defensin 2

- is packaged in lamellar bodies. *Experimental and molecular pathology*, Vol. 74, No.2, (April 2003), pp. 180-182, ISSN: 0014-4800.
- Papini, M., Simonetti, S., Franceschini, S., Scaringi, L. & Binazzi, M. (1982). Lysozyme distribution in healthy human skin. *Archives of dermatological research*, Vol. 272, No. 1-2, pp. 167-170, ISSN: 0340-3696.
- Plessier, A., Cosnes, J., Gendre, J.P. & Beaugerie, L. (2002). Intercurrent *Klebsiella oxytoca* colitis in a patient with Crohn's disease. *Gastroenterologie clinique et biologique*, Vol. 26, No. 8-9, (August-September 2002), pp. 799-800, ISSN: 0399-8320.
- Porter, E.M., Bevins, C.L., Ghosh, D. & Ganz, T. (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cellular and molecular life sciences*, Vol. 59, No. 1, (January 2002), pp. 156-170, ISSN: 1420- 682X.
- Pritchard, L.E. & White, A. (2007). Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways. *Endocrinology* Vol. 148, No. 9, (September 2007), pp. 4201-4207, ISSN: 0013-7227.
- Putsep, K., Axelsson, L.G., Boman, A., Midtvedt, T., Normark, S., Boman, H.G. & Andersson, M. (2000). Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *Journal of biological chemistry*, Vol. 275, No. 51, (December 2000), pp. 40478-40482, ISSN: 0021-9258.
- Radek, K.A. & Gallo, R. (2007). Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Seminars in Immunopathology*, Vol. 29, No. 1, (April 2007), pp. 27-44, ISSN: 1863-2297.
- Radek, K.A., Lopez-Garcia, B., Hupe, M., Niesman, I.R., Elias, P.M., Taupenot, L, Mahata, S.K., O'Connor, D.T. & Gallo, R.L. (2008). The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 128, No. 6, (June 2008) pp. 1525-1534, ISSN: 0022-202X.
- Raikhlin, N.T. & Kvetnoy, I.M. (1976). Melatonin and enterochromaffin cells. *Acta Histochemica*, Vol. 55, No. 1, pp. 19-24, ISSN: 0065-1281.
- Rangon, C.M., Haik, S., Faucheux, B.A., Metz-Boutigue, M.H., Fierville, F., Fuchs, J.P, Hauw, J.J. & Aunis, D. (2003). Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-beta amyloid plaque. *Neuroreport*, Vol. 14, No. 5, (April 2003), pp.755-758, ISSN: 0959-4965.
- Ratti, S., Curnis, F., Longhi, R., Colombo, B., Gasparri, A., Magni, F., Manera, E., Metz-Boutigue, M.H. & Corti A. (2000). Structure-activity relationships of chromogranine A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 275, No. 38, (September 2000), pp. 29257-29263, ISSN: 0021-9258.
- Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C., Schittek, B. (2006). Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *The Journal of investigative Dermatology*, Vol. 126, No. 2, (February 2006), pp. 354-365, ISSN: 0022-202X.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M. & Gennaro, R. (1988). Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 263, No. 20, (July 1988), pp. 9573-9575, ISSN: 0021- 9258.
- Sarker, S.A. & Gyr, K. (1992). Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut*, Vol. 33, No. 7, (July 1992), pp. 987-993, ISSN: 0017-5749.
- Satoh, Y., Ishikawa, K., Tanaka, H., Oomori, Y. & Ono, K. (1988).

- Immunohistochemical observations of lysozyme in the Paneth cells of specific-pathogen-free and germ free mice. *Acta Histochemical*, Vol. 83, No. 2, pp. 185-188, ISSN: 0065-1281.
- Sawyer, T.K., Staples, D.J., Castrucci, A.M., Hadley, M.E., al-Obeidi, F.A., Cody, W.L. & Hruby, V.J. (1990). Alpha-melanocyte stimulating hormone message and inhibitory sequences: comparative structure-activity studies on melanocytes. *Peptides*, Vol. 11, No. 2, (March 1990), pp. 351-357, ISSN: 0196-9781.
- Saxena, S.K., Rybak, S.M., Davey, R.T., Jr., Youle, R.J. & Ackerman, E.J. (1992). Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 267, No. 30, (October 1992), pp. 21982-21986, ISSN: 0021-9258.
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G. & Garbe, C. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology*, Vol. 2, No. 12, (December 2001), pp. 1133-1137, ISSN: 1529-2908.
- Schroder, J.M. & Harder, J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and molecular life sciences*, Vol. 63, No. 4, (February 2006), pp. 469-486, ISSN: 1420-682X.
- Seidah, N.G. & Chretien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain research*, Vol. 848, No. 1- 2, (November 1999), pp. 45-62, ISSN: 0006-8993.
- Serra, P., Brandimarte, C., Martino, P., Carlone, S., & Giunchi, G. (1977). Synergistic treatment of enterococcal endocarditis: in vitro and in vivo studies. *Archives of internal medicine*, Vol. 137, No. 11, (November 1977), pp. 1562-1567, ISSN: 0003-9926.
- Shaw, J.L., Smith, C.R. & Diamandis, E.P. (2007). Proteomic analysis of human cervico vaginal fluid. *Journal of proteome research*, Vol. 6, No. 7, (July 2007), pp. 2859-2865, ISSN: 1535-3893.
- Sherman, H., Chapnik, N. & Froy, O. (2006). Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Molecular immunology*, Vol. 43, No. 10, (April 2006), pp.1617-1623, ISSN: 0161-5890.
- Shooshtarizadeh, P., Zhang, D., Chich, J.F., Gasnier, C., Schneider, F., Haïkel, Y., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M.H. (2010). The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity. *Regulatory peptides*, Vol. 165, No. 1, (Nov 2009), pp. 102-110, ISSN: 0167-0115.
- Siddique, Z.L., Drozdov, I., Floch, J., Gustafsson, B.I., Stunes, K., Pfragner, R., Kidd, M. & Modlin, I.M. (2009). KRJ-I and BON cell lines: defining an appropriate enterochromaffin cell neuroendocrine tumor model. *Neuroendocrinology* Vol. 89, No. 4, (March 2009), pp. 458-470, ISSN: 0028-3835.
- Sievert, D.M., Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J. & Hageman, J.C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical infectious diseases*, Vol. 46, No. 5, (March 2008), pp. 668-674, ISSN: 1058-4838.
- Silva, L.V., Araújo, M.T., Santos, K.R. & Nunes, A.P. (2011). Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 106, No. 1, (February 2011), pp. 44-50, ISSN: 0074-0276.
- Sorensen, O.E, Thapa, D.R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A.A. & Ganz, T. (2005).

- Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *Journal of immunology*, Vol. 174, No. 8, (April 2005), pp. 4870-4879, ISSN: 0022-1767.
- Sorensen, O.E., Thapa, D.R., Roupe, K.M., Valore, E.V., Sjobring, U., Roberts, A.A., Schmidtchen, A. & Ganz, T. (2006). Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 116, No. 7, (July 2006), pp. 1878-1885, ISSN: 0021-9738.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C. & Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 50, No. 8, (August 2006), pp. 2608-2620, ISSN: 0066-4804.
- Sternberg, E.M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature review immunology*, Vol. 6, No. 4, (April 2006), pp. 318-328, ISSN: 1474-1733.
- Strub, J.M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorselaer, A., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M.H. (1996a). Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 271, No. 45, (November 1996), pp. 28533-28540, ISSN: 0021-9258.
- Strub, J.M., Hubert, P., Nullans, G., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M.H. (1996b). Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. *Federation of European Biochemical Society Letters*, Vol. 379, No. 3, (February 1996), pp. 273-278, ISSN: 0014-5793.
- Su, L.H., Teng, W.S., Chen, C.L., Lee, H.Y., Li, H.C., Wu, T.L. & Chiu, C.H. (2011). Increasing ceftriaxone resistance in Salmonellae, Taiwan. *Emerging infectious diseases*, Vol. 17, No. 6, (June 2011), pp. 1086-1090, ISSN: 1080-6040.
- Syversen, U., Mignon, M., Bonfils, S., Kristensen, A. & Waldum, H.L. (1993). Chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in serum of gastrinoma patients. *Acta oncologica*, Vol. 32, No. 2, pp. 161-165, ISSN: 0284-186X.
- Tatemoto, K., Efendić, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G.J. & Barchas, J.D. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, Vol. 324, No. 6096, (December 1986), pp. 476-478, ISSN: 0028-0836.
- Taylor, C.V., Taupenot, L., Mahata, S.K., Mahata, M., Wu, H., Yasothornsrikul, S., Toneff, T., Caporale, C., Jiang, Q., Parmer, R.J., Hook, V.Y. & O'Connor, D.T. (2000). Formation of the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin from chromogranin A. Determination of proteolytic cleavage sites in hormone storage granules. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 275, No. 30, (July 2000), pp. 22905-22915, ISSN: 0021-9258.
- Torres, G.E., Carneiro, A., Seamans, K., Fiorentini, C., Sweeney, A., Yao, W.D. & Caron, M.G. (2003). Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 4, (January 2003), pp. 2731-2739, ISSN: 0021-9258.
- Tsakris, A., Poulou, A., Markou, F., Pitiriga, V., Piperaki, E.T., Kristo, I. & Pournaras, S. (2011). Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring

- CMY-31,VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 55, No. 7, (July, 2011), pp. 3164-3168, ISSN: 0066-4804.
- Walker, V.P., Akinbi, H.T., Meinzen-Derr, J., Narendran, V., Visscher, M. & Hoath, S.B. (2008). Host defense proteins on the surface of neonatal skin: implications for innate immunity. *The Journal of pediatrics*, Vol. 152, No. 6, (July 2008), pp. 777-781, ISSN: 0022-3476.
- Walmsley, R.S., Gillen, C.D. & Allan, R.N. (1997). Prognosis and management of Crohn's disease in the over-55 age group. *Postgraduate medical journal*, Vol. 73, No. 858,(April 1997), pp. 225-229, ISSN: 0032-5473.
- Wang, Z. & Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research*, Vol. 32, (January 2004), pp. D590-592, ISSN: 0305-1048.
- Webster, J.I., Tonelli, L. & Sternberg, E.M. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual review of immunology*, Vol. 20, (October 2001), pp. 125-163, ISSN: 0732-0582.
- Wikberg, J.E., Muceniece, R., Mandrika, I., Prusis, P., Lindblom, J., Post, C. & Skottner, A. (2000). New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacological research*, Vol. 42, No. 5, (November 2000), pp. 393-420, ISSN: 1043-6618.
- Yajima, A., Ikeda, M., Miyazaki, K., Maeshima, T., Narita, N. & Narita, M. (2004). Manserin, a novel peptide from secretogranin II in the neuroendocrine system. *Neuroreport.*, Vol. 15, No. 11, (August 2004), pp. 1755-1759, ISSN: 0959-4965.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. & Oppenheim, J.J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in immunology*, Vol. 23, No. 6, (June 2002), pp. 291-296, ISSN: 1471-4906.
- Yeaman, M.R. & Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, Vol. 55, No. 1, (March 2003), pp. 27-55, ISSN: 0031-6997.
- Yoo, S.H. (1992). Identification of the Ca(2+)-dependent calmodulin-binding region of chromogranin A. *Biochemistry*, Vol. 31, No. 26, (July 1992), pp. 6134-6140, ISSN: 0006-2960.
- Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M., Pistolic, J., Li, Y., Rehaume, L. & Hancock R.E. (2007). Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *Journal of immunology*, Vol. 179, No.11, (December 2007), pp. 7684-7691, ISSN: 0022-1767.
- Zaalouk, T.K., Bajaj-Elliott, M., George, J.T. & McDonald, V. (2004). Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and immunity*, Vol. 72, No.5, (May 2004), pp. 2772-2779, ISSN 0019-9567
- Zanetti, M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of leukocyte biology*, Vol. 75, No. 1, (January 2004), pp. 39-48, ISSN: 0741-5400.
- Zanner, R., Gratzl, M. & Prinz, C. (2004). Expression of the endocytic proteins dynamin and amphiphysin in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Journal of Cell Science*, Vol. 117, No. pt11, (May 2004), pp. 2369-2376, ISSN: 0021-9533.
- Zayat, M., Lichtenberger, L.M. & Dial, E.J. (2008). Pathophysiology of LPS-induced gastrointestinal injury in the rat: role of secretory phospholipase A2. *Shock*, Vol. 30, No. 2, (August 2008), pp. 206-211, ISSN: 1073-2322.
- Zhang, D., Lavaux, T., Voegeli, A.C., Lavigne, T., Castelain, V., Meyer, N., Sapin, R.,

- Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H. & Schneider, F. (2008). Prognostic value of chromogranine A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clinical chemistry*, Vol. 54, No. 9, (September 2008), pp. 1497-1503, ISSN: 0009-329147.
- Zhang, R., Zhou, H.W., Cai, J.C., Zhang, J., Chen, G.X., Nasu, M. & Xie, X.Y. (2011). Serotypes and extended-spectrum beta-lactamase types of clinical isolates of *Shigella* spp. from the Zhejiang province of China. *Diagnostic Microbiology and infectious disease*, Vol. 69, No. 1, (January 2011), pp. 98-104, ISSN: 0732-8893.
- Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Nagaoka, I., Okumura, K. & Ogawa, H. (2008). Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology*, Vol. 124, No. 3, (July 2008), pp. 357-367, ISSN: 0019-2805.

Manuscrit 3

Antibacterial activities of chromogranin A derived peptides against gut infections

(à soumettre pour évaluation à Antimicrobial Agents and Chemotherapy)

M. Atindehou, Jean Marc Strub, A. Van Dorsselar, G. Prévost, Y. Haikel, A. Sanni, MH.Metz-Boutigue.

L'objectif des expériences réalisées dans cet article a été d'identifier des peptides antimicrobiens ayant une activité bactérienne sur au moins l'une des quatre souches pathogènes testées. Les souches retenues sont : *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera non O1*. Elles sont responsables d'infections intestinales. A cet effet, plusieurs peptides dérivés de la chromogranine A (Procatéstatine bovine, bCGA₃₃₂₋₃₆₄, Catestatine bovine bCGA₃₄₄₋₃₆₄, Cateslytine bovine bCGA₃₄₄₋₃₅₈ et Chromofungine CGA₄₇₋₆₆) sont testés.

Une fois l'activité des peptides déterminée, notre but a été de comprendre la différence d'efficacité entre les peptides sur les souches sélectionnées. Pour cela, nous avons choisi d'étudier un peptide très actif (la cateslytine), un peptide moyennement actif (la catestatine qui est le fragment plus long de la cateslytine mais qui est 2 fois moins efficace que celle-ci), la procatéstatine qui est le fragment plus long de la catestatine et qui ne présente aucune activité et enfin la chromofungine qui elle aussi ne présente aucune activité. L'activité des protéases bactériennes sur le peptide a été étudiée en observant la dégradation du peptide en HPLC et la spectrométrie nous a permis d'identifier les séquences de peptides générées. Les résultats montrent que les bactéries sont capables de cliver les peptides pour les rendre inefficaces. La cateslytine est le peptide qui résiste le mieux aux dégradations par les protéases bactériennes.

La dernière étape de ce travail a été d'étudier le peptide en association avec un antibiotique, la minocycline. L'ajout du peptide potentialise l'activité de l'antibiotique et permet de réduire les doses d'antibiotiques de 50 à 25%.

En conclusion, cette étude nous a permis d'identifier deux peptides dérivés de la chromogranine A (la catestatine et la chromofungine) ayant une bonne activité contre des bactéries pathogènes. En association avec la minocycline, la cateslytine potentialise l'effet de la minocycline et permet ainsi de réduire les doses nécessaires réduisant par là la toxicité et les effets délétères liés à l'antibiotique. Cette association pourrait également être utilisée dans les cas de résistance aux antibiotiques car le peptide permet un meilleur accès de l'antibiotique à sa cible. L'étude de la dégradation des peptides par les protéases montre qu'il serait utile de protéger les peptides pour en augmenter encore plus l'efficacité antimicrobienne.

Antibacterial activities of chromogranin A derived peptides against gut infections

(à soumettre pour évaluation à Antimicrobial Agents and Chemotherapy)

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Jean-Marc Strub³, Alain Van Dorsselar³, G. Prévost⁴, Youssef Haikel^{1,5}, Ambaliou Sanni², Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

(1) Université de Strasbourg, Biomatériaux et Ingénierie tissulaire, INSERM U 977, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

(2) Université d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire LBBM, 04-BP 320 Cotonou, Bénin

(3) Université de Strasbourg, Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, CNRS UMR 7178, ECPM, 25 rue Becquerel F-67087 Strasbourg, France

(4) Université de Strasbourg, Physiopathologie et Médecine translationnelle, EA-4438, 3 Rue Koeberlé, Strasbourg, France

(5) Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie dentaire, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

* Corresponding author:

Marie-Hélène Metz-Boutigue, marie-helene.metz@inserm.fr

[Tel: 33 3 68 85 54 71](tel:33368855471) ; [Fax: 33 3 68 85 54 72](tel:33368855472)

Running title: Chromogranin-A derived peptides in gut infections



Abstract

Bacterial resistance to antibiotics is a major public health problem and it is urgent to find new antimicrobial molecules active against multi-resistant bacteria. In this perspective, the antimicrobial peptides seem to be an alternative. In the present study, we evaluated the antibacterial activities of chromogranin-A derived peptides (pro-catestatin CGA₃₃₂₋₃₆₄, catestatin CGA₃₄₄₋₃₆₄, cateslytin CGA₃₄₄₋₃₅₈ and chromofungin) against four bacterial strains causing diarrhea (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholera* non O1). After determination of the MIC of each peptide against the four bacteria, we analysed the interaction microorganism-peptide, by proteomic analysis (HPLC, mass spectrometry and sequencing) of the peptide after incubation with bacteria. Cateslytin, the shorter peptide is the most resistant to the bacterial proteases. Then, we investigated synergistic activity of cateslytin with minocycline and we showed that cateslytin acts synergistically with the antibiotic and allows to significantly decreasing the therapeutic dose. Finally, this study characterizes new active natural antibacterial peptides secreted during stress and active against bacteria involved in gut infections and show that cateslytin resists to degradation and acts synergistically with minocycline.

Introduction

Gut infections are caused by numerous bacteria such as *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholera* non O1. These are Gram-negative bacteria, non-spore forming, and belong to enterobacteriaceae family. *V.cholera*, a vibrionaceae, is dependent of oxygen. They are pathogens and most commonly associated with severe cases of diarrhea. *K. oxytoca* is also responsible for nosocomial infections (Hoenigl et al., 2012) and many strains resistant to (i) carbapenems by betalactamase production (Yigit et al., 2003) (ii) fluoroquinolone by aminoacid mutations in GyrA and ParC and (iii) a reduced expression of the 36-kDa OMP (Outer membrane Protein) (Horii et al., 2008) are inventory. These strains are also documented to possess resistance to many antibiotics: *S. enterica* to quinolone (Gunell et al., 2009), *S.sonnei* to tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole (Jafari et al., 2009), *V. cholerae* to ampicillin and chloramphenicol (Kumar et al., 2009).

To fight these infections, innate immune system is the first line of defense. Chromogranin A (CGA) is an acidic protein of granin family, secreted by endocrine, neuroendocrine and neuronal cells upon stress. It is a prohormone precursor of biologically active peptide (Metz-Boutigue et al., 1993; Simon and Aunis, 1989). These peptides are involved in many biological processes involved in homeostasis but display also antifungal (Etienne et al., 2005; Lugardon et al., 2001) and antibacterial activities (Briolat et al., 2005; Strub et al., 1997). Among these peptides, CGA produces catestatin (CAT: bCGA344-364) and chromofungin (CHR: CGA47-66).

Catestatin is a 21-amino acid long, cationic and hydrophobic peptide. It is an inhibitor of catecholamine released by inhibition of nicotinic acetylcholine receptors (Mahata et al., 1997). Many studies reported that, CAT displays activity against skin pathogens (Radek et al., 2008), CAT was involved in mast cell migration, production of chemokines, cytokines and interleukine-8 (Aung et al., 2011; Aung et al., 2011) and displays anti-plasmodial activity. All

these results show that, CAT plays an important role in immune system. Cateslytin, (CTL: bCGA344-358), represents its active domain for the antimicrobial activities against bacteria and fungi (Briolat et al., 2005) and Procatestatin (ProCAT, CGA332-364) is the precursor domain.

CHR (CHR, bCGA47-66) is the highly conserved vasostatins domain (Vasostatin I: CGA1-76 or Vasostatin II CGA1-173). CHR displays antifungal activity at the micromolar concentration (Lugardon et al., 2001) by inducing pores into the fungal membrane (Etienne et al., 2005) and it is an anti-nociceptive peptide (Ghia et al., 2004). CAT and CHR induce extracellular calcium entry into PMNs (Polymorphonuclear neutrophils) *via* store operated channels (Zhang et al., 2009).

The aim of the present study is to identify antimicrobial peptides (AMPs) derived from CGA active in gut infections and to investigate the mechanism of interaction between peptides and pathogens. The study also interest to the role of antimicrobial peptides in potentialization of antibiotics activity.

Materials and methods

Peptide synthesis, purification and analysis

The synthetic peptides corresponding to Chromofungin (CHR), Catestatin (CAT), Cateslytin (CTL) and pro-catestatin were prepared on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Courtaboeuf, France), by using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry (Merrifield, 1965). The synthetic peptides were purified by RP-HPLC on a Dionex system Ultimate 3000 (Germering, Germany) including a Vydac 218 TP column (4.6×250 mm; particle size 3-20 µm and pore size 300 Å). Mobile phase consists of a gradient of solvent B in solvent A. Solvent A corresponds to 0.1%

(vol/vol) trifluoroacetic (TFA) in water and solvent B corresponds to 70% (vol/vol) acetonitrile with 0.09% (vol/vol) TFA. Flow rate is 1.5 mL.min⁻¹.

Bacterial strains

Four strains were isolated from diarrheal patients in Hôpital Civil of Strasbourg and obtained from the team of Dr. Gilles Prévost (Physiopathologie et médecine translationnelle, EA-4438, University of Strasbourg, France): *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholerae* non O1.

Antibacterial activity

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of four peptides against each bacterial strain were determined using the microdilution bioassay. The strains were incubated at 37°C in Mueller Hinton (MH, Merck, Darmstadt, Germany) with shaking for 18h in an incubator (Tritamax 1000 Heidolph, Schwabach, Germany). The antimicrobial activity was tested in a 96-well microplates (Falcon, Becton Dickinson, USA) with 90 µL of a mid-logarithmic-phase culture of bacteria with a calculated starting optical density at 620 nm (OD_{620 nm}) of 0.001 with aqueous peptide solution (10 µl). The concentrations tested are 100, 75, 50, 25, 10 µM (each assay was performed in triplicate and the experiments are repeated minimum three times). Appropriate antibiotic for each strain was used as positive control respectively ciprofloxacin for *K. oxytoca* and *S. sonnei*, cefotaxim (Sigma, Steinheim, United Kingdom for *S. enterica* and tetracyclin (Sigma, Steinheim, United Kingdom) for *V. cholera*. After 18 h at 37°C, the minimal inhibitory concentration (MIC) (the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth) was determined by spectrophotometry (Thermo, Multiscan EX, Shanghai, China) at OD_{620nm}.

Proteolytic degradation

Proteolytic degradation of peptide by bacteria protease was analyzed by RP-HPLC. The peptides used are: the bovine Procatestatins (bCGA332-364), the bovine catestatin (bCGA344-

364), the bovine CTL (bCGA344-358) and chromofungin (bCGA47-66). A preculture was carried out for each strain (*K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei*, *V. cholerae*). Protease activity test is performed from a suspension of 0.001 DO_{620nm} (control) and in the presence of peptide at concentration of 100 µM. After 18 h of culture at 37 ° C under agitation, the culture is stopped. The bacterial broth was centrifuged at 10,000 g for 15 min. The supernatant were analysed by reversed-phase HPLC.

Reverse Phase High performance liquid chromatography (RP-HPLC)

In order to analyze bacterial supernatants we loaded it on a column Macherey Nagel 300-5C18 was used (4 × 250 mm, bead size 5 microns and the pore 100 Å) at room temperature with a flow rate of 0.7 mL.min⁻¹. The eluents used for the gradient are: A, 0.1% (vol/vol) TFA, 99.9% H₂O (vol/vol) and B, 70% (vol/vol) acetonitrile, 0.09% (vol/vol) TFA and 29.91% (vol/vol) H₂O. The gradient is reported on each chromatogram. The conditions tested are Mueller Hinton, Mueller Hinton with bacteria, and Mueller Hinton with bacteria + peptide and peptide only. New peaks identified are collected and analyse by MALDI-TOF and automatic sequencing. Sequences are searched using the software Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

MALDI-MS analysis (MALDI-TOF/TOF UltraflexTM)

The peptide obtained by protease degradation was identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). Mass measurements are performed using MALDI-TOF (UltraflexTM MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). This instrument was used positive reflectron mode with a maximum accelerating potential of 25 kV applied to the target and 26 kV applied to the reflectron. The value of the delayed extraction was optimized to 110 ns to obtain the best resolution of the peptides used for calibration. The laser used was a nitrogen laser (337 nm) operating at a frequency of 20 Hz data acquisition is performed in a mass range from 400 m / z to 4000 m / z, the value of removing matrix being set at 500 m / z. The

mass spectrometer is calibrated using a mixture containing seven peptides (Bruker Peptide Calibration Standard # 206196, Bruker Daltonics) (bradykinin 1-7 ($m/z = 757.400$), human angiotensin II ($m/z = 1046.542$), human angiotensin I ($m/z = 1296.685$), substance P ($m/z = 1347.735$), bombesin ($m/z = 1619.822$), renin ($m/z = 1758.933$), ACTH 1-17 ($m/z = 2093.087$) and ACTH 18-39 ($m/z = 2465.199$)). The mass spectra obtained were processed by the software flexAnalysis 2.4 build 11 (Bruker Daltonics) using the default settings and the SNAP algorithm for the detection of monoisotopic peak. Samples (0.5 μ L) were mixed with matrix (0.5 μ L) are deposited, mixed on the target and dried at atmospheric pressure using the dried droplet method. Two matrix are used, the α -cyano-4-hydroxy-cinnamic (CHCA) (Bruker # 203072) and 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB) (Fluka # 37550). A saturated solution of CHCA matrix in 50/50 H₂O/ACN was diluted three times with H₂O/ACN 50/50 acidified with 0.1% TFA. DHB matrix was prepared at a concentration of 10 mg / ml in H₂O/ACN 50/50.

Peptide-antibiotic combination against diarrheal strains

Effects of peptide-antibiotic combination are studied using CTL as peptide and minocycline (MIN, EG Labo, France). MIC of minocycline is determined by using antibacterial tests. Once it determined the study of the combined effect of peptide and antibiotic is done using concentrations below the MIC. The peptide chosen for these tests is the bovine CTL as having the best activity. These associations were tested: $\frac{1}{2} \text{MIC}_{\text{MIN}} + 10 \mu\text{M}$ of cateslytin, $\frac{1}{2} \text{MIC}_{\text{MIN}} + 25 \mu\text{M}$ of cateslytin, $\frac{1}{4} \text{MIC}_{\text{MIN}} + 10 \mu\text{M}$ of cateslytin, $\frac{1}{4} \text{MIC}_{\text{MIN}} + 25 \mu\text{M}$ of cateslytin. Tests were performed in triplicate in microplate using method described in antibacterial activity paragraph.

Kinetics of peptide and Peptide-Antibiotic action against diarrheal strains

The kinetics of bacterial growth are studied: MH + bacteria, MH + bacteria + $\frac{1}{2} \text{MIC}_{\text{MIN}}$, MH + Bacteria + $\frac{1}{2} \text{MIC}_{\text{MIN}} + \frac{1}{2} \text{MIC}_{\text{CTL}}$. Cultures were brought to 37 ° C with stirring. The

OD_{620 nm} is measured at 1h, 2h, 4h, 8h and 18h and supernatants were analysed using spectrophotometer (Biorad, SmartSpec™ Plus, USA) and RP-HPLC.

Results

Antibacterial activity of the peptides

The four CGA-derived peptides previously indicated were tested on four diarrheal strains. Two of these peptides are antibacterial against three and four strains (Table I). The highest activity was observed for 25 µM CTL against *Shigella sonnei* and we noted that there is a factor of 2 between activity of CAT and CTL. In contrast, Procat and CHR were inactive against the four strains until 100 µM concentration.

Host-pathogen interactions: the degradation of antimicrobial CGA-derived peptides by bacterial proteases

To examine the difference of each peptide activities for the different strains, we analyzed by proteomic methods the fragments generated after incubation of each peptide with the bacterial supernatants. As negative controls, we compared the HPLC chromatograms of MH medium and the supernatants after bacteria growth. We noted no difference between the chromatograms (Figure 1).

The degradation of each peptide after incubation with the four bacteria was reported on Figure 2. ProCAT was degraded after incubation with the four bacteria (Figure 2A) and the new generated peptides are labeled (*). CHR was partially degraded by *Klebsiella* and *Salmonella*, totally by *Vibrio* but resists to *Shigella* (Figure 2D). In contrast, the two active peptides CAT and CTL were slowly degraded by the bacterial proteases (Figure 2B and 2C). Interestingly, the two fragments CAT and CTL are active against these pathogens and are not completely degraded (Figure 2B and 2C).

Characterization of new fragments generated after proteolytic degradation

New peaks resulting of bacterial degradation were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and sequencing (Table II). Concerning the two inactive fragments proCAT and CHR the major clivage points correspond to Arg351-Ala352 / Arg353-Gly354 (for proCAT) and Arg47-I48 / Arg53-His54 for CHR. For CHR, the other fragments present in peaks 4D and 5D might correspond to artefacts resulting of the action of laser during mass spectrometry of the initial fragment 48-67 and for proCAT the fragment 332-340 identified in peak 5A might results of the action of laser during mass spectrometry on the initial fragment 332-351. For the two active peptides CAT and CTL, the major fragments correspond to the complete sequences.

Synergy of cateslytin with minocycline antibiotic

Combinations of different concentrations of active peptides were tested with minocycline in order to investigate a potential synergy. For this each molecule present in the combination was used at a concentration lower than its MIC. The results reported in figure 3 show that CTL allows to increase the antibacterial activity of minocycline. Indeed, 25 μ M CTL in combination with $\frac{1}{4}$ MIC minocyclin inhibits the growth of the four bacteria.

We performed a kinetic study of bacteria growth in presence of $\frac{1}{2}$ MIC of minocycline or $\frac{1}{2}$ MIC of minocycline + $\frac{1}{2}$ MIC CTL during 18 h and compared to growth without antibacterial agents (Figure 4A). The results show that for *K. oxytoca* and *S. enterica*, the combination is more active than the $\frac{1}{2}$ MIC of separate antimicrobial agents. For *V. cholerae* minocycline at a concentration of $\frac{1}{2}$ MIC is unable to inhibit the growth bacteria. In contrast, the activity of the combination $\frac{1}{2}$ MIC of minocycline + $\frac{1}{2}$ MIC CTL is highly increased showing that CTL improve the activity of minocycline. For *S. sonnei*, the combination $\frac{1}{2}$ MIC of minocycline + $\frac{1}{2}$ MIC CTL is unable to improve the activity of $\frac{1}{2}$ MIC of minocycline. These results show that the combination peptide-antibiotic can help reduce the doses of antibiotics.

In order to demonstrate the synergy between minocycline and CTL, we have calculated Fractionary Inhibitory Concentration (FIC) according to the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). FIC allows characterize the different effects of combinations of antibiotics, such as synergy (≤ 0.5), additive ($> 0.5 - 1$), indifference ($>1 - <2$) and antagonism (≥ 2) (EUCAST, 2000).

$$FIC_A = \frac{\text{MIC}_A \text{ in presence of peptide}}{\text{MIC}_A} \quad FIC_P = \frac{\text{MIC}_P \text{ in presence of antibiotic}}{\text{MIC}_P}$$

For each strain, we evaluated FIC ($FIC_A + FIC_P$) and synergy is only confirmed for *Vibrio cholerae*. Additive effects are characterized for other species (Figure 3).

To complete these studies, we analyzed the degradation of CTL during its interaction with bacteria. After 8 h of incubation of peptide or combination with bacteria, CTL is not degraded. However, after 18 h of incubation with bacteria, peptide alone is degraded, but minocycline protect it against degradation by bacterial proteases (Figure 4). We illustrate these data by the effect of the combination against *Salmonella*, but similar data were observed for other bacterial strains (data not shown).

Discussion

This study demonstrates that AMPs derived from CGA, CAT and CTL develop antimicrobial activity against pathogenic strains that induce infectious intestinal diseases. These two peptides are 21 and 15 amino acids long respectively, cationic and act probably by electrostatic interaction with bacterial membrane rich in negatively charged phospholipids. This interaction is probably responsible of this antibacterial activity by pores as described for others AMPs (Shai, 1999; Zasloff, 2002). Protease degradations studies show that, part of these peptides is degraded. We can suppose that protection of CAT and CTL may increase

their activities as it is observed for LL-37 with 4 to 7 tryptophan (Pasupuleti et al., 2009) or kininogen derived peptides (Schmidtchen et al., 2009).

Minocycline leads to tetracycline family and acts by inhibiting bacterial protein synthesis. Minocycline synergy with peptide has already been observed with colistin for imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate (Tan et al., 2007).

Numerous studies show that the synergy between compounds may be useful to potentiate the activity of known antimicrobials. Example for antibiotic-antimicrobial peptides combination (Cassone and Otvos), antibiotic-natural products derived from plants (Hemaiswarya et al., 2008). This study suggests for the first time that CGA-derived peptides might be used in combination therapy with antibiotics. It would be interesting then to extend the study to several of antibiotics and bacteria and understand how the peptide potentializes antibiotic activity and how antibiotic protects degradation of CTL.

In conclusion, this study permits to identify two peptides derived from chromogranin A whose possess antimicrobial activity against intestinal pathogens. Interactions between peptide and bacteria are studied and CTL, the most active peptide are proposed to be used with antibiotics such as minocycline to increase antibiotic activity. These results open promising new ways.

Figures Legends

Figure 1: Analysis by HPLC of MH alone and in presence of bacterial strains (*K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei* and *V. cholerae*) after 18h growth. The HPLC system is composed by a Dionex chromatography, (Germering, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 µm, porosity 300 Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 µL min⁻¹ using the gradient as indicated on the chromatograms: Chromatograms of *K. oxytoca*, *S. enterica*, *S. sonnei* and *V. cholerae* growths compared to Mueller Hinton (MH).

Figure 2: Analysis by HPLC of the pro-catestatin (A6), catestatin (B6), cateslytin (C6) chromofungin (D6) and degradation by *K. oxytoca* (A2, B2, C2, D2), *S. enterica* (A3, B3, C3, D4), *S. sonnei* (A4, B4, C4, D4) and *V. cholerae* (A5, B5, C5, D5) compared to control (bacteria growth, A1, B1, C1, D1). The HPLC system is composed by a Dionex chromatography, (Germering, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 µm, porosity 300 Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 µL min⁻¹ using the gradient as indicated on the chromatograms.

Figure 3: Antimicrobial activity of combination of cateslytin and minocycline at different concentration. % of growth inhibition was calculated using OD at 620nm obtained after 18h at 37°C under stirring and was represented in each condition. Control (bacteria growth in Mueller Hinton), MIC (minimal inhibitory concentration of minocycline)

Figure 4: Kinetics of *K. oxytoca* (A), *S. enterica* (B), *S. sonnei* (C) and *V. cholerae* (D) growth with CTL-minocycline compared to growth at half of minocycline MIC concentration and growth without peptide or antibiotic. OD at 620 nm was measured for each condition after 1, 2, 4, 8 and 18 h.

Figure 5: Analysis by HPLC of cateslytin fate alone or with minocycline after 8 and 18 h in presence of *Salmonella enterica*. The HPLC system is composed by a Dionex chromatogram, (Germering, Germany), using a Nucleosil 300-5 C18 column (4×250 mm, particle size 5 µm, porosity 300 Å; Macherey Nagel, Düren, Germany). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 µL min⁻¹ using the gradient indicated on the chromatogram.



References

1. **Aung, G., F. Niyonsaba, H. Ushio, M. I. Hoq, S. Ikeda, H. Ogawa, and K. Okumura.** 2011. A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci* **61**:142-4.
2. **Aung, G., F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Kajiwara, H. Saito, S. Ikeda, H. Ogawa, and K. Okumura.** 2011. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology* **132**:527-39.
3. **Briolat, J., S. D. Wu, S. K. Mahata, B. Gonthier, D. Bagnard, S. Chasserot-Golaz, K. B. Helle, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue.** 2005. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci* **62**:377-85.
4. **Cassone, M., and L. Otvos, Jr.** Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**:703-16.
5. **Etienne, O., C. Gasnier, C. Taddei, J. C. Voegel, D. Aunis, P. Schaaf, M. H. Metz-Boutigue, A. L. Bolcato-Bellemin, and C. Egles.** 2005. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* **26**:6704-12.
6. **EUCAST.** 2000. EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* **6**:503-8.
7. **Ghia, J. E., F. Crenner, M. H. Metz-Boutigue, D. Aunis, and F. Angel.** 2004. Effects of a chromogranin-derived peptide (CGA 47-66) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Regul Pept* **119**:199-207.

8. **Gunell, M., M. A. Webber, P. Kotilainen, A. J. Lilly, J. M. Caddick, J. Jalava, P. Huovinen, A. Siitonen, A. J. Hakanen, and L. J. Piddock.** 2009. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3832-6.
9. **Hemaiswarya, S., A. K. Kruthiventi, and M. Doble.** 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* **15**:639-52.
10. **Hoeningl, M., T. Valentin, G. Zarfel, B. Wuerstl, E. Leitner, H. J. Salzer, J. Posch, R. Krause, and A. J. Grisold.** 2012. Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2158-61.
11. **Horii, T., M. Osaki, and H. Muramatsu.** 2008. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*. *Chemotherapy* **54**:323-7.
12. **Jafari, F., M. Hamidian, M. Rezadehbashi, M. Doyle, S. Salmanzadeh-Ahrabi, F. Derakhshan, and M. Reza Zali.** 2009. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **20**:e56-62.
13. **Kumar, P. A., J. Patterson, and P. Karpagam.** 2009. Multiple antibiotic resistance profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139. *Jpn J Infect Dis* **62**:230-2.
14. **Lugardon, K., S. Chasserot-Golaz, A. E. Kieffer, R. Maget-Dana, G. Nullans, B. Kieffer, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue.** 2001. Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem* **276**:35875-82.
15. **Mahata, S. K., M. Mahata, M. M. Fung, and D. T. O'Connor.** 1997. Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept* **162**:33-43.
16. **Merrifield, R. B.** 1965. Automated synthesis of peptides. *Science* **150**:178-85.

17. **Metz-Boutigue, M. H., P. Garcia-Sablone, R. Hogue-Angeletti, and D. Aunis.** 1993. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem* **217**:247-57.
18. **Pasupuleti, M., A. Schmidtchen, A. Chalupka, L. Ringstad, and M. Malmsten.** 2009. End-tagging of ultra-short antimicrobial peptides by W/F stretches to facilitate bacterial killing. *PLoS One* **4**:e5285.
19. **Radek, K. A., B. Lopez-Garcia, M. Hupe, I. R. Niesman, P. M. Elias, L. Taupenot, S. K. Mahata, D. T. O'Connor, and R. L. Gallo.** 2008. The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol* **128**:1525-34.
20. **Schmidtchen, A., M. Pasupuleti, M. Morgelin, M. Davoudi, J. Alenfall, A. Chalupka, and M. Malmsten.** 2009. Boosting antimicrobial peptides by hydrophobic oligopeptide end tags. *J Biol Chem* **284**:17584-94.
21. **Shai, Y.** 1999. 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* **1462**:55-70.
22. **Simon, J. P., and D. Aunis.** 1989. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem J* **262**:1-13.
23. **Strub, J. M., O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue.** 1997. Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J Biol Chem* **272**:11928-36.
24. **Tan, T. Y., L. S. Ng, E. Tan, and G. Huang.** 2007. In vitro effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **60**:421-3.

25. **Yigit, H., A. M. Queenan, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover.** 2003. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3881-9.
26. **Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389-95.
27. **Zhang, D., P. Shooshtarizadeh, B. J. Laventie, D. A. Colin, J. F. Chich, J. Vidic, J. de Barry, S. Chasserot-Golaz, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, F. Schneider, K. Helle, D. Aunis, G. Prevost, and M. H. Metz-Boutigue.** 2009. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One* **4**:e4501.

Table I: Minimal inhibitory concentration (MIC in μM) of Pro-catestatin, catestatin, cateslytin and chromofungin on four diarrheal strains. MIC was determined by measuring OD at 620 nm by using spectrophotometer after 18 h of incubation in MH medium. The total charge of each peptide is indicated.

	MIC (μM)			
	<i>K. oxytoca</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholera</i>
Catestatine CGA ₃₄₄₋₃₆₄ RSMRLSFRARGYGFRGPGPQL (+5)	100	100	50	>100
Cateslytine CGA ₃₄₄₋₃₅₈ RSMRLSFRARGYGFR (+5)	50	50	25	75
Procatestatine CGA ₃₃₂₋₃₆₄ LEEEEEEDPDRSMRLSFRARGYGFRGPGQL (-4)	>100	>100	>100	>100
Chromofungine CGA ₄₇₋₆₆ RILSILRHQNLLKELQDLAL (+2)	>100	>100	>100	>100

Figure 1

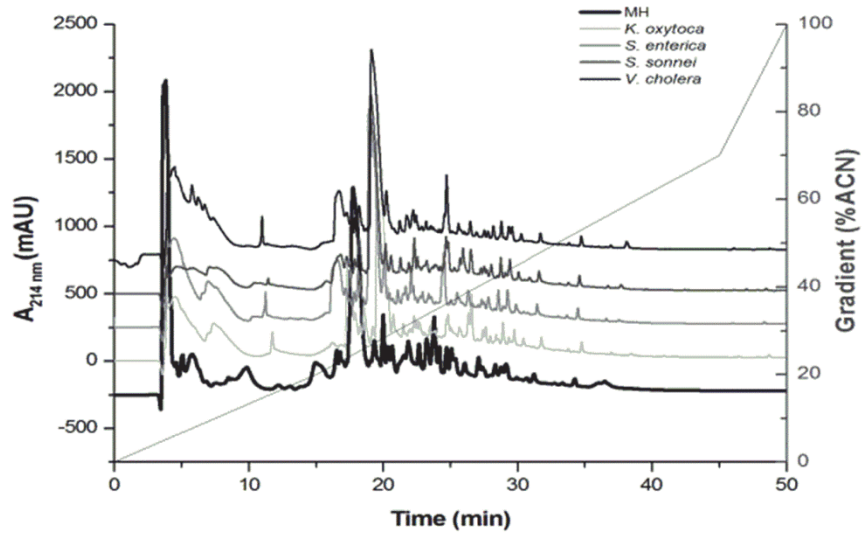


Figure 2

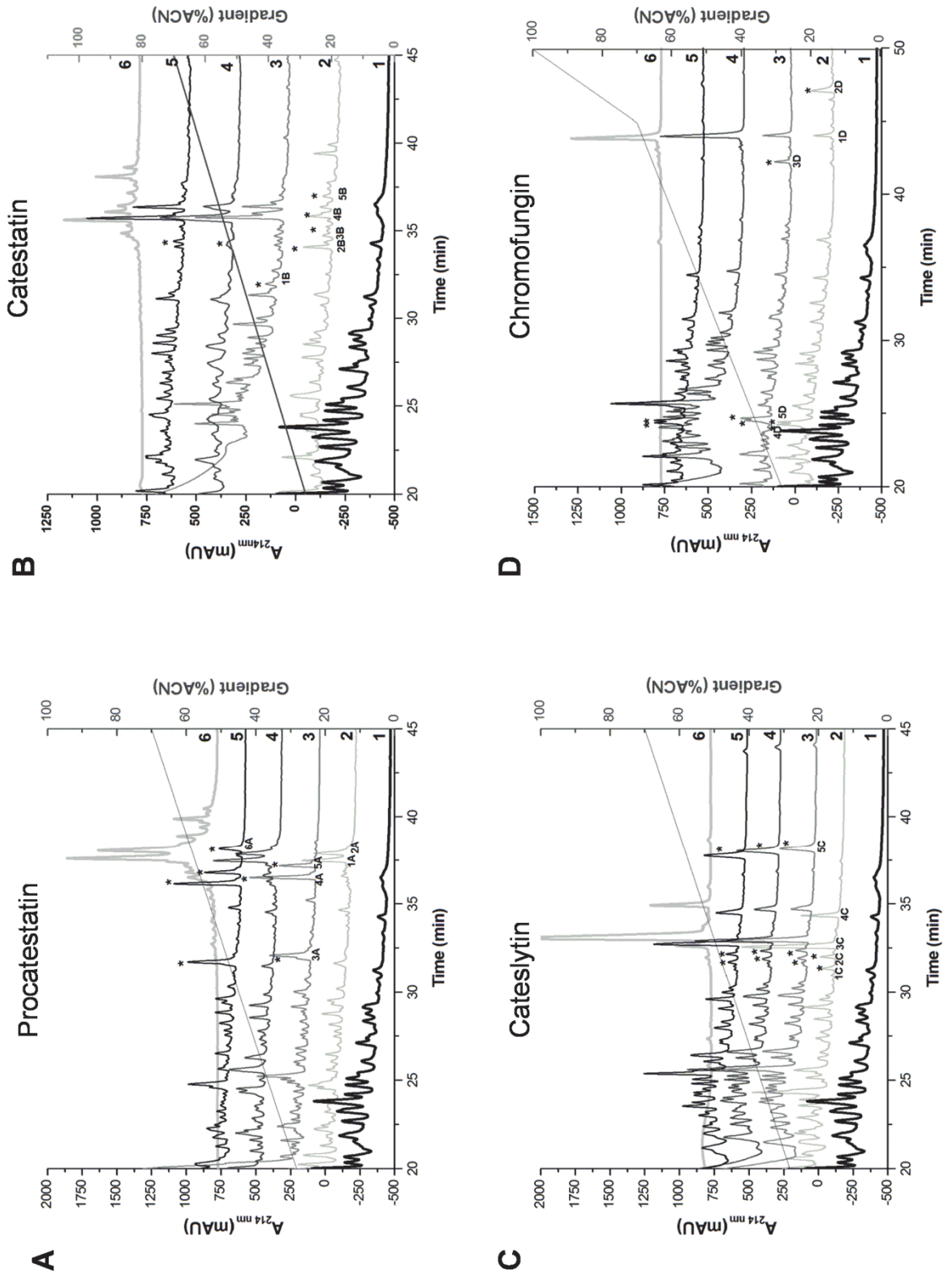


Figure 3

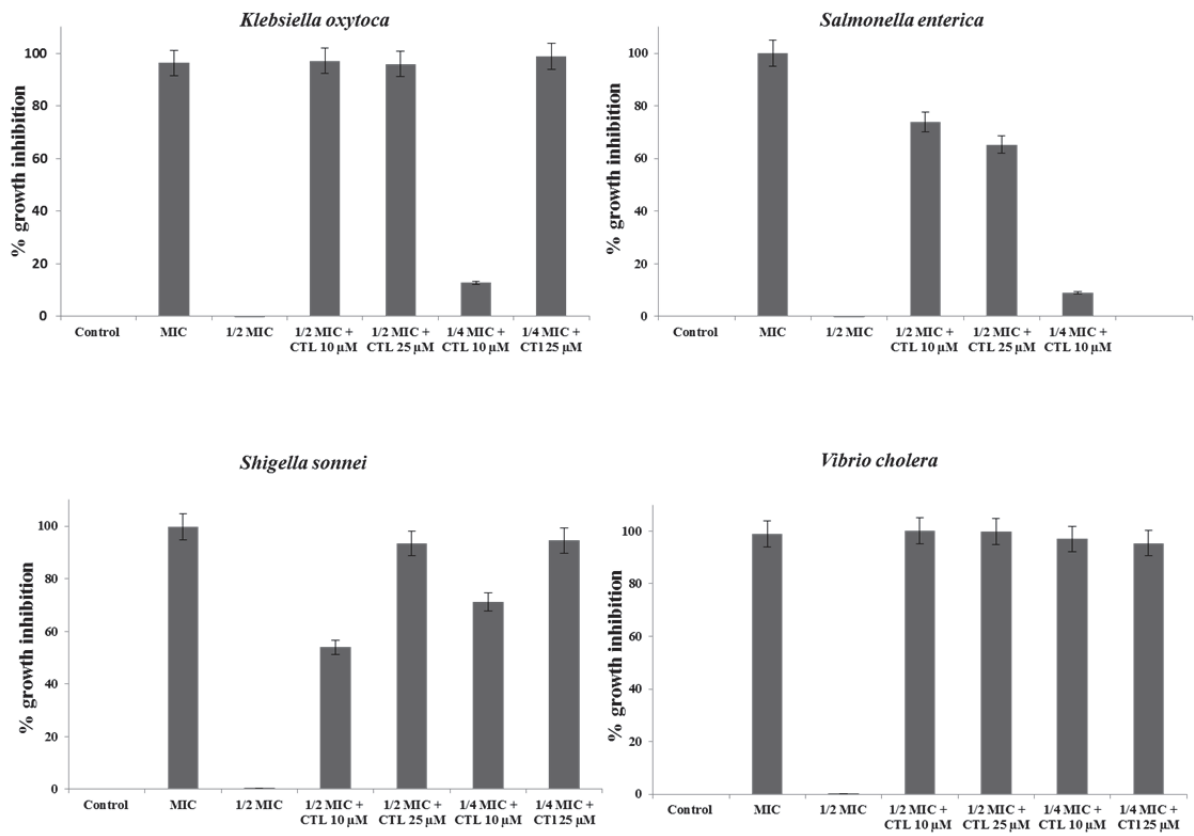


Figure 4

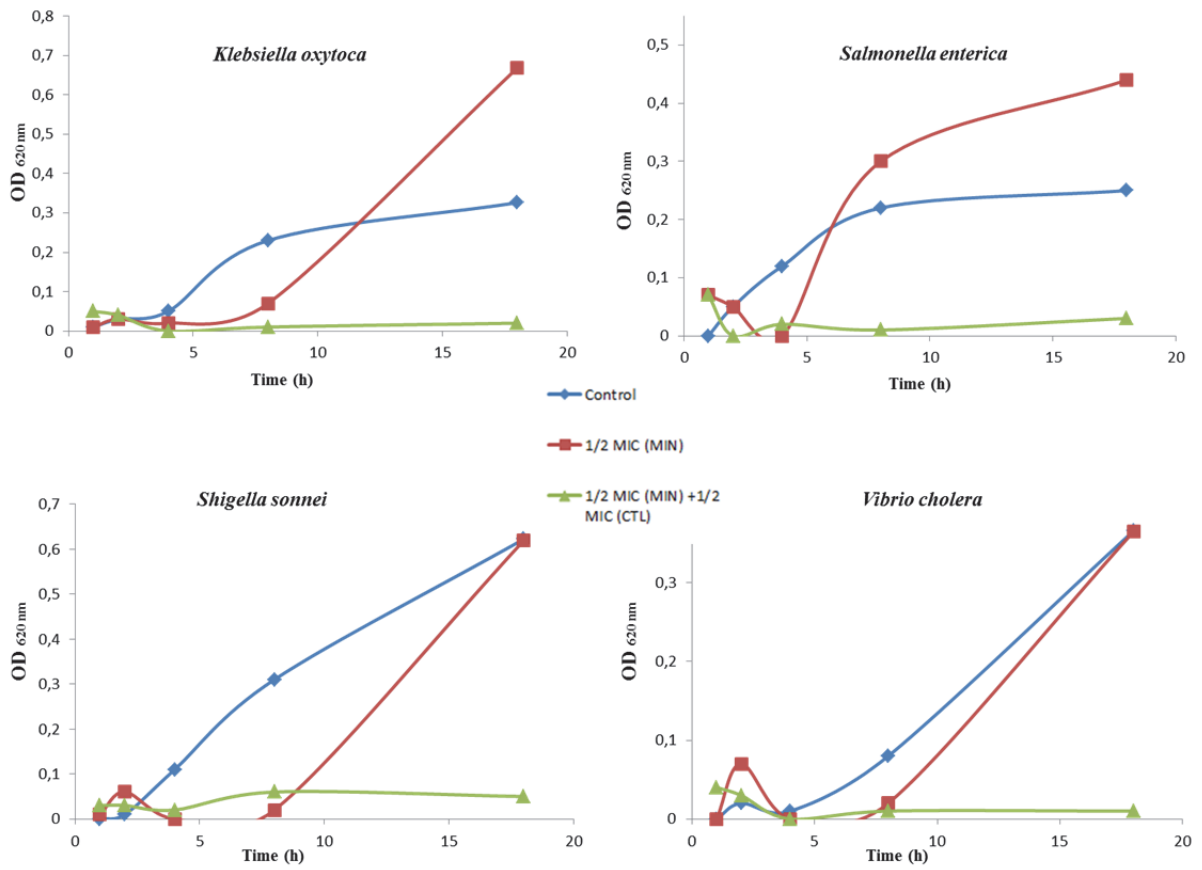
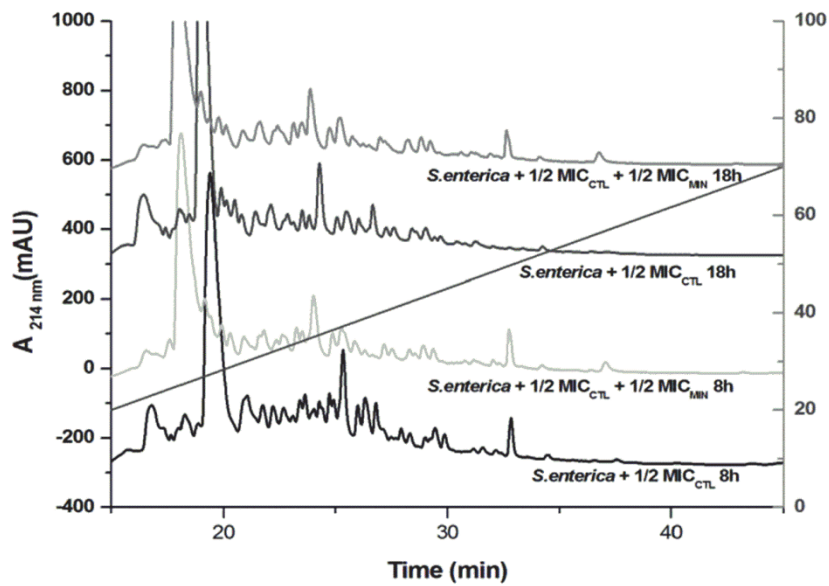


Figure 5



Manuscrit 4

Characterization of two flavonoids from *Chromolaena odorata* (Asteraceae), active against four diarrheal strains

(à soumettre pour évaluation à International Journal of Antimicrobial Agents)

Ménonvè Atindehou^{1, 2}, Latifou Lagnika², Bernard Guérold¹, Jean Marc Strub³, Eric Marchioni⁴, Minje Zhao⁴, Alain Van Dorsselaer³, Gilles Prévost⁵, Youssef Haikel^{1, 6}, Ambaliou Sanni², Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

Les plantes médicinales sont couramment utilisées au Bénin dans le traitement de nombreuses maladies. Le travail présenté dans cet article a pour but d'identifier les principes actifs d'une plante couramment employée en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies intestinales. L'étude préliminaire a consisté à analyser 14 plantes choisies après une enquête ethnopharmacologique. Les plantes récoltées dans leur habitat naturel sont séchées à l'abri de la lumière, broyées puis extraites avec différents solvants organiques (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et butanol), permettant l'obtention de quatre types d'extraits. Les concentrations minimales inhibitrices des quatre types d'extraits de chaque plante, sur quatre souches bactériennes (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera* non O1) ont été déterminées.

Parmi ces plantes, *Chromolaena odorata*, qui fait partie des plantes les plus actives et qui est peu étudiée, a été choisie pour isoler et caractériser les principes actifs grâce à un isolement bioguidé, des méthodes chromatographiques, l'analyse par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Deux molécules responsables de l'activité de cette plante ont été identifiées: la sinésentine et l'O-tétraméthyléther scutellaréine.

Characterization of two flavonoids from *Chromolaena odorata* (Asteraceae), active against four diarrheal strains

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Latifou Lagnika², Bernard Guérold¹, Jean Marc Strub³, Eric Marchioni⁴, Minjie Zhao⁴, Alain Van Dorsselaer³, Gilles Prévost⁵, Youssef Haikel^{1,6}, Ambaliou Sanni², Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

(1) Université de Strasbourg, Biomatériaux et Ingénierie tissulaire, UMR Inserm 977, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

(2) Université d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, LBBM, 04-BP 320 Cotonou, Bénin

(3) Université de Strasbourg, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7178, ECPM, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France

(4) Université de Strasbourg, Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives, CNRS UMR 7178, IPHC, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400, Illkirch, France

(5) Université de Strasbourg, Laboratoire de Bactériologie, Université de Strasbourg, EA-4438, 3 Rue Koeberlé, France,

(6) Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

* Corresponding author, Marie-Hélène Metz-Boutigue, marie-helene.metz@inserm.fr

Tel: 33 3 68 85 54 71; Fax: 33 3 68 85 54 72

Keywords: *Chromolaena odorata*, flavonoid, antibacterial activity, mass spectrometry, HPLC, NMR

Abbreviations

Abstract

Chromolaena odorata belongs to the family of Asteraceae. It is a bad invasive plant species, found in the humid tropics and sub-tropics of the world. It is used against dysentery and diarrhea, malaria, wound healing, headache and toothache in traditional medicine. Different extracts by organic solvents of *Chromolaena odorata* leaves (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) were studied by determining the minimal inhibitory concentration against four clinical diarrhea strains. These extracts show an antibacterial activity between 0.156 and 1.25 mg/mL. Bioassay-guided chromatography by bioautography with iodinitrotetrazolium-based colorimetric assay allowed to find two active compounds. These compounds were isolated by RP-HPLC and characterized using chromatography, mass spectrometry and 1D, 2D-NMR spectroscopy. It consists of two flavonoids, Sinensetin and Scutellarein tetramethylether.

1. Introduction

Traditional medicine in Benin like in several countries in Africa and Asia contains remedies based mainly on medicinal plants. According to the World Health Organization (WHO), 80% of the African population use medicinal plants for the primary health needs and 40% of prescriptions in China are based on medicinal plants (WHO, 2004). 75% of Germans have used complementary or natural remedies (Tuffs, 2002) and in United States more than 158 million Americans spent 17 billion \$ for complementary and alternative therapy products (Marwick, 2002). These studies reflect

the importance of medicinal plants, which have many properties such as antimicrobial activity, antioxidant, antitumor, anti-inflammatory according to the organic compounds present. These studies reflect the importance of medicinal plants. In our study, we took interest in *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Robinson (formerly *Eupatorium odoratum*). *C. odorata* is an invasive weed that causes many problems in agriculture, but is used in traditional medicine. An ethnopharmacological survey in Benin showed that it is mainly used to treat intestine diseases, malaria, wounds and skin diseases. In Vietnam, fresh leaves or their decoction have been used throughout for the treatment of leech bite, soft tissue wounds, burning wounds, skin infection and dentoalveolitis (Sharma et al., 1998). A study in Northern Thailand shows that *C. odorata* is used in the primary healthcare of postpartum women. Interviews of many users mentioned activity on indigestion and peptic ulcer wounds, bleeding stoppage, healing acceleration, refreshing (Panyaphu et al., 2011).

Few studies demonstrated that *C. odorata* leaves extracts display antimicrobial activities against *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* (Irobi, 1992), *Neisseria gonorrhoeae* (Cáceres et al., 1995) and an aqueous ethanol extract displays an antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* (Ngono Ngane et al., 2006). In addition, methanol-dichloromethane (1:1) extract of root of *C. odorata*, showed a significant activity against *E. coli* and *S. typhi* (Wafu et al., 2011).

Furthermore *C. odorata* reduces oedema in rats and shows anti-inflammatory activity (Owoyele et al., 2005) explained by presence of fatty acid components with NF- κ B inhibitory activity (Hanh et al., 2011). It consistently contributes to wound healing (Thang et al., 1996), hemostasis and blood coagulation. It also has an antioxidant activity (Srinivasa Rao et al., 2009) and cytotoxic effects against cancerous cells (Hung

et al., 2011; Suksamrarn et al., 2004). Many flavonoids are identified in extracts of *C. odorata*. There are antimycobacterial, cytotoxic against tumor cells, antioxidant (Hung et al., 2011; Yuan et al., 2007).

Bacteria species responsible for infectious diseases are continuously developing resistance to the commonly used antimicrobial agents and it is crucial to discover new antimicrobial agents to overcome the overwhelming drug resistance. Four diarrheal strains are studied, namely *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholerae*.

All the four above mentioned bacteria are Gram-negative and are commonly associated with the dysentery. *K. oxytoca* is held responsible for colitis urinary tract infections, respiratory diseases, post-antibiotic diarrhoea and nosocomial infections (Gorkiewicz, 2009). It has also been associated with hemorrhagic colitis (Hoffmann et al., 2010) and recurrent colitis in Crohn's disease (Plessier et al., 2002). *S. enterica* and *S. sonnei* are also discovered in the infected intestinal tracts of patients. The fourth one, non-O1 *Vibrio cholerae* is associated with sporadic cases of gastroenteritis and extra-intestinal infections (Tan et al., 1994).

In this study, we focus on the antibacterial activities of *Chromolaena odorata* against *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholerae*. After determination of minimal inhibitory concentration and bioguided isolation of active compounds, these compounds were characterized by mass spectrometry, gas-chromatography and NMR.

2. Material and methods

2.1. Plants material

Chromolaena odorata is collected during the rainy season in Abomey-Calavi (Benin). Leaves were dried in the laboratory in the dark to avoid degradation of the active ingredients under the influence of light. Dried plants were powdered in a blender. The taxonomic identification and voucher deposit numbered AA6390HNB were stored at the National Herbarium of Abomey-Calavi in Benin.

2.2. Preparation of plant extracts

The extraction method used is a fractioning by various organic solvents (from nonpolar solvents to the most polar ones) in a split stirred at room temperature: cyclohexane (C₆H₁₂), dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (C₄H₈O₂), and butanol (C₄H₁₀O). 50 g of air-dried powdered were stirred (IKA KS260 Basic, Staufen, Germany) in cyclohexane (150 ml) for 1 hour at room temperature and then filtered. The operation is repeated twice. The filtrate is dried in a rotary evaporator (Stuart RE 300, Staffordshire, UK). The residue of this first extraction is dried under the hood and used for extraction with dichloromethane. The same operations are repeated for the four extraction solvents.

2.3. Bacterial strains

Four strains (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, and *Vibrio cholera*) were isolated from diarrheal patients in the Civilian Hospital of Strasbourg (France) and obtained from the team of Dr. Gilles Prévost (Physiopathologie et Médecine translationnelle-EA-4438, Université de Strasbourg, France).

2.4. Antibacterial assay

Minimum inhibitory concentrations of plants extracts against each bacteria were determined by using the microdilution bioassay. A colony of each strain is incubated at

37°C in Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstadt, Germany) with shaking at 300 rpm for 18 hours in an incubator (Tritamax 1000, Heidolph, Germany). The bacterial activity was tested in a 96 wells microplate with 100 µL of bacteria at 0.001 at 620 nm. Extracts were suspended in 10% acetone and 90% water and dilution was realized in MHB. The extracts concentrations tested are 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 mg/mL and each assay was performed in triplicate. Cefotaxime (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) was used as positive control. Bacterial growth in absence of antibacterial agents is used for control and 10% acetone were also tested. After 18 hours of incubation under shaking, the MIC was determined by addition of Iodonitrotetrazolium chloride (INT, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) according to procedures described for INT (Begue and Kline R.M., 1972). 40 µl of Iodonitrotetrazolium chloride at 0.2 mg/ml were added and plates were incubated during 1 hour at 37°C. Iodonitrotetrazolium salt acts as an electron acceptor and is reduced to a red coloured formazan product by biologically active organisms. Bacterial growth in the wells was indicated by a reddish-pink colour. The MIC was recorded as the lowest concentration of plant extract at which the color does not change to red after the addition of INT.

2.5. Gel filtration in Sephadex G-25 superfine

Plants extracts were purified by using Sephadex G-25 (GE Healthcare, Sephadex™ G-25 Superfine, Uppsala, Sweden). The Sephadex G-25 superfine was washed with solvent 1 (CHCl₃/ CH₃OH/ H₂O; 60:30:4.5 v/v/v) and suspended in the same solution. In the glass chromatography column was introduced a glass wool and mounted on Sephadex gel (0.9 cm x 3.5 cm). 20 mg of each extract was suspended in solvent 1 and loaded on Sephadex column. Elution were performed with 5 mL of solvent 1, then 2.5 ml of solvent 2 (CHCl₃/CH₃OH; 2:1 v/v) and finally 2.5 ml of solvent 3 (CHCl₃/

CH₃OH/ H₂O; 40:35:10 v/v/v). Each eluted fraction is dried under a stream of nitrogen with N-EVAP model 111 (Organomation Assoc.INC, Berlin South, USA).

2.6. Bidimensional thin-layer chromatography

The two-dimensional chromatography is performed for better separation of different compounds present. Dried fractions were solubilized with solvent 2 (30-50 µl) and loaded on glass plates, Kieselgel 60 F254 HPTLC (10 cm x 10 cm) or TLC (20 cm x 20 cm) (Merck, Darmstadt, Germany). The silica plates were developed in a pre-saturated vertical twin-trough glass chamber 25 cm x 25 cm x 10 cm (Camag, Muttenz, Switzerland) containing 35 ml of solvent 4 (CHCl₃ / (CH₃)₂CO; 95:5 v/v) for first dimension. After total migration, plates are dried and placed in solvent 5 ((C₂H₅)₂O/ CH₃OH/ CH₃COOH; 90:1:2 v/v/v). Detection of compounds is obtained by UV light at 365 nm.

2.7. Bioautography

Plants extracts activity against bacteria is determined in accordance with the previously described bioautography procedure (Begue and Kline R.M., 1972). *Salmonella enterica* (OD_{620 nm}=0.01) in Mueller Hinton Broth with 0.7% agar (Gibco, Paisley, Scotland) were sprayed on HPTLC plates. The plates were incubated at 37°C at 100% relative humidity. After 18 hours, plates were sprayed with a 1 mg/ml solution of INT. Inhibition of growth was indicated by clear zones on the chromatogram after incubating for 1 hour.

The inhibition zones identified by bioautography on HPTLC plates were scraped on the TLC plates previously prepared in parallel and passed through column. The compounds were eluted with methanol and then dried by N-Evap, suspended in a

◆ mixture of isopropanol, trifluoroacetic acid (TFA) and H₂O (30:0.1: 69.9 v/v/v) of the HPLC, centrifuged at 15.000 rpm for 15 min.

2.8. RP-HPLC

The supernatants are analyzed by HPLC using DIONEX Ultimate 3000 to separate eventual mixture. The column is a Vydac C18 218TP510 Grace (Davidson, USA) and the particle size between 3 and 20 μm and the pore diameter is 300 Å. The detection wavelength is 254 nm. Two solvents are used: Solvent A, Isopropanol 30%, TFA 0.1%, 69.9% H₂O. Solvent B: Isopropanol 90 %, 9.991 %; H₂O; 0.09%.

2.9. MALDI-MS analysis (MALDI-TOF/TOF Ultraflex™)

Mass measurements are performed using MALDI-TOF (Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). This instrument was used with a positive reflectron and a maximum accelerating potential of 25 kV applied to the target and 26 kV applied to the reflectron. The value of the delayed extraction was optimized to 110 ns to obtain the best resolution of the peptides used for calibration. The laser used was a nitrogen laser (337 nm) operating at a frequency of 20 Hz and data acquisition is performed in a mass range from 100 m/z to 500 m/z, the value of removing matrix being set at 500 m/z. peak.

Extracts (0.5 μL) were mixed with matrix (0.5 μL) deposited on the target and dried at atmospheric pressure using the dried droplet method. Two matrices are used, the α-cyano-4-hydroxy-cinnamic (CHCA) (Bruker Daltonics. Coventry, UK) and 2, 5-dihydrobenzoic acid (DHB) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). A saturated solution of CHCA matrix in H₂O/CAN, 1/1 was diluted three times with H₂O/ACN 50/50 acidified with 0.1% TFA. DHB matrix was prepared at a concentration of 10 mg/ml in H₂O/ACN, 1/1.

2.10. Gas chromatography-electron impact MS.

MS analyses were performed using an Agilent Technologies 78901A (Santa Clara, CA, USA) gas chromatograph equipped with a split/splitless programmed temperature injector and an Agilent J&W DB5MS fused silica column (30 m by 0.25 mm; film thickness, 0.25 μm) connected to an JEOL Accutof JMS-T100GCV spectrometer (ChemSW, Inc., Fairfield, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron impact mode at 70 eV, and spectra were recovered over a mass range from m/z 35 to 700 with a cycle time of 0.4 scans/ s. The oven temperature was programmed to increase from 80 to 300°C at a rate of 10°C/ min, and then the oven was kept isothermal for 8 min. The other conditions were as follows: helium split, 1:10; constant flow rate, 1 ml/min; transfer line temperature, 280°C and MS source temperature, 250°C. Samples were injected with an autoinjector at 280°C using the split mode with a ratio of 1:5.

2.11. Spectroscopy NMR

The two isolated compounds were dissolved in CDCl_3 and analysed using a BRUKER Avance III 500 MHz equipped with CapNMRTM Protasis 5 μl Probe Head (Savoy, IL, USA).

Results

3.1. Antibacterial activity of *Chromolaena odorata* extracts.

C. odorata leaves extracts shows antibacterial activity between 0.156 and 1.25 mg/ml against *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* (Table I). The best activities are for dichloromethane extract (MIC= 156 $\mu\text{g/ml}$) and butanol extract (MIC=312 $\mu\text{g/ml}$) against *V. cholerae*.

3.2. Separation of organic compounds of each extract

The thin layer chromatography of these four extracts shows that each extract was composed of several compounds (Figure 1). These compounds can lead to organic compound families as flavonoids, tanins, saponins, coumarins...

3.3. Bio-guided isolation of active molecules against *Salmonella enterica*.

Bioautography realized on chromatography plate with these extracts after two dimensional migration sprayed with *Salmonella enterica* in Mueller Hinton Broth with 0.7% agar, incubation 18 hours at 37°C at 100% relative humidity and revelation with INT 1 mg/mL permit to identify inhibition zones of bacteria growth. This experiment shows two inhibition zones named Cp 1 and Cp 2 (Figure 2A). Cp 1 and Cp 2 were recovered and isolated in RP-HPLC (Figure 2B). Only one peak is observed for each inhibition zone.

3.5. Characterization of active molecules by NMR analysis

Structural determination enables to identify two flavonoids from *Chromolaena odorata*: sinensetin and Scutellarein tetramethylether (Figure 3). The complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra were achieved with the help of COSY, NOESY and HSQC. Synthetic compounds (Sinensetin and Scutellarein tetramethylether) are purchased from Extrasynthese (Genay, France), analysed by NMR and compared to the identified compounds. The same spectra are observed. This identification show that Cp 1 is pure and Cp 2 contains two molecules which Scutellarein tetramethylether is in majority.

Compound 1: δ 7,49 (1H, dd, $J = 17, 4 \text{ Hz}$, Hc), 7,31 (1H, d, $J = 4 \text{ Hz}$, He), 6,95 (1H, dd, $J = 17 \text{ Hz}$, Hd), 6,78 (1H, s, Ha), 6,60 (1H, s, Hb), 3,97 (6H, s, $^1\text{OCH}_3$, $^3\text{OCH}_3$), 3,96 (3H, s, $^5\text{OCH}_3$), 3,94 (3H, s, $^4\text{OCH}_3$), 3,90 (3H, s, $^2\text{OCH}_3$).

Compound 2: δ 7,82 (2H, d, J = 18 Hz, Hc), 7,00 (2H, d, J = 18 Hz, Hd), 6,79 (1H, s, Ha), 6,68 (1H, s, Hb), 3,97 (6H, s, $^1\text{OCH}_3$, $^3\text{OCH}_3$), 3,90 (3H, s, $^2\text{OCH}_3$), 3,87 (3H, s, $^4\text{OCH}_3$).

4. Discussion

Strains used in this study were recently demonstrated to possess resistance against antibiotics. As in 2011 Younes demonstrated that *K. oxytoca* isolated from the patients in Scotland have resistance to the cefotaxime and ceftazidime, which is due to the presence of cefotaximase, and it's also resistant to the fluoroquinolones [21]. However resistance phenomena of *Salmonella* have been reported in the United States for ciprofloxacin in studies for the last decade [22]. Some strains of *Shigella* have got antibiotic resistance to tetracycline and trimetropine-sulfamethoxazole. Another study in China in Zhejiang province shows resistance of *Shigella* to multiple antibiotics such as aztreonam (30.8%), ampicillin (92.3%), piperacillin (61.5%), ceftazidime (30.8%), cefotaxime (30.8%), and gentamicin (53.8%). *V. cholerae* is also developing multiple drug resistances against antibiotics as reported by Lamrani in 2010 [23]. It is also important to find active treatments.

Screening of antibacterial activities of plants is important to discover new antimicrobial compounds. *C. odorata* is a plant rich in flavonoids and several studies have identified several types of flavonoids in the leaves of *Chromolaena odorata*. The two compounds identified in this study belong to the flavonoid family. Flavonoids are polyphenolic compounds more represented in vegetable and some flavonoids isolated from medicinal plants show important biological activities as antibacterial, antifungal, antiallergy, anti-inflammatory, antiviral, anticancer, antioxidant. A review described in details the role of flavonoids in many studies and these actions on individual cell types.

In bowel inflammation disease, flavonoids exert anti-inflammatory activity (Gonzalez et al., 2011). The two flavonoids identified, sinensetin and tetramethylether scutellarein have already been identified in a chemical study (Barua et al., 1978). They are not well described but are quoted as having anticancer, antioxidant properties and recently, in prevention of obesity (Kang et al., 2012); but there is very little data on their antibacterial property. The mechanism by which they act is unknown but presumably they use one of the mechanisms described for flavonoids in general. Several mechanisms involved in flavonoids' antibacterial activity. The first mechanism implicated is alteration of cytoplasmic membrane. This alteration can be caused by perforation of lipid bilayer (Ikigai et al., 1993) or reduction of membrane fluidity (Tsuchiya and Inuma, 2000) leading some processes such as autolysis or direct cytoplasmic membrane damage/ cell wall effects and cytoplasmic lysis (Cushnie and Lamb, 2011). Other mechanisms identified are inhibition of nucleic acid synthesis due to topoisomerase inhibition (Bernard et al., 1997) or a binding with a DNA site as quercetin binding on DNA gyrase (Plaper et al., 2003). The inhibition of energy metabolism is also implicated for example by NADH-cytochrome c reductase inhibition (Haraguchi et al., 1998).

In conclusion, this study establishes antibacterial activity of *C. odorata* against four diarrheogenic pathogens strains and validates traditional use of this plant in the treatment of intestinal infectious diseases. Bioguided isolation by chemical and biological methods enable to characterize two flavonoids, sinensetin and scutellarein tetramethylether as responsables for the antibacterial activity. This study shows for the first time that sinensetin and scutellarein tetramethylether have an antibacterial activity but the mechanisms by which they act remain to be elucidated.



Figures legends

Figure 1: Detection at 365 nm of thin layer chromatography of *Chromolaena odorata* extracts's (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) in $\text{CHCl}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 95:5 v/v. Many compounds are visible.

Figure 2: Bidimensional migration of *Chromolaena odorata* extracts. Results of bioautography test against *Salmonella enterica* shows two inhibition spots named Compound 1 (Cp 1) and Compound 2 (Cp 2) which are antibacterial activities. These compounds A and B are isolated by HPLC using DIONEX ultimate 3000 System and column Vydac C18 218TP510 (particle size 3-20 μm , pore diameter is 300 Å) at 254 nm. Elution was obtained with Solvent A (Isopropanol 30%, TFA 0.1%, 69.9% H_2O) and Solvent B (Isopropanol 90 %, 9.991 %; H_2O ; 0.09%) with the gradient indicated by dashed line and flow is 1.5 ml/mn.

Figure 3: Compound 1, Sinensetin and Compound 2, Tetramethylether scutellarin are identified using Maldi-Tof, GC-EI and NMR

References

- [1] WHO. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva: World Health Organization; 2004.
- [2] Tuffs A. Three out of four Germans have used complementary or natural remedies. *Bmj*. 2002;325:990.
- [3] Marwick C. US report calls for tighter controls on complementary medicine. *British Medical Journal*. 2002;324:870.
- [4] Sharma O, Dawra R, Kurade N, Sharma P. A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. *Nat Toxins*. 1998; 6:1-14.
- [5] Panyaphu K, On TV, Sirisa-ard P, Srisa-nga P, ChansaKaow S, Nathakarnkitkul S. Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *J Ethnopharmacol*. 2011;135:226-37.
- [6] Irobi O. Activities of *Chromolaena odorata* (Compositae) leaf extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1992;8 1-83.
- [7] Cáceres A, Menéndez H, Méndez E, Cohobón E, Samayoa B, Jauregui E, et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethnopharmacol*. 1995;48:85-8.
- [8] Ngono Ngane A, Ebelle Etame R, Ndifor F, Biyiti L, Amvam Zollo PH, Bouchet P. Antifungal Activity of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson(Asteraceae) of Cameroon. *Chemotherapy*. 2006;52:103-6.
- [9] Wafo P, Kamdem RS, Ali Z, Anjum S, Begum A, Oluyemisi OO, et al. Kaurane-type diterpenoids from *Chromoleana odorata*, their X-ray diffraction studies and potent alpha-glucosidase inhibition of 16-kauren-19-oic acid. *Fitoterapia*. 2011;82:642-6.

- [10] Owoyele VB, Adediji JO, Soladoye AO. Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*. *Inflammopharmacology*. 2005;13:479-84.
- [11] Hanh TT, Hang DT, Van Minh C, Dat NT. Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4:760-3.
- [12] Thang TP, Margaret AH, George WC, Trung T. Le, Pham HM. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 1996;2:335-43.
- [13] Srinivasa Rao K, Chaudhury PK, Pradhan A. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. *Food Chem Toxicol*. 2009;48:729-32.
- [14] Suksamrarn A, Chotipong A, Suavansri T, Boongird S, Timsuksai P, Vimuttipong S, et al. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch Pharm Res*. 2004;27:507-11.
- [15] Hung TM, Cuong TD, Dang NH, Zhu S, Long PQ, Komatsu K, et al. Flavonoid glycosides from *Chromolaena odorata* leaves and their in vitro cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;59:129-31.
- [16] Yuan JQ, Yang JS, Miao JH. [Studies on flavonoids of *Eupatorium odoratum* L]. *Zhong Yao Cai*. 2007;30:657-60.
- [17] Gorkiewicz G. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33 Suppl 1:S37-41.
- [18] Hoffmann KM, Deutschmann A, Weitzer C, Joainig M, Zechner E, Hogenauer C, et al. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*. 2010;125:e960-3.
- [19] Plessier A, Cosnes J, Gendre JP, Beaugerie L. [Intercurrent *Klebsiella oxytoca* colitis in a patient with Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2002;26:799-800.

- [20] Tan KK, Sin KS, Ng AJ, Yahya H, Kaur P. Non-O1 *Vibrio cholerae* septicaemia: a case report. Singapore Med J. 1994;35:648-9.
- [21] Begue WJ, Kline R.M. The use of tetrazolium salts in bioautographic procedure. Journal of chromatography. 1972; 64:182-4.
- [22] Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011;51:331-62.
- [23] Barua RN, Sharma RP, Thyagarajan G, Hertz W. Flavonoids of *Chromolaena odorata*. Phytochemistry. 1978;17:1807-8.
- [24] Kang SI, Shin HS, Ko HC, Kim SJ. Effects of Sinensetin on Lipid Metabolism in Mature 3T3-L1 Adipocytes. Phytother Res. 2012.
- [25] Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim Biophys Acta. 1993;1147:132-6.
- [26] Tsuchiya H, Iinuma M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. Phytomedicine. 2000;7:161-5.
- [27] Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2011;38:99-107.
- [28] Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, et al. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:992-8.
- [29] Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochem Biophys Res Commun. 2003;306:530-6.

- [30] Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 1998;48:125-9.

Table 1: Antimicrobial Activity (MIC in mg/ml) of *Chromolaena odorata* leave extracts (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) against four pathogens strains (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae*).

Microorganisms	Minimal inhibitory concentrations (mg/ml)			
	Cyclohexane extract	Dichloromethane extract	Ethyl acetate extract	Butanol extract
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.25	0.625	0.625	1.25
<i>Salmonella enterica</i>	1.25	0.625	0.625	0.625
<i>Shigella sonnei</i>	1.25	0.625	0.625	0.625
<i>Vibrio cholerae</i>	1.25	0.156	0.625	0.312

Figure 1

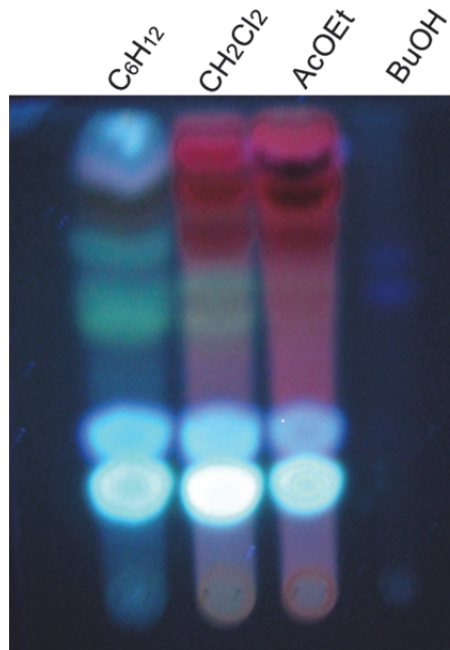


Figure 2

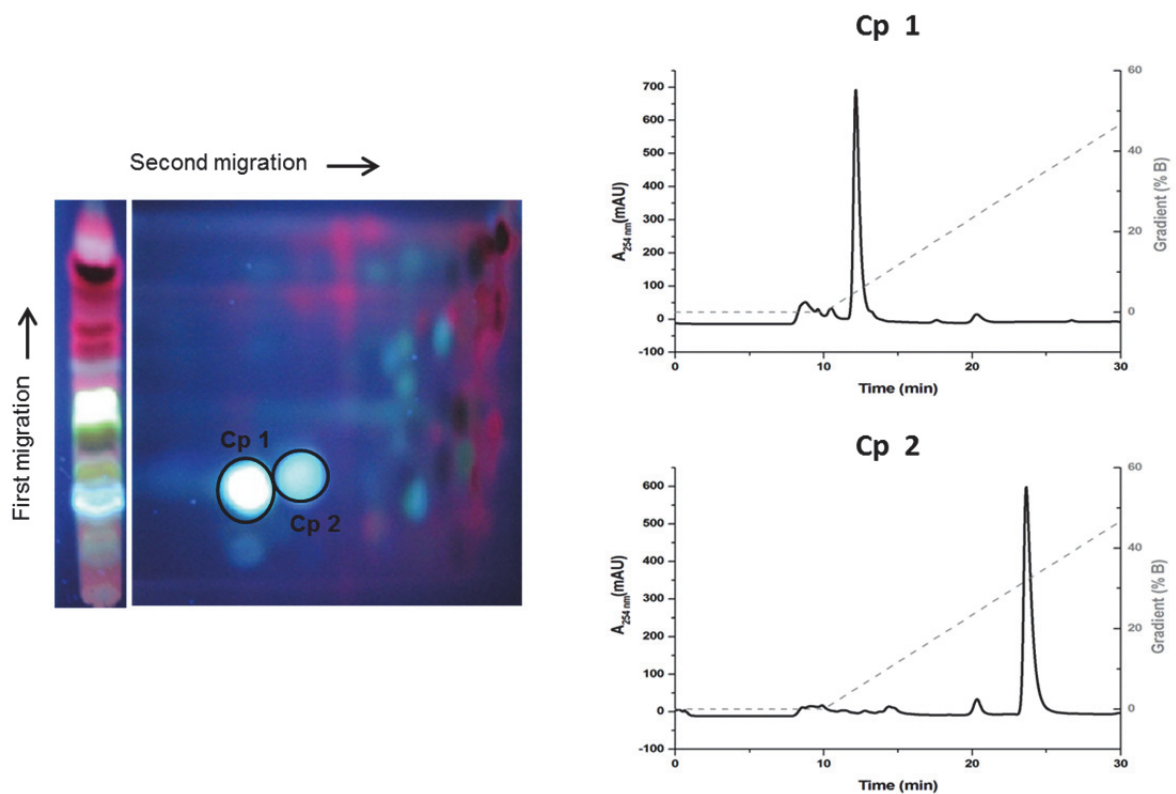
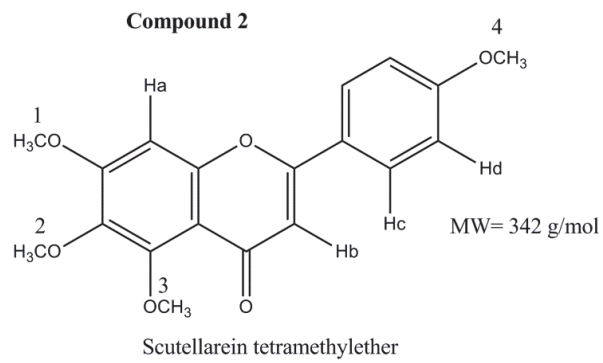
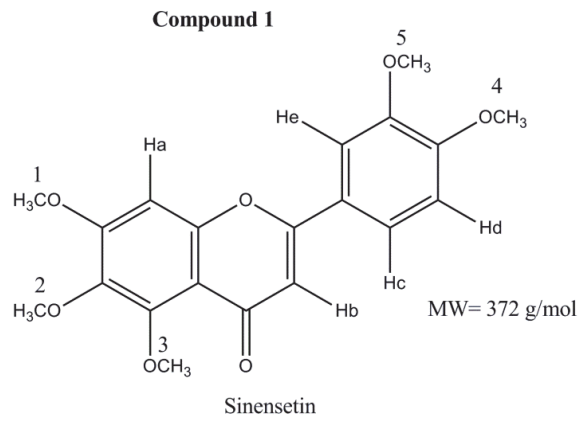


Figure 3



Manuscrit 5

Chromofungin, a chromogranin A-derived fragment is an autocrine regulator of BON cells secretion

(soumis pour évaluation à Molecular and Cellular Proteomics)

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Stéphane Ory³, Sylvette Chasserot-Golaz³, Jean du Barry³, Jean Marc Strub⁴, Stéphane Gasman³, Alain Van Dorsselar⁴, Youssef Haikel^{1,5}, Ambaliou Sanni², Francis Schneider^{1,6}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

La chromogranine A et ses peptides dérivés sont des acteurs importants de l'immunité. Elle est sécrétée par les cellules nerveuses, endocrines, immunitaires et neuroendocrines lors d'un stress. Des études antérieures ont montré leur importance dans les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, la nociception ...

Sous l'effet d'enzymes protéolytiques, la CGA est dégradée pour produire de nombreux peptides biologiquement actifs. L'objectif de ce travail est d'examiner le rôle d'un fragment dérivé de la CGA, la chromofungine, sur un modèle de cellules neuroendocrines, les cellules BON. Ce sont des cellules de type entérochromaffines isolées d'une tumeur carcinoïde du pancréas. La sécrétion protéique induite en CGA après stimulation à la chromofungine a été analysée par rapport au témoin négatif que représente le niveau basal et au témoin positif représenté par l'ionomycine. Les résultats obtenus montrent que la CGA et ses fragments sont majoritaires dans les sécrétions de cellules BON. Par ailleurs, la chromofungine est un meilleur sécrétagogue pour ces cellules que l'ionomycine. Les fragments de CGA libérés ont été identifiés par analyse protéomique.

Chromofungin, a Chromogranin A-derived fragment is an autocrine regulator of human neuroendocrine tumor cells secretion

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Stéphane Ory³, Sylvette Chasserot-Golaz³, Jean du Barry³, Jean Marc Strub⁴, Stéphane Gasman³, Alain Van Dorsselar⁴, Youssef Haikel^{1,5}, Ambaliou Sanni², Francis Schneider^{1,6}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

(1) Université de Strasbourg, Biomatériaux et Ingénierie tissulaire, INSERM U 977, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

(2) Université d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire LBBM, 04-BP 320 Cotonou, Bénin

(3) Université de Strasbourg, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives INCI, CNRS UPR 3212, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

(4) Université de Strasbourg, Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, CNRS UMR 7178, ECPM, 25 rue Becquerel F-67087 Strasbourg, France

(5) Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie dentaire, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

(6) Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière 67098 Strasbourg, France

* Corresponding author:

Marie-Hélène Metz-Boutigue, marie-helene.metz@inserm.fr

Tel: 33 3 68 85 54 71 ; Fax: 33 3 68 85 54 72

Running title: Chromogranin A-derived fragments and BON cells secretion

Key words: Chromogranin A, Chromofungin, Human NETs cells, BON cells, secretion

◆
Ménouvè Atindehou^{1,2}, atindehou@live.fr

Stéphane Ory³, ory@inci-cnrs.unistra.fr

Sylvette Chasserot-Golaz³, chasserot@inci-cnrs.unistra.fr

Jean du Barry³, barry@unistra.fr

Jean Marc Strub⁴, jmstrub@unistra.fr

Stéphane Gasman³, gasman@inci-cnrs.unistra.fr

Alain Van Dorsselar⁴, vandors@unistra.fr

Youssef Haikel^{1,5}, youssef.haikel@unistra.fr

Ambaliou Sanni², ambaliou.sanni@gmail.com

Francis Schneider^{1,6}, francis.schneider@chru-strasbourg.fr

Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}, marie-helene.metz@inserm.fr

Abbreviations

CaM: Calmodulin

CAT: catestatine

CGA: chromogranin A

CHR: chromofungin

Io: ionomycin

MALDI-Tof: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- time-of-flight mass spectrometry

MDCK: Madin-Darby canine kidney

NET: neuroendocrine tumor

PVDF: PolyVinylidene Fluoride

RP-HPLC: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

RT: Room temperature

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate


TFA: Trifluoroacetic

TGS: Tris Glycine SDS

TRP: Transient receptor potential channel

TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid

VOCC: Voltage-Operated Calcium Channel



Summary

Neuroendocrine tumors (NETs) are mainly localized in the gastrointestinal tract et are of diffuse endocrine system, which are characterized by the secretion of numerous peptides and bioactive molecules. Several studies have investigated the proteomic analysis of cultured cell secretions in the search for marker proteins of cancer. BON cells provide from human pancreatic NETs and numerous dense core vesicles containing chromogranin A (CGA) are visualized by microscopy. This protein is the biochemical marker currently used for monitoring and screening of NETs in the circulation. Furthermore, CGA is the precursor of numerous bioactive peptides and we have demonstrated that human chromofungin (CGA₄₇₋₆₆) stimulates human cells (neutrophils) to release components important for innate immunity. The aim of the present study is to examine the effect of this peptide and to compare with Ionomycin (Io), as positive control on BON cells secretions, by using confocal microscopy, biochemistry, proteomic technics including HPLC, mass spectrometry MS/MS and bioinformatics analysis of the proteome. For the first time, we show that chromofungin is an autocrine regulator of secretion and we identify the CGA-derived fragments released by stimulated BON cells.

Introduction

Neuroendocrine tumors are relatively rare neoplasms, mainly localized in the gastrointestinal tract (1). The incidence of neuroendocrine tumors (NETs) is 2-5 per 100,000, although they comprise about 25% of all intestinal tumors (2) and they are being diagnosed with increasing frequency due to the improved imaging techniques (3). NETs of the gut are thought to arise from cells of the diffuse endocrine system, which are characterized by the secretion of a variety of bioactive molecules into the circulation (4, 5), important as serum biomarkers for cancer progression and proliferation (6, 7). Several studies have investigated the secreted proteomes of cultured cells in the search of marker proteins of cancers (8, 9).

BON is a well-established and characterized human pancreatic NET cell line (10) used to study the signal transduction and genetic regulation of neuroendocrine tumor secretions and growth. These cells are derived from a lymph node metastasis of a pancreatic NET (11-13). Microscopically, the BON cells show the presence of numerous dense core vesicles containing chromogranin A (CGA), neuron-specific enolase, synaptophysins and bombesin (14, 15). BON have also been shown to release growth factors and peptides such as pancreastatin, neurotensin and biogenic amines (5-HT) (15, 16). Furthermore, the immunoreactivity for peptide hormones such as gastrin, vasoactive intestinal peptide (VIP), glucagon and somatostatin has been already demonstrated (17-19). Furthermore, the BON cells have been previously shown to express receptors for acetylcholine, 5-HT and beta adrenergic agonists (20, 21).

In the circulation, CGA is a biochemical marker currently used for monitoring and screening of NETs (22). However, CGA is a prohormone (23) precursor of numerous peptides (24) with diverse activities (25). Among these peptides human (h) and bovine (b) Vasostatin-I (h/bCGA₁₋₇₆) and Catestatin (CAT; hCGA₃₅₂₋₃₇₂ or bCGA₃₄₄₋₃₆₄) were very well studied for their numerous activities (25). We have previously reported that Chromofungin (CHR,

h/bCGA₄₇₋₆₆) and Catestatin (CAT), two CGA-derived peptides penetrate into neutrophils to induce an extracellular calcium influx and stimulate their secretions (26). In the present study, we plan to examine the effects of CHR on the BON cells secretions. By using proteomic techniques we characterized the proteome of material released by BON cells after treatment with 2 μ m Ionomycin (Io) and 100 μ M CHR. We focused on the release of CGA-derived fragments.

Experimental Procedures

Peptide synthesis, purification and analysis- The synthetic Chromofungin was prepared on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Courtaboeuf, France), using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry (27). The sequence of CHR corresponds to CGA₄₇₋₆₆: RILSILRHQNLKELQDLAL, according to Uniprot (P05059). The synthetic peptide was purified by RP-HPLC on a Dionex system Ultimate 3000 (Germering, Germany) including a Vydac 218 TP column (4.6 \times 250 mm; particle size 3-20 μ m and pore size 300 Å). Mobile phase consists of a gradient of solvent B in solvent A. Solvent A corresponds to 0.1% (vol/vol) Trifluoroacetic (TFA) in water and solvent B corresponds to 70% (vol/vol) acetonitrile with 0.09% (vol/vol) TFA.

For the fluorescence study, rhodamine fluorophore (5(6)-carboxytetramethyl rhodamine) was conjugated with peptides at the N-terminal extremity, as previously described (28). For CHR synthetic peptide MALDI-TOF (Ultraflex™ Bruker Daltonics, USA) mass measurements provide a rapid control of purity. In addition, peptide sequence was controlled by automated Edman sequencing on an Applied Sequencing System Procise (Applied Biosystems, Foster City, USA).

BON cells culture-The pancreatic neuroendocrine cell line BON was obtained from Dr. C. Desnos (Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS-UPR 1929, Paris, France). BON cells

were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium (1:1) (Gibco, Paisley, Scotland) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, Scotland), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a humidified incubator at 37°C atmosphere and 5% CO₂. Cells were seeded at 10⁷ cells per Petri dishes of 6 cm diameter. After 48 h when more than 80% cells are confluent, the medium was removed.

Stimulation of BON cells- Cells were washed three times for 10 min at 37°C with Locke's buffer without calcium (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 0.01 mM EDTA, 15 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.2 and stimulated for 10 min at 37°C with various secretagogues in Locke's buffer (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 0.01 mM EDTA, 2.5 mM CaCl₂, 15 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.2). The secretagogues used are 2 µM Ionomycin (Io; Sigma, Steinheim, United Kingdom), 100 µM Chromofungin and Locke's buffer alone for negative control. The secretion media were collected into tubes containing aqueous 0.1% (vol/vol) TFA, centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C, desalted onto Waters Sep-Pak C18 (Waters, Ireland) and stored at -20°C.

Western blot analysis- BON cells secretions (50 µg) were analysed by Western blot after SDS-PAGE 12%. Proteins were solubilized in Laemmli buffer containing 10% (vol/vol) glycerol, 2% (m/vol) SDS, 0.0025% (vol/vol) bromphenol blue and 63 mM Tris- HCl, pH 6,8 and denaturated at 95°C for 5 min. After migration onto 12% SDS gel in TGS buffer (192 mM Glycine, 0.1% (vol/vol) SDS, 0.025M Tris HCl pH 8.2), proteins were electrotransferred onto 0.22 µm PVDF membrane (Polyvinylidene Fluoride, Amersham Biosciences, Little Chalfon, UK) by using transfer buffer containing 10% (vol/vol) TGS, 20% (vol/vol) methanol, 70% H₂O during 75 min and soaked in blocking solution of 0.5% (m/vol) BSA (Bovine Serum Albumin) (Euromedex, Muldosheim, France) in 0.05% (vol/vol) Tween, PBS. CGA immunodetection was obtained with 1/2000 of primary monoclonal antibody Corti anti-CGA 53-57 (5A8) (gift of Angelo Corti, San Raffaele scientific Institute, Milan, Italy) (29,

30) and 1/10,000 of secondary anti-mouse antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Immunodetection was performed with ECL Supersignal (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoFisher Scientific, Rochford, USA) according to the manufacturer's instructions and visualized by system (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, USA). The apparent molecular mass of immunodetected bands was determined by comparison with molecular weight standards (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

High performance liquid chromatography of BON cells secretions-Secretions were separated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (DIONEX-Ultimate 3000, Germering, Germany), using a Grace C8 column (2.1x150 mm, particle size 5 μ m, porosity 300 A) (Waukegan Road Deerfield, USA). The solvent system consists of 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (vol/vol) trifluoroacetic acid in 70% acetonitrile in milliQ water (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 200 μ L/min and room temperature, using the gradient indicated on the chromatogram. Along the chromatography 1 min fractions were collected.

Protein preparation for in gel digestion before proteomic analysis-The 12% SDS PAGE pieces obtained after electrophoresis of 50 μ g of secretions were cut out from a Coomassie brilliant blue stained gel and successively washed with 50 μ l of 25 mM NH_4HCO_3 and 50 μ l of acetonitrile (three times), and dehydrated with 100 μ l of acetonitrile before reduction in the presence of 10 mM DTT (Dithiothreitol) in 25 mM NH_4HCO_3 (1 h at 57°C) and alkylation in the presence of 55 mM iodoacetamide in 25 mM NH_4HCO_3 . For tryptic digestion, the gel pieces were resuspended in 2 volumes of trypsin (12.5 ng/ μ l; V5111 Promega, USA) freshly diluted in 25 mM NH_4HCO_3 and incubated overnight at 37°C. The digested peptides were then extracted from the gel in a buffer containing 34.9% H_2O , 65% acetonitrile, and 0.1% HCOOH , and directly analyzed by nanoLC-MS/MS.

Chromatography conditions on NanoAcquity-The analysis was performed on a nanoACQUITY Ultra- Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, USA). The samples were trapped on a 20x0.18 mm, 5 μm Symmetry C18 precolumn (Waters, Milford, USA), and the peptides were separated on a ACQUITY UPLC® BEH130 C18 column (Waters, Milford, USA), 75 μm x 200 mm, 1.7 μm particle size. The solvent system consists of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Trapping was performed during 3 min at 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution was performed at a flow rate of 400 nl/min , using 1-40% gradient (solvent B) over 35 min at 45°C followed by 65% (solvent B) over 5 min.

MS and MS/MS conditions on SYNAPT mass spectrometer-The MS and MS/MS analyzes were performed on the SYNAPT™ an hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Waters, Milford, USA) equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The system operates in positive mode, the capillary voltage was set at 3.5 KV and the cone voltage at 30 V for protein identification, but for glycan determination the cone voltage was set at 40 V. Mass calibration of the TOF was achieved using phosphoric acid (H_3PO_4) on the [50-2000] m/z range. Online correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion ($M+2H$) at m/z 785.8426 is used to calibrate MS data and the fragment ion ($M+H$) at m/z 684.3469 is used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes (MS 0.5 s/scan on m/z range [250-1500] and MS/MS 0.7 s/scan on m/z range [50-2000]). The 3 most abundant peptides (intensity threshold 60 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation with 2 energies set using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas. The complete system was fully controlled by

MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters, Milford, USA). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted with ProteinLynx Browser 2.3 (Waters, Milford, USA) into .pkl peak list format. Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5, and deisotoping was performed.

Data analysis and protein identification-Mass data collected during LC-MS/MS analyses were processed using the software tool ProteinLynx Global Server (version 2.3; Waters, Milford, USA) converted into pkl files. The MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. algorithm (Matrix Science, UK) to search against a *Homo sapiens* data base extracted from NCBI nr. Spectra were searched with a mass tolerance of 30 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one missed cleavage site by trypsin and with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines fixed as variable modifications. Protein identifications were validated when at least two peptides were identified with Mascot ion score greater than 35 for each MS/MS spectra. For the estimation of the false positive rate in protein identification, a target-decoy database search was performed (31). The false positive rate was close to 0.5%. Criteria used for protein identifications followed the general guidelines for reporting proteomic experiments (MIAPE; <http://www.psidev.info>)

Bioinformatic Analysis of Identified Protein-Protein identifications were based on a minimum of two in number of unique peptides and sequence identification probability higher than 90%.

Confocal microscopy-BON cells were incubated overnight in polyornithine coated LabTek (Nagle Nunc International, Rochester, USA) at a density of $5 \cdot 10^4$ /ml. The cells were washed three times at room temperature (RT) and incubated with rhodamine-labelled peptide in Locke's buffer for appropriate time and concentration. After three washes with Locke's buffer, BON cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS at RT for 10 min, then

incubated with DRAQ-5 (dilution 1:500, Biostatus Limited., Leicestershire, UK) for 15 min. Stained cells were monitored with a Zeiss LSM 510 laser scanning microscope (Zeiss, Iena, Germany) equipped with a Planapo oil immersion objective ($\times 63$, numerical aperture 1.4).

RESULTS

Interaction of CHR with BON cells

CHR corresponds to the antimicrobial domain CGA₄₇₋₆₆ of Vasostatin-I (CGA₁₋₇₆) (28). This peptide is non-lytic to human cells and previously we have demonstrated that CHR penetrates into neutrophils, inducing extracellular calcium entry by a CaM-regulated iPLA2 pathway (26).

In order to examine the interaction of CHR with BON cells, we have prepared rhodaminated peptide (RhoCHR) and study its penetration in cells by using confocal microscopy (Figure 1). Cells were incubated with increasing concentrations of RhoCHR for different time intervals. The results obtained with RhoCHR indicate at 20 μM and after 10 min, a dispersed labelling of the plasma membrane of BON cells (Figure 1). At 40 μM the labelling increased and some vesicular structures seemed to be labelled in cytoplasm. After 1 h a diffuse labelling was observed in the cytoplasm, without a specific labelling of membranes and nucleus indicating that CHR is internalized into BON cells in the form of endosomes.

In summary, the interaction of CHR with BON cells is concentration-dependent and CHR seems penetrate thanks to a vesicular trafficking as suggested by the appearance of labelled vesicles (Figure 1).

Proteomic analysis of the BON cells secretions induced by Ionomycin and CHR

BON cells were treated with 100 μM CHR and 2 μM Io as a positive control of activation of secretion (32). The RP-HPLC of the secretions were compared with basal secretion as

negative control (BON control) (Figure 2). We observed an increase of material secreted by cells stimulated by 2 μ M Io and 100 μ M CHR. Then, the soluble proteins contained in the secretory medium (50 μ g) were separated by 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with a sequence-specific antibody against CGA₅₃₋₅₇ (Figure 3). Complete CGA with an apparent molecular mass of 72 kDa was detected in the secretions induced by CHR and Io. In addition, a fragment with an apparent molecular mass of 36 kDa was detected in the secretions corresponding to CHR. This fragment might correspond to the sequence 1-209 of CGA (33, 34). In these experimental conditions CGA-derived fragments were not immunodetected in basal secretions.

For each class of secretions (basal, 2 μ M Io and 100 μ M CHR), after a 12% SDS-PAGE, and blue coomassie staining, 24 similar slices of the gel were excised and subjected to tryptic digestion. Then, after analysis by nano LC/MS-MS, the proteins precursors were identified. Complete data are reported in Supplementary data.

In basal conditions, 101 proteins were identified in 24 bands and selected for analysis with a number of recovered peptides >1 and the protein identification probability >90%. After stimulation of BON cells by 2 μ M Io and 40 μ M CHR 291 and 550 proteins respectively were identified (Supplementary Data 1-4). For the first time, we demonstrate that CHR is a potent secretagogue for BON cells.

Analysis of CGA processing in the secretions induced by Ionomycin and CHR

The processing of human CGA excreted in urine of a patient with carcinoid tumor was previously reported (33, 34), indicating several cleavage sites of the precursor protein at positions 78, 115, 209, 272 and 394 (Figure 4). For each secretagogue and the basal conditions, the tryptic peptides derived from CGA and included in the different slices were analyzed by nanoLC-MS/MS (Table I,A-C). Then, taking into account the apparent molecular

mass Figure 4 and the endogenous cleavage sites previously reported, we identified the CGA-derived fragments present in the 24 bands of the gel corresponding to the secretions induced by 2 μ M I or 100 μ M CHR (Table II). We show that CHR is a more potent secretagogue than Io, with the release of 14 fragments including CGA multimer vs 7 fragments for secretions induced by Io.

The different CGA-derived fragments present in the secretions induced by Io correspond to: the complete protein and the fragments 116-439, 116-273, 273-394, 116-209, 1-115 (vasostatin II) and 1-78 (vasostatin I) (Figure 4). It appears that CHR produces large variety of fragments allowing the identification of intermediate forms such as 1-394, 79-439, 1-272, 273-439, and high_molecular mass evaluated upper to 120 kDa. These large fragments might correspond to dimers or proteoglycan-CGA forms.

DISCUSSION

CGA is overexpressed in various tumors including pheochromocytoma, carcinoid tumors, thyroid carcinoma, pancreatic islet cell tumors, small cell lung cancer, prostate cancer and many others (35-37). It is also well known that CGA plasma concentration increases considerably in patients with NETs (14). Furthermore, After transfection with the CGA cDNA the slower progression of mouse mammary adenocarcinoma suggests that CGA may contribute to regulate the growth of NET in a negative manner (36). NETs display a unique property as they unify biological aspects of solid cancers coupled with typical properties of neuronal and endocrine cell (38). The mechanisms involved in the malignant transformation of cells include overexpression of ion channels where they control proliferation, apoptosis, gene transcription and angiogenesis. NETs cells express a variety of voltage dependent ion channels such as voltage-operated calcium channels (VOCCs) and transient receptor potential

channels (TRPs) (39). Thus, TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid)-activation induces Ca^{2+} influx in BON cells leading to secretion of CGA.

In the present study we investigated the effects of CHR on the secretion of human BON carcinoid tumor cells and we focused on the characterization by proteomic methods of the CGA-derived fragments released. Confocal microscopy experiments show the interaction of RhoCHR with BON cells plasmic membrane of (40 μM at 10 min) and then its vesicular location in the cytoplasm (Figure 1). Further experiments are necessary to examine if the stimulation by CHR is mediated by TRPV1 and if CHR penetrates into BON cells as a cell penetratin peptide (CPP). Indeed, it has recently been pointed out that cationic AMPs and CPPs form a continuous spectrum of activities (40). HPLC analysis of BON cells secretions induced by CHR and Io indicate that the amount of proteic material released by CHR is higher (Figure 2). The Western blot analysis presented in Figure 3 clearly show the ability for CHR to induce exocytosis of complete CGA and a fragment corresponding to CGA₁₋₂₀₉ immunodetected by the anti-CGA₅₃₋₅₇ antibody (29-30). The proteomic analysis of the basal secretion and the secretions induced by Io, and CHR are presented in Table I, A-C. Comparison of the CGA-derived fragments identified after stimulation by 100 μM CHR and 2 μM Io allows to characterize the fragments specifically released by CHR (Table II). These fragments correspond to CGA₁₋₃₉₄ (67 kDa), CGA₇₉₋₄₃₉ (55 kDa), CGA₁₋₂₇₂ (45 kDa), CGA₁₋₂₀₉, CGA₁₁₆₋₃₉₄ (36 kDa), CGA₂₁₀₋₄₃₉ (28 kDa) and multimers (MW close to 120 kDa). These high-molecular forms might correspond to non-cleaved dimerized proteins resulting of intramolecular disulfide bridges (41, 42). Indeed, the C-terminal region of CGA exhibited dimerization and tetramerization (41). Furthermore, a 120 kDa proteoglycan-CGA has previously been reported in MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells (43) and bovine parathyroid gland (44).

Furthermore, our previous studies demonstrated six post-translational modifications along the human CGA excreted in patients with carcinoid tumors : three O-glycosylated residues corresponding to T₁₆₃, T₁₆₅, T₂₃₃ and three phosphorylation sites on S₂₀₀, S₂₅₂ and S₃₁₅ (Figure 4) (35). All these modifications prevent the proteolytic cleavage after dibasic sites, such as R₂₄₈K₂₄₉, K₃₃₈R₃₃₉, K₃₂₂R₃₂₃, R₃₇₃R₃₇₄, K₄₀₀K₄₀₁ and R₄₀₉R₄₁₀.

The signalling pathway involved in the responses to CHR (VS-I derived peptide) and CAT is unknown. Despite four decades since the exocytotic release of CGA was first established, classical surface receptors for the multiple effects assigned to VS-I has not been documented (25).

In the present study, for the first time it was shown that CHR, an amphipathic domain of VS-I is an activator of the secretion of CGA by BON cells. It induces the release of complete CGA, but also a mixture of numerous CGA-derived fragments with various biological activities. It is important to point out that until now, the different CGA immunoassays used to evaluate the concentration of CGA in plasma or NETs secretions concern only the complete protein. Our proteomic analysis shows that these secretions include numerous fragments and proteic complexes with high molecular mass. In addition the presence of post-translational modifications (glycosylations and phosphorylations) increases the complexity of the secreted material. Future studies are necessary to evaluate the effect of these fragments on the growth and differentiation of NETs.

Figures Legends

Figure 1: Fluorescence confocal microscopy of BON cells after incubation with rhodamine-labelled peptides. Different concentrations of rhodamine-labelled CHR (20 and 40 μM) (B) were tested during 10-30 min and 1 h according to Experimental Procedures section. The BON cells nuclei were labelled with DRAQ-5.

Figure 2 : BON cells secretions were isolated by RP-HPLC using DIONEX-Ultimate 3000 (Germering, Germany) and a C8 column (150 mm, particle size 5 μm , Grace, Waukegan Road Deerfield, USA) according to Experimental Procedures. The basal secretions (BON control) were compared to secretions induced by 2 μM Io (A) and 100 μM CHR (B). The peak corresponding to CHR was indicated on the chromatogram.

Figure 3: Analysis by Western blotting of CGA-derived fragments secreted by BON cells. Proteins were detected with monoclonal antibody CGA₅₃₋₅₇ (5A8; diluted 1: 2,000) and secondary anti-mouse antibody (diluted 1: 10,000). Apparent molecular mass are evaluated by comparison with molecular standards according to Experimental Procedures. 100 μM CHR, and 2 μM Io were used as secretagogues.

Figure 4: Identification by proteomic analysis of the processing of CGA in the secretions of BON cells stimulated by 2 μM Io and 100 μM CHR.

The CGA-derived fragments and the post-translational modifications are indicated along the complete primary structure of CGA. Arrows represent the cleavage sites previously reported (33); G and P are the glycosylated and phosphorylated residues previously identified (34). The disulfide bridge is indicated.

REFERENCES

- 1- Creutzfeldt, W. (1996) Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J. Surg.* **20**, 126-131
- 2- Halford, S., and Waxman, J. (1998) The management of carcinoid tumours. *Q. J. Med.* **91**,795-798
- 3- Höpfner, M., Sutter, A. P., Gerst, B., Zeitz, M., and Scherübl, H. (2003) A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839). *Br. J. Cancer* **89**, 1766-1775
- 4- Caplin, M. E., Buscombe, J. R., Hilson, A. J., Jones, A. L., Watkinson, A. F., and Burroughs, A. K. (1998) Carcinoid tumour. *Lancet* **352**, 799-805
- 5- De Herder, W. W. Biochemistry of neuroendocrine tumours. (2007) *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 33-41
- 6- Bast, R. C. Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colvin, R. B., and Knapp, R. C. (1981) Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* **68**,1331-1337
- 7- Balk, S. P., Ko, Y. J., and Bubley, G. J. (2003) Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol.* **1521**, 383-391
- 8- Kulasingam, V., and Diamandis, E. P. (2007) Proteomics analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines: a mine for biomarkers and therapeutic targets. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1997-2011
- 9- Sardana, G., Marshall, J., and Diamandis, E. P. (2007) Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture-conditioned medium. *Clin. Chem.* **53**, 429-437
- 10- Parekh, D., Ishizuka, J., Townsend, C. M. Jr., Haber, B., Beauchamp, R. D., Karp, G., Kim, S. W., Rajaraman, S., Greeley, G. Jr., and Thompson JC. (1994)

- Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* **9**, 83-90
- 11- Ahlund, L., Kindblom, L. G., Nilsson, O., Skolnik, G., Tylén, U., Dahlström, A., and Ahlman, H. (1989) Clinical and experimental studies on a midgut carcinoid tumor. *J. Surg. Oncol.* **41**, 86-92
- 12- Townsend, C. M. Jr., Ishizuka, J., and Thompson, J. C. (1993) Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncol.* **32**, 125-130
- 13- Tran, V. S, Marion-Audibert, A. M., Karatekin, E., Huet, S., Cribier, S., Guillaumie, K., Chapuis, C., Desnos, C., Darchen, F., and Henry, J. P. (2004) Serotonin secretion by human carcinoid BON cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 179-188
- 14- O'Connor, D. T., and Deftos L. J. (1986) Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1145-1151
- 15- Zhang, T., Townsend, C. M. Jr, Udupi, V., Yanaihara, N., Rajaraman, S., Beauchamp, R. D., Ishizuka, J., Evers, B. M., Gomez, G., and Thompson, J. C. (1995) Phorbol ester-induced alteration in the pattern of secretion and storage of chromogranin A and neurotensin in a human pancreatic carcinoid cell line. *Endocrinology* **136**, 2252-2261
- 16- Kim, M., Cooke, H. J., Javed, N. H., Carey, H. V., Christofi, F., and Raybould, H. E. (2001) D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* **121**, 1400-1406
- 17- Lee, M., Jensen, R. T., Huang, S. C., Bepler, G., Korman, L., and Moody, T. W. (1990) Vasoactive intestinal polypeptide binds with high affinity to non-small cell lung cancer cells and elevates cyclic AMP levels. *Peptides* **11**, 1205-1209
- 18- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., and Nagata, S. (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* **8**, 811-819

- 19-Lutz, E. M., Sheward, W. J., West, K. M., Morrow, J. A., Fink, G., and Harmar, A. J. (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* **334**, 3-8
- 20-Harmar, A. J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J. R., Rawlings, S. R., Robberecht, P., Said, S. I., Sreedharan, S. P., Wank, S. A., and Waschek, J. A. (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* **50**, 265-270
- 21-Lemmer, K., Ahnert-Hilger, G., Höpfner, M., Hoegerle, S., Faiss, S., Grabowski, P., Jockers-Scherübl, M., Riecken, E. O., Zeitz, M., and Scherübl, H. (2002) Expression of dopamine receptors and transporter in neuroendocrine gastrointestinal tumor cells. *Life Sci.* **71**, 667-678
- 22-Modlin, I. M., Kidd, M., Latich, I., Zikusoka, M. N., and Shapiro, M. D. (2005) Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* **128**, 1717-1751
- 23-Eiden, L. E. (1987) Is chromogranin a prohormone? *Nature* **325**, 301
- 24-Metz-Boutigue, M. H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti R., and Aunis, D. (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **217**, 247-257
- 25-Helle, KB. (2010) Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 1145-1146
- 26-Zhang, D., Shooshtarizadeh, P., Laventie, B. J., Colin, D. A., Chich, J. F., Vidic, J., de Barry, J., Chasserot-Golaz, S., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Schneider, F., Helle, K., Aunis, D., Prévost, G, and Metz-Boutigue, M. H. (2009) Two chromogranin A-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One* **4**(2):e4501.

- 27- Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis : synthesis of a tetrapeptide. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154
- 28- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A. E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J. Biol. Chem.* **276**, 35875-35882
- 29- Gasparri, A., Sidoli, A., Sanchez, L. P., Longhi, R., Siccardi, A. G., Marchisio, P. C., and Corti, A. (1997) Chromogranin A fragments modulate cell adhesion. Identification and characterization of a pro-adhesive domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 20835-20843
- 30- Belloni, D., Scabini, S., Foglieni, C., Veschini, L., Giazzon, A., Colombo, B., Fulgenzi, A., Helle, K. B., Ferrero, M. E., Corti, A., and Ferrero, E. (2007) The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *FASEB J.* **12**, 3052-3062
- 31- Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207-214
- 32- Forsberg, E. J., and Miller, R. J. (1983) Regulation of serotonin release from rabbit intestinal enterochromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**, 755-766
- 33- Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K., and Oberg, K. (1993) Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. *J. Endocrinol.* **139**, 329-337
- 34- Gadroy, P., Stridsberg, M., Capon, C., Michalski, J. C., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (1998) Phosphorylation and O-

- glycosylation sites of human chromogranin A (CGA79-439) from urine of patients with carcinoid tumors. *J. Biol. Chem.* **273**, 34087-34097
- 35- O'Connor, D. T., and Bernstein, K. N. (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* **311**, 764-770
- 36- Sobol, R. E., Memoli, V., and Deftos, L. J. (1989) Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* **320**, 444-447
- 37- Hsiao, R. J., Seeger, R. C., Yu, A. L., and O'Connor, D. T. (1990) Chromogranin A in children with neuroblastoma. Serum concentration parallels disease stage and predicts survival. *J. Clin. Invest.* **85**, 1555-1559
- 38- Wiedenmann, B., John, M., Ahnert-Hilger, G., and Riecken, E. O. (1998) Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *J. Mol. Med.* **76**, 637-647
- 39- Mergler, S., Skrzypski, M., Sassek, M., Pietrzak, P., Pucci, C., Wiedenmann, B., and Strowski, M. Z. (2012) Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cell Signal.* **24**, 233-246
- 40- Henriques, S. T., Melo, M. N., Castanho, M. A. (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.* **399**, 1-7
- 41- Yoo, S. H., and Lewis, M. S. (1993) Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: a thermodynamic analysis. *Biochemistry* **32**, 8816-8822
- 42- Yoo, S. H., Lewis, M. S. (1996) Effects of pH and Ca²⁺ on heterodimer and heterotetramer formation by chromogranin A and chromogranin B. *J. Chem.* **271**, 17041-17046

- 43- Kühn, U., Cohn, D. V., Gorr, S. U. (2000) Polarized secretion of the regulated secretory protein chromogranin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 631-636
- 44- Gorr, S. U., Hamilton, J. W., Cohn, D. V. (1991) Sulfated secreted forms of bovine and porcine parathyroid chromogranin A (secretory protein-I). *J. Biol. Chem.* **266**, 5780-5784

Figure 1

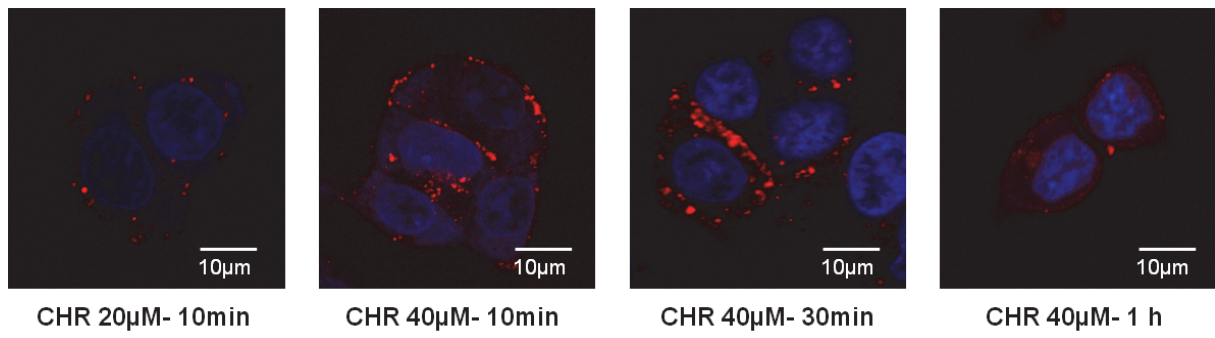


Figure 2

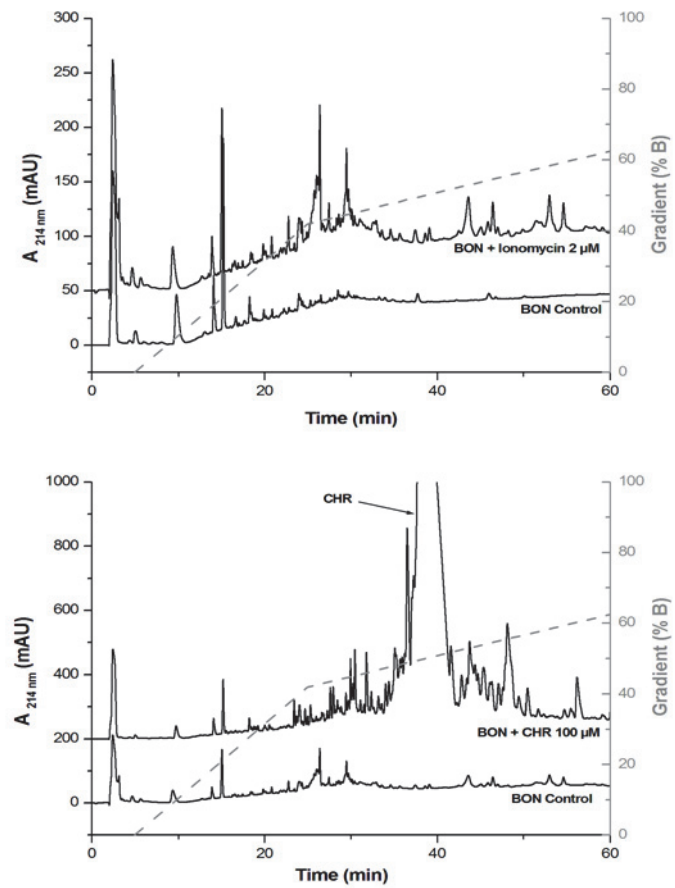


Figure 3

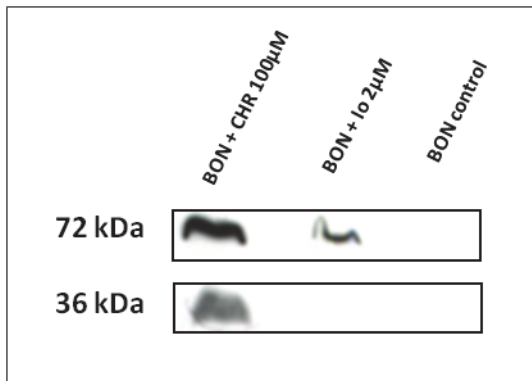


Figure 4

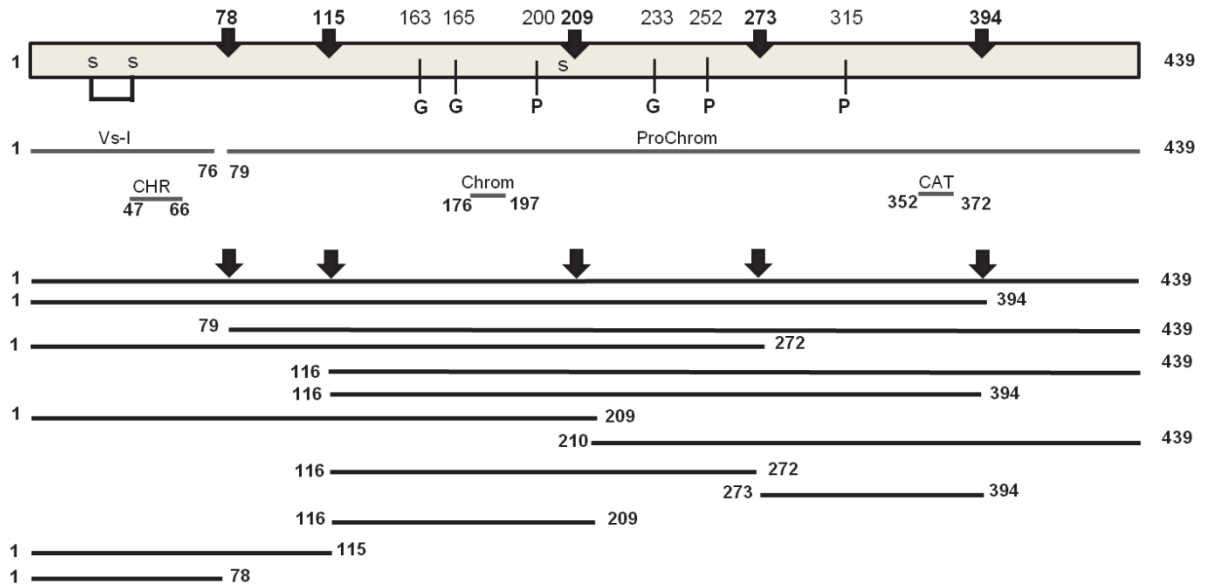


Table IA: Tryptic chromogranin-A derived peptides in BON cells control secretion

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
1	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
2	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
3	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
4	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLNPHPSLGYK	3 980,76	210-245
	GEQEH SQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
5	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEH SQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	PQALPEPMQESK	1 354,67	133-144
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
6	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEH SQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
7	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEH SQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
8	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
9	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
10	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
11	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
12	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEH SQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
13	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
14	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
15	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
16	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
17	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	AEGNNQAPGEEEEEEATNTHTPPASLPSQK	3 319,45	145-175
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
18	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
19	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	CIVEVISDTLSK	1 363,71	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
20	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GLSAPGWQAK	1 143,58	198-208
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	CIVEVISDTLSK	1 363,71	17-28
21	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GLSAPGWQAK	1 143,58	198-208
	HSGFDELSVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
22	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	ILSILR	714,4873	48-53
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
23	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	CIVEVISDTLSK	1 363,71	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
24	RPEDQELSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313

Table IB: Tryptic chromogranin-A derived peptides in BON cells control secretion induced by ionomycin

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
1	ILSILR	714.4873	48-53
	EAVEEPPSK	975.4629	101-109
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	CIVEVISDTLSK	1,363.7139	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
2	PSPMPVSQEcFETLR	1,777.8249	29-43
	ILSILR	714.4873	48-53
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	HQNLLKELQDLALQGAK	1,919.0712	54-70
3	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	ILSILR	714.4873	48-53
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	CIVEVISDTLSK	1,363.7139	17-28
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
4	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	CIVEVISDTLSK	1,363.7139	17-28
	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144 + O
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
5	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144 + O
	GPGPQLR	724.4102	367-373
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
6	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
7	GPGPQLR	724.4102	367-373
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PGAEAAQDPEGK	1,227.5490	265-276
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
8	PQALPEPMQESK	1,370.6623	133-144 + O
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144 + O
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
9	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	SEALAVDGAGK	1,017.5212	254-264

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
10	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
11	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
12	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,215.0299	124-144
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	GEQEHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2,830.2951	277-300
	GPGPQLR	724.4102	367-373
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
13	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2,476.1475	79-100
14	GEQEHSQQKEEEEEEMAVVPQGLFR	2,814.3001	277-300
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
15	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SGEATDGARPPQALPEPMQESK	2,199.0349	124-144
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	EEEEEMAVVPQGLFR	1,762.8317	286-300
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
16	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
17	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
18	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
19	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2,476.1475	79-100
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1,895.7925	340-355
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
20	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	ILSILR	714.4873	48-53
	VAHQQLALR	1,035.6058	429-437
	GLSAEPGWQAK	1,143.5794	198-208
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
21	SGELEQEEER	1,205.5281	304-313
	PQALPEPMQESK	1,354.6673	133-144
	CIVEVISDTLSK	1,363.7139	17-28
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	YGPQAEQDSEGLSQGLVDR	2,074.9679	176-195
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
22	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	EDSLEAGLPLQVR	1,426.7538	382-394
	SEALAVDGAGKPGAEAAQDPEGK	2,226.0524	254-276
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70
	ELQDLALQGAK	1,185.6476	60-70

Table IC: Tryptic chromogranin-A derived peptides in BON cells secretion induced by Chromofungin.

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location	
1	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100	
	ILSILR	714,4873	48-53	
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428	
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144	
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
2	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100	
	ILSILR	714,4873	48-53	
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428	
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276	
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
	VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197		
3	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245	
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300	
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100	
	ILSILR	714,4873	48-53	
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355	
	PGAEAAQDPPEK	1 227,55	265-276	
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144	
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428	
SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276		
SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144		
VAHQQLALR	1 035,61	429-437		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197		
4	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245	
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300	
	GPGPQLR	724,4102	367-373	
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355	
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144	
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428	
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276	
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197		
5	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300	
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428	
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276	
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
	6	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
		EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245
ELQDLALQGAK		1 185,65	60-70	
GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR		2 830,30	277-300	
GPGPQLR		724,4102	367-373	
HSGFDELSEVLNQSSQAEIK		2 476,15	79-100	
LEGQEEEEEDNRDSSMK		1 895,79	340-355	
PQALPEPMQESK		1 370,66	133-144	
RPEDQELFSLAIEAELEK		2 186,08	410-428	
SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK		2 226,05	254-276	
SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144		
SGELEQEEER	1 205,53	304-313		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197		
7	EAVEEPSSK	975,4629	101-109	
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394	
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245	
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70	
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300	
	GPGPQLR	724,4102	367-373	
	GWRPSSR	845,4376	375-381	
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100	
	ILSILR	714,4873	48-53	
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350	
LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355		
RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428		
SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276		
SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144		
SGELEQEEER	1 205,53	304-313		
VAHQQLALR	1 191,71	429-438		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195		
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197		

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
8	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
9	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
10	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100
	PQALPEPMQESK	1 370,66	133-144
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
11	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNR	1 347,57	340-350
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 199,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
12	EEEEEEEEAEAGEEAVPEEEGPTVVLP	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
VAHQQLALRR	1 191,71	429-438	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
13	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724,4102	367-373
	HSGFDELSEVLNQSSQAEIK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVD GAGKPGAEAAQDPPEK	2 226,05	254-276
	SGEATD GARPQALPEPMQESK	2 215,03	124-144
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQQLALR	1 035,61	429-437	
VAHQQLALRR	1 191,71	429-438	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197	
14	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	GEQEHSSQKKEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPEDQELFSLAIEAELEK	2 186,08	410-428
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEAGDSEGLSQGLVDREK	2 332,11	176-197

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
15	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
16	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	POALPEPMQESK	1 354,67	133-144
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
17	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 830,30	277-300
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276	
SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 199,03	124-144	
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
18	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEAAGEEAVPEEEGPTVVVLP	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300	
GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208	
HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100	
LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355	
RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428	
SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276	
SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 215,03	124-144	
SGELEQEEER	1 205,53	304-313	
VAHQLOALR	1 035,61	429-437	
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195	
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197	
19	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQLOALR	1 035,61	429-437
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
20	CIVEVISDTLSKSPMPVSOECFETLR	3 138,52	17-43
	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELKEAVEEPS	3 432,59	79-109
	ILSILR	714,4873	48-53
	KHSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 604,24	78-100
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 215,03	124-144
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197

Band	Peptide sequence	Peptide Mass (AMU) +1H	Location
21	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQLOALR	1 035,61	429-437
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197	
22	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	ILSILR	714,4873	48-53
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	REEEEEEEAAGEEAVPEEEGPTVVVLP	4 136,86	210-245
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197	
23	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQLOALR	1 035,61	429-437
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197
24	EDSLEAGLPLQVR	1 426,75	382-394
	EEEEEEEAAGEEAVPEEEGPTVVVLP	3 980,76	210-245
	ELQDLALQGAK	1 185,65	60-70
	GEQEHSSQKKEEEEEEMAVVPQGLFR	2 814,30	277-300
	GLSAEPGWQAK	1 143,58	198-208
	GPGPQLR	724 4102	367-373
	HSGFEDELSEVLENQSSQAELK	2 476,15	79-100
	LEGQEEEEEDNRDSSMK	1 895,79	340-355
	RPEDQELFSLSAIEAELEK	2 186,08	410-428
	SEALAVDVGAGKPGAEFAAQDPEGK	2 226,05	254-276
	SGEATDGARQPALPEPMQESK	2 199,03	124-144
	SGELEQEEER	1 205,53	304-313
	VAHQLOALR	1 035,61	429-437
	YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 074,97	176-195
YPGPQAEGDSEGLSQGLVDR	2 332,11	176-197	

Table II: Identification of the CGA-derived fragments present in the bands of gel after stimulation of BON cells by Ionomycin or CHR.

	Io	CHR
24 ← 120 kDa		CgA-multimer
← 72 kDa	1 - 439	1 - 439
20 ← 55 kDa		1 - 394
← 36 kDa	116 - 439	79 - 439
15 ← 28 kDa		1 - 272 ; 116 - 439
← 17 kDa		116 - 394 ; 1 - 209
10 ← 11 kDa		210 - 439
← 11 kDa	116 - 272 ; 273 - 394	116 - 272 ; 273 - 394
5	116 - 209	116 - 209
← 11 kDa	1 - 115	1 - 115
1	1 - 78	1 - 78

Manuscrit 6

Chromofungin and Catestatin, two Chromogranin A derived fragments modulate BON cells secretion

(en préparation)

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Jean du Barry³, Stéphane Ory³, Sylvette Chasserot-Golaz³, Jean Marc Strub⁴, Stéphane Gasman³, Alain Van Dorsselar⁴, Youssef Haikel^{1,5}, Ambaliou Sanni², Francis Schneider^{1,6}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

La chromogranine A (CGA) est une protéine sécrétée par les cellules nerveuses, neuroendocrines et immunitaires, lors d'un stress. Sous l'effet d'enzymes protéolytiques, la CGA est maturée, dans les granules de sécrétion, pour générer des peptides biologiquement actifs. Il est établi que la CGA est un marqueur des tumeurs neuroendocrines. Par ailleurs, notre groupe a montré que deux peptides dérivés de la CGA, la chromofungine (CHR, CGA₄₇₋₆₆) et la catestatine (CAT, bCGA₃₄₄₋₃₆₄) activent les neutrophiles polynucléaires (PMNs) en se liant à la calmoduline et en induisant l'ouverture des canaux SOC et un influx de calcium extracellulaire. Dans ce manuscrit, nous avons analysé l'effet de CHR et CAT sur les cellules BON dérivées d'une tumeur carcinoïde du pancréas.

La stratégie expérimentale de ce travail comporte deux étapes. Dans la première étape, nous avons caractérisé par analyse protéomique, les protéines libérées par stimulation des cellules BON en présence de CAT et de CHR, par comparaison à l'ionomycine (Io) et à la sécrétion basale (en l'absence de sécrétagogue). La seconde étape concerne l'analyse des mécanismes par lesquels CAT et CHR agissent sur les cellules BON pour moduler leur sécrétion.

L'analyse protéomique montre qu'un grand nombre de protéines sont sécrétées en présence de Io et surtout CHR. Ces protéines ont été classées en fonction des différents processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Dans le cas de la stimulation par CHR, on observe une nette augmentation des protéines intervenant dans la transcription et la traduction. Au contraire, dans le cas de la stimulation par CAT, on observe une diminution du nombre de protéines sécrétées par rapport aux autres expériences.

L'analyse en microscopie confocale de l'effet des deux peptides préalablement rhodaminés montre qu'après stimulation des cellules BON pendant 30 min par 40 μ M CAT, le peptide est détecté dans le cytoplasme, la membrane périmoléculaire et le noyau. Ce résultat indique que CAT pénètre dans les cellules BON jusqu'au noyau. Le résultat observé pour 40 μ M CHR est différent et indique après 1 h de traitement

un marquage cytoplasmique (vésiculaire), suggérant une entrée du peptide dans les cellules BON par des endosomes.

L'analyse en microscopie calcique des cellules chargées en fura-2 montre que CHR induit un influx de calcium et que CAT est capable de bloquer l'entrée de calcium induite par CHR lors d'un traitement par les deux peptides ensemble. L'utilisation de différents bloqueurs des canaux SOCs (*Store Operated Channels*) ou de la phospholipase A2 (calcium indépendant) montrent que ces peptides induisent l'ouverture des canaux SOCs pour l'entrée du calcium, mais n'utilisent pas les réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA).

Chromofungin and Catestatin, two Chromogranin A derived fragments modulate BON cells secretion

Ménonvè Atindehou^{1,2}, Stéphane Ory³, Jean du Barry³, Sylvette Chasserot-Golaz³, Jean Marc Strub⁴, Stéphane Gasman³, Alain Van Dorsselar⁴, Youssef Haikel^{1,5}, Ambaliou Sanni², Francis Schneider^{1,6}, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

1- Université de Strasbourg, Biomatériaux et Ingénierie tissulaire, INSERM U 977, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

2- Université d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire LBBM, 04-BP 320 Cotonou, Bénin

3- Université de Strasbourg, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives INCI, CNRS UPR 3212, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

4- Université de Strasbourg, Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique, CNRS UMR 7178, ECPM, 25 rue Becquerel F-67087 Strasbourg, France

5- Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie dentaire, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

6- Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière 67098 Strasbourg, France

* Corresponding author, Marie-Hélène Metz-Boutigue, marie-helene.metz@inserm.fr

Running title:

Key words: Chromofungin, Catestatin, human neuroendocrine tumor cells, BON cells, secretions



Abstract

Neuroendocrine tumors (NETs) are mainly localized in the gastrointestinal tract and are of diffuse endocrine system. They are characterized by the secretion of numerous peptides and proteins including chromogranin A (CGA), whose is a biochemical marker currently used for monitoring and screening of NETs in the circulation. Gastrointestinal carcinoid cells (BON cells) secreted a large amount of CGA, that is processed to generate numerous bioactive peptides. We have demonstrated that human chromofungin (CHR, CGA₄₇₋₆₆) and catestatin (CAT CGA₃₄₄₋₃₆₄) stimulate human cells (neutrophils) to release components important for innate immunity.

In the present, by using proteomic analysis, we characterized proteins released by BON cells after stimulation by CAT and CHR, compared with ionomycin (Io) and basal (in the absence of secretagogue). Molecular mechanisms involved for the BON cells stimulation were analyzed by using confocal and calcium microscopy. CHR increases the number of proteins secreted especially proteins involved in transcription and translation and CAT blocks cells secretion. CAT interacts with membranes and penetrates into BON cells to the nucleus, while CHR might into cytoplasm entry by endosomes. These two peptides act using store operated channels (SOCs) and modulate the secretion of BON cells.

Introduction

Gastrointestinal carcinoid cells, including BON cells are neuroendocrine tumors cells found in the gastrointestinal tract. BON cell line, used for this study, derived from a lymph node metastasis of a pancreatic carcinoid tumor (Evers, 1991 and Evers, 1994). BON express receptors for acetylcholine, 5-HT and beta adrenergic agonists (Hammar, 1998; Lemmer, 2002). They secrete many bioactive hormones such as, serotonin, neurotensin and chromogranin-A (CGA) that are currently used as

biomarkers of numerous neuroendocrine tumors (Modlin, 2008). CGA is a prohormone (Eiden, 1987), precursor of numerous peptides (Metz-Boutigue, 1993) with diverse activities (Helle, 2010). CHR and CAT, two of them possess several activities such as inhibition of catecholamine release by human catestatine (hCGA₃₅₂₋₃₇₂) (Mahata, 1997) or role in fibroblast cell adhesion for CHR (Dondossola, 2010). Our laboratory also showed that CAT and CHR penetrate into neutrophils to induce an extracellular calcium influx and stimulate these immune cells (Zhang, 2009).

In the present study, we decided to examine the effects of CAT and CHR on BON cells. We characterized proteins released by BON cells after stimulation by 100 μ M CAT and 100 μ M CHR, compared with 2 μ M ionomycin (Io) and basal (in the absence of secretagogue) and classified these proteins according to biological processes in which they operated. Molecular mechanisms involved for the BON cells stimulation are analyzed using confocal and calcium microscopy.

Materials and Methods

Peptides synthesis, purification and analysis

The synthetic peptides CHR and CAT were prepared on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Courtaboeuf, France), using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry (Merrifield, 1963). The two synthetic peptides correspond to bovine CGA Uniprot (P05059): CAT: CGA₃₄₄₋₃₆₄ (RSMRLSFRARGYGFRGPGLQ) and CHR: CGA₄₇₋₆₆ (RILSILRHQNLLKELQDLAL). The synthetic peptides were purified by RP-HPLC on a Dionex system Ultimate 3000 (Germering, Germany) including a Vydac 218TP column (4.6×250 mm; particle size 3-20 μ m and pore size 300 Å). Mobile phase consists to a gradient of solvent B in solvent A. Solvent A corresponds to 0.1% (vol/vol)

Trifluoroacetic acid (TFA) in water and solvent B corresponds to 70% (vol/vol) acetonitrile with 0.09% (vol/vol) TFA.

For the fluorescence study, rhodamine fluorophore 5(6)-carboxytetramethyl rhodamine was conjugated with peptides at the N-terminal extremity, as previously described (Lugardon, 2001). For each synthetic peptide MALDI-TOF (Ultraflex™ Bruker Daltonics, USA) mass measurements provide a rapid control of synthetic peptides. In addition, peptides sequences were controlled by automated Edman sequencing on an Applied Sequencing System Procise (Applied Biosystems, Foster City, USA).

BON cells culture

The pancreatic neuroendocrine cell line BON was obtained from Dr. C. Desnos (Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS-UPR 1929, Paris France). BON cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium (1:1) (Gibco, Paisley, Scotland) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, Scotland), 100 IU/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin in a humidified incubator at 37°C atmosphere and 5% CO₂. Cells were seeded at 10⁷ cells per Petri dishes of 6 cm diameter. After 48 h when more than 80% confluent, the media were removed.

Isolation of secreted material by gel-electrophoresis and preparation for proteomic analysis

BON cells secretions (50 µg) were analysed by Western blot after SDS-PAGE 12%. Proteins were solubilized in Laemmli buffer containing 10% (vol/vol) glycerol, 2% (m/vol) SDS, 0.0025% (vol/vol) bromphenol blue and 63 mM Tris- HCl, pH 6,8 and denaturated at 100°C for 10 min. After migration in TGS buffer corresponding to 192 mM Glycine, 0.1% (vol/vol) SDS, 0.025M Tris HCl pH 8.2), gel was stained with coomassie blue and later cut into 24 pieces. Gel pieces were successively washed with 50 µl of 25 mM NH₄HCO₃ and 50 µl of acetonitrile (three times), and dehydrated with

100 μ l of acetonitrile before reduction in the presence of 10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 (1 h at 57°C) and alkylation in the presence of 55 mM iodoacetamide in 25 mM NH_4HCO_3 . For tryptic digestion, the gel pieces were resuspended in 2 volumes of trypsin (12.5 ng/ μ l; V5111 Promega, USA) freshly diluted in 25 mM NH_4HCO_3 and incubated overnight at 37°C. The digested peptides were then extracted from the gel in a buffer containing 34.9% H_2O , 65% acetonitrile, and 0.1% HCOOH , and directly analyzed by nanoLC-MS/MS.

Chromatography conditions on NanoAcquity

The analysis was performed on a nanoACQUITY Ultra- Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, USA). The samples were trapped on a 20x0.18 mm, 5 μ m Symmetry C18 precolumn (Waters, Milford, USA), and the peptides were separated on a ACQUITY UPLC® BEH130 C18 column (Waters, Milford, USA), 75 μ m x 200 mm, 1.7 μ m particle size. The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Trapping was performed during 3 min at 5 μ l/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution was performed at a flow rate of 400 nl/min, using 1-40% gradient (solvent B) over 35 min at 45°C followed by 65% (solvent B) over 5 min.

MS and MS/MS conditions on SYNAPT mass spectrometer

The MS and MS/MS analyzes were performed on the SYNAPT™ an hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Waters, Milford, USA) equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The system operates in positive mode, the capillary voltage was set at 3.5 KV and the cone voltage at 30V for protein identification, but for glycan determination the cone voltage was set at 40V. Mass calibration of the TOF was achieved using phosphoric acid (H_3PO_4) on the [50; 2000] m/z range. Online correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-

peptide B as the lock-mass. The ion (M+2H) at m/z 785.8426 is used to calibrate MS data and the fragment ion (M+H) at m/z 684.3469 is used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes (MS 0.5 s/scan on m/z range [250; 1500] and MS/MS 0.7 s/scan on m/z range [50;2000]). The 3 most abundant peptides (intensity threshold 60 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation with 2 energies set using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas. The complete system was fully controlled by MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters, Milford, USA). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted with ProteinLynx Browser 2.3 (Waters, Milford, USA) into .pkl peak list format. Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5, and deisotoping was performed.

Data analysis and protein identification

Mass data collected during LC-MS/MS analysis was processed using the software tool ProteinLynx Global Server (version 2.3; Waters, Milford, USA) converted into pkl files. The MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. algorithm (Matrix Science, UK) to search against a *Homo sapiens* data base extracted from NCBI. Spectra were searched with a mass tolerance of 30 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one missed cleavage site by trypsin and with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines fixed as variable modifications. Protein identifications were validated when at least two peptides were identified with Mascot ion score greater than 35 for each MS/MS spectra. For the estimation of the false positive rate in protein identification, a target-decoy database

search was performed (Elias & Gygi, 2007). The false positive rate was close to 0.5%. Criteria used for protein identifications followed the general guidelines for reporting proteomic experiments (MIAPE; <http://www.psdev.info>)

Bioinformatic Analysis of Identified Protein

Protein identifications were based on a minimum of two unique peptide and sequence identification probability is most than 90%.

Confocal microscopy

BON cells were incubated overnight in polyornithine coated LabTek (Nalge Nunc International, Rochester, USA) at a density of $5 \cdot 10^4$ /ml. The cells were washed three times at room temperature (RT) and incubated with rhodamine-labelled peptide in Locke's buffer for appropriate time and concentration. After three washes with Locke's buffer, BON cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS at RT for 10 min, then incubated with DRAQ-5 (dilution 1:500, Biostatus Limited., Leicestershire, UK) for 15 min. Stained cells were monitored with a Zeiss LSM 510 laser scanning microscope (Zeiss, Iena, Germany) equipped with a Planapo oil immersion objective ($\times 63$, numerical aperture 1.4).

Time-lapse intracellular Ca^{2+} imaging

Bon cells were seeded on glass cover slips overnight at a density of 50 thousand cells/ml, then washed three time with buffer C containing 140 mM NaCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.0 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 11.1 mM D-glucose, 1% BSA, pH,7.4 and incubated at 37°C for 20 min in buffer C in 100% humified air with 2 μ M fluo-2 acetoxymethyl ester (fluo-2/AM; Invitrogen, Paisley, Scotland) and 2 μ l of pluronic acid (20%), (Interchim, Montluçon, France).

Cells were washed three times with buffer C and subsequently incubated for 20 min. After two washes, the cells were placed on an inverted microscope (Axiovert 35M

Zeiss, Germany), superfused with 1 mL of buffer C, and alternatively illuminated at 350±10 nm and 380±10 nm. The fluorescence emission was observed using a long pass filter at 510 nm. For each excitation wavelength images were recorded twice after 5s by a CCD camera (ImageEM™, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and fluorescence ratio images were calculated subsequently using Metafluor™ software (Molecular Devices, Downingtown, USA).

Drugs used for calcium imaging

Thapsigargin (TG), Calmidazolium (CMZ), 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB), N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA)

Results

Nano LC-MS/MS analysis of BON cells secretions

BON cells secrete lots of proteins in basal conditions. These secretions are increased by stimulation with Io or CHR and decreased by CAT addition. After, one-dimensional SDS-PAGE 12%, and blue coomassie coloration, 24 gel slices were exposed to tryptic digestion and later proteomic identification. Proteins identified by nano LC / MS-MS are presented in Annexe 1. Criteria used for secretion analysis consist of selecting proteins with a number of unique peptides greater than 1 and protein identification probability greater than 90%. The ratio between number of proteins secreted in each condition to number of proteins in basal are reported (Figure 1).

Proteins obtained are classified in different groups according with biological process in which they operate (Figure 2). For complete results, refer to supplementary data. These groups include : Immune and inflammatory proteins, Transcription and translation related proteins, Proteins involved in tissues and organs development, Proteins related

to homeostasis, Proteins related to transport, Oncogene proteins, Carbohydrate metabolic process, Proteins Involved in metabolic process, Proteins Involved in negative regulation, Proteins Involved in Proteolysis or protein complex formation, For each type of secretion (basal, Ionomycine, CHR and CAT), the repartition of proteins in the different groups are presented in the Discussion section.

Ionomycin is used as the stimulation control. It induces calcium influx into the cells and the cytokine production. Stimulation of BON cells by CAT, CHR and Io modified the content of secreted proteins. 101 different proteins were found in basal conditions, 291 in secretion induced by ionomycin, 550 in secretion induced by chromofungin and 67 in secretion induced by catestatin. Io and CHR stimulate the secretion of BON cells and CAT reduces BON cells secretion. The increase of secretion rate from a condition to the basal control corresponds to the ratio of the number of protein secreted by CHR or CAT to the number of proteins released during basal conditions. The number of proteins secreted after stimulation by CHR is more than 5 times higher than in the control and twice higher than that of Io (Figure 1).

Proteins belonging to various biological processes have been classified and have resulted in Figure 2. The results show a significant increase in each protein family during stimulation with Io compared to basal condition. Stimulation by CHR produces a very high increase of the number of secreted proteins.

In contrast, we note an important decrease in the content of the number of secreted proteins after stimulation by CAT compared to control (Figure 2).

Confocal microscopy results

For examine interaction of peptide with BON cells, we prepared CHR and CAT rhodaminated peptides according procedure previously described. Cells were incubated with increasing concentrations of rhodaminated peptides (5, 10, 20, 40 μ M) for 10 min. At

40 μ M, we tested 20, 30 and 60 min again. Rhodaminated Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) is used as negative control at a concentration of 40 μ M during 10 min (data not shown). No interaction with BON cells is reported.

The interaction of the peptides with BON cells is concentration-dependent. For 10 min incubation 5 μ M CAT starts to penetrate into BON cells. At 20 μ M the peptide accumulates at the plasmic membrane of a large number of cells and at 40 μ M we detected the peptide in the cytoplasm, at the perinuclear membrane and in the nucleus. This last labeling profile increases with a larger incubation time, such as 30 min (Figure 3A). For CHR, data obtained are described in other article (Atindehou, 2012, submitted article). CHR starts to penetrate into BON cells at 20 μ M. After 1 h a diffuse labelling was observed in the cytoplasm, without a specific labelling of membranes and nucleus indicating that CHR is internalized into BON cells in the form of endosomes (Figure 3B).

Chromofungin and catestatin induce calcium entry in BON cells

2 μ M Io and 100 μ M CHR induced a calcium influx in BON cells (Figure 4A). Calcium entry induced by CAT is not remarkable. But, in the presence of increasing concentration of peptide, the calcium influx induced by CAT and CHR are dose dependent (Figure 4B and 4C). At 40 μ M, CAT induces low calcium influx into cells and the activity of CHR is gradual and the latency of the response decreases with increasing of CHR dose (Figure 6C). For control, scrambled catestatin, tryptic digest of CAT (SSMK, LSFR, ARAYGFR, GPGPQL) and CHR (R, ISILR, HQNLLK, ELQDLAL), DMSO and buffer are tested and not induced calcium entry in BON cells. These results show that the complete sequence of CAT or CHR is important for calcium entry in BON cells.

Catestatin blocks chromofungin activity in BON cells

A previous study shows that catestatin plays a feedback control of catecholamine release (Mahata, 1997). We wanted to understand if CAT could have the same effect on BON cells. For this, we simultaneously added 100 μM of Ca^{2+} and CHR to BON cells. We found that CAT blocks CHR activity (Figure 5).

CAT and CHR used Store Operated channels (SOCs) to induce Ca^{2+} influx

Pretreatment of BON cells with 2-APB, an inhibitor of transient receptor potential (TRP) and store-operated Ca^{2+} (SOC) channels block the entry of extracellular Ca^{2+} induced by CAT and CHR (figure 6 A). These results suggest that CAT and CHR used SOC for stimulation of BON cells. These results are comparable to effect observed for the two peptides in PMNs (Zhang, 2009). Thapsigargin raises cytosolic calcium concentration by blocking the ability of the cell to pump calcium into the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum which causes these stores to become depleted. Influx calcium induces by CHR after pretreatment with thapsigargin (Figure 6B) implicate that CHR don't used sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA).

CAT and CHR activate SOCs via iPLA2 in BON cells

Addition of N-(6-aminohexyl)-5chloro-1-naphtalenesulfonamide (W-7) or calmidazolium (CMZ), two Calmodulin blockers show that CAT and CHR used iPLA2 for activation. At CAT 40 μM or CHR 40 μM , W7 or CMZ activity are not blocked. Increasing of this peptide concentration to 80 μM block, W7 and CMZ activity (Figures 7A, 7B and 8).

Discussion

Stimulation of BON cells by CHR induces an increase of secreted proteins (Figure 1). These proteins can be classified according to the biological processes in which they operated.

Classification of proteins secreted by cells secretion

Immune and inflammatory proteins

Immune and inflammatory proteins comprise proteins such as those involved in the activation of MAP kinases activity or in cascades of MAPKK (TSA, secretogranin-2, 14-3-3 protein beta), proteins involved in the production of B cytokines (60 kDa heat shock, protein), proteins inducing histamine secretion by mast cells (YWHAZ protein), cytokines (Cofilin-1), proteins involved in immune response, proteins that regulate the level of neurotransmitter, the proteins responsible for the synthesis of antimicrobial peptides (chromogranin A, secretogranin-3). YWHAZ is a protein essential for phagocytosis and microbial resistance in insects and vertebrates (Ulvila, 2011) and has been shown to have an interesting proto-oncogene role, suggesting a potential use in clinic (Lin, 2009).

The cofilin-1 or dextrin belongs to the family of ADF / cofilin (actin depolymerization factor) which play an active role in actin mechanisms regulation, also described to have important role in the cellular mechanisms leading to apoptosis and in homeostasis maintenance (Bernstein, 2010). The active dephosphorylated cofilin is involved in the production of superoxide anion, phagocytosis (Matsui, 2001) and phosphorylated; it operates in burst respiratory, phagocytosis (Adachi, 2001) and chemotaxis of leukocytes mediated by IL- 8. Phosphorylation and dephosphorylation of cofilin are controlled by PI-3K (Hirayama, 2011). Chromogranin A is the source of several peptides with antimicrobial properties (Metz-Boutigue, 1998; Lugardon, 2000; Briolat, 2005) and (Akaddar, 2010).

Transcription and translation related proteins

In this group are classified all the proteins involved in transcription and translation such as Nuclear mRNA splicing via spliceosom. Transcription and translation are two

important steps in the synthesis of proteins, proteins of this group are involved in this synthesis. Among these proteins, there is a nucleophosmin also known as NPM, B23, NO38 or Numatrine. It is a nucleolar chaperone protein as a shuttling back and forth between nucleus and cytoplasm. It is involved in many processes including ribogenesis, centrosome duplication or transcription regulation. The nucleophosmin can undergo post-translational modifications such as phosphorylation, sumoylation, acetylation (Shandilya, 2009; Liu, 2007, Colombo, 2011) and is also involved in other biological mechanisms such as cycle cell control (Li, 2006) and resistance to apoptotic stimuli. It is involved in cancers (ovary, prostate, bladder) (Yung, 2007) as a proto-oncogene and is also a prognostic marker of recurrence and progression (Yung, 2007). It can also act as a tumor suppressor gene in knock out mice (Naoe, 2006).

Proteins Involved in tissues and organs development

Several proteins involved in biological processes leading to the formation of organs or tissues have been identified. These are proteins of involved in the cell cycle development formed by different subunits of the proteasome, structural proteins such as tubulin.

Proteins related to homeostasis

These proteins are important for maintaining equilibrium of cells. This group includes proteins involved in apoptosis, protein involved in response to oxidative stress or reactive oxygen species, proteins involved in the response to hypoxia (Peroxidoxin-1, Peroxidoxin-6, and protein DJ-1). The peroxiredoxin- 1 and 6 belong to the families of Peroxiredoxins (6 members), which are proteins with 1 or 2 highly conserved cysteines. The peroxiredoxin-1 participates to the suppression of cell death induced by ROS, reduces adhesion and subsequent transendothelial migration of monocytes by decreasing molecule expression of intercellular adhesion (Schreibelt, 2008). The

Peroxiredoxin -6 is important to the response to oxidative stress (Manevish, 2005) due to its ability to reduce peroxidized membrane phospholipids and its role in the homeostasis of phospholipids (Fisher, 2011). DJ-1 protein, a ubiquitous protein, plays a cytoprotective role by regulation of oxidative stress. This protein has been studied extensively in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (Kahle, 2009).

Proteins related to transport

These are proteins involved in transport such as the chloride intracellular channel protein belonging to the family of voltage gated chloride channel or proteins binding other proteins for transport.

Oncogene proteins

These are anti-apoptotic proteins, xenobiotic proteins, and proteins involved in tumor genesis. Apoptosis is an important biological process because it contributes to the elimination of old cells. But if apoptosis is suppressed, the cells are not eliminated and may lead to cancer. In this group, drug resistance related proteins (Lung Resistance-related protein) for example involved in drug resistance, perhaps via a transport process (Stein, 1994; Stein, 2005).

Carbohydrate metabolic process

Carbohydrate metabolism is a very important process for the cells.

Proteins Involved in metabolic process

These are proteins involved in metabolic processes except carbohydrate metabolic process (creatinine metabolic process, pyruvate metabolic process).

Proteins Involved in Proteolysis or protein complex formation

These are the proteins involved in the formation, assembly or proteolysis.

CAT and CHR mechanisms

CHR and CAT correspond to the active antimicrobial domains CGA47-66 included in Vasostatin-I (CGA1-76) and CGA344-364, respectively (Lugardon, 2001 ; Briolat, 2005). These two peptides are not lytic from human cells and previously we have demonstrated that CHR and Cat penetrate into neutrophils as cell penetrating peptides, inducing extracellular calcium entry by a CaM-regulated iPLA2 pathway (Zhang, 2009). To date only CAT has been reported to act *via* classical surface receptor, i.e. the nicotinic acetylcholine receptor (Mahata 1997).

In this study we showed that CAT and CHR activate SOCs without the involvement of SERCA. We suspect that other pathways might be used but they remain to be explained.

Figures legends

Figure 1: Ratio of secreted proteins in different conditions (2 μM Io, 100 μM CAT, 100 μM CHR) compared to the number of secreted proteins in the control (basal secretion).

Figure 2: Classification according to biological processes of proteins found in BON cells secretions (in basal conditions, with CAT, CHR or Io).

Figure 3: Fluorescence confocal microscopy of BON cells after incubation with rhodamine-labelled peptides. (A) Different concentrations of rhodamine-labelled CAT (5, 20, 40 μM) for 10 min, and 30 min and (B) CHR (20 and 40 μM) were tested during 10-30 min and 1 h according to Materials and Methods.

Figure 4 : Ca^{2+} influx in BON cells. Time-lapse intracellular calcium imaging was performed on BON cells loaded with 2 μM Fura-2 AM and 2 μl pluronic acid (20%). (A) Ca^{2+} influx induced by 2 μM Io, 40 μM CAT, 40 μM CHR or basal. (B) Ca^{2+} influx induced by CAT (10, 20 and 40 μM). (C) Ca^{2+} influx induces by (CHR 10, 20 and 40 μM).

Figure 5: CAT inhibits the Ca^{2+} influx caused by CHR.

Figure 6: Ca^{2+} influx in BON cells after treatment. (A) Calcium influx caused by CAT and CHR is blocked after BON cells treatment with 100 μM 2-aminoethyl diphenylborinate (2APB). (B) Treatment with 100 μM thapsigargin, a SERCA blocker, is unable to block calcium influx induced by CHR.

Figure 7: (A) 80 μM CAT blocks 5 μM N-(6-aminohexyl)-5chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7), CaM antagonist, calcium influx. (B) CHR 80 μM blocks W7 activity.

Figure 8: 80 μM CHR and 40 μM CAT block 2 μM CMZ calcium influx



References

1. Adachi, R., K. Takeuchi, and K. Suzuki. 2002. Antisense oligonucleotide to cofilin enhances respiratory burst and phagocytosis in opsonized zymosan-stimulated mouse macrophage J774.1 cells. *J Biol Chem* 277:45566-71.
2. Akaddar, A., C. Doderer-Lang, M. R. Marzahn, F. Delalande, M. Mousli, K. Helle, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, B. M. Dunn, M. H. Metz-Boutigue, and E. Candolfi. 2010. Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Cell Mol Life Sci* 67:1005-15.
3. Bernstein, B. W., and J. R. Bamburg. 2010. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20:187-95.
4. Briolat, J., S. D. Wu, S. K. Mahata, B. Gonthier, D. Bagnard, S. Chasserot-Golaz, K. B. Helle, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2005. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci* 62:377-85.
5. Colombo, E., M. Alcalay, and P. G. Pelicci. 2011. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene* 30:2595-609.
6. Dondossola E, Gasparri A, Bachi A, Longhi R, Metz-Boutigue MH, Tota B, Helle KB, Curnis F, Corti A. 2010. Role of vasostatin-1 C-terminal region in fibroblast cell adhesion. *Cell Mol Life Sci*. 2010. 67(12):2107-18.

7. Eiden, L. E. 1987. Is chromogranin a prohormone? *Nature* 325, 301
8. Elias, J. E., and S. P. Gygi. 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4:207-14.
9. Evers BM, Townsend CM, Jr., Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*. 1991;101:303–11.
10. Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Rajaraman S, Thompson JC. Expression of neurotensin messenger RNA in a human carcinoid tumor. *Ann Surg*. 1991;214:448–54. discussion 454-5.
11. Fisher, A. B. 2011. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A activities. *Antioxid Redox Signal* 15:831-44.
- 12- Harmar, A. J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J. R., Rawlings, S. R., Robberecht, P., Said, S. I., Sreedharan, S. P., Wank, S. A., and Waschek, J. A. (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50, 265-270
13. Helle, KB. (2010). Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1145-1146
14. Hirayama, A., R. Adachi, S. Otani, T. Kasahara, and K. Suzuki. 2007. Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *J Leukoc Biol* 81:720-8.

15. Kahle, P. J., J. Waak, and T. Gasser. 2009. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 47:1354-61.
16. Li, J., D. P. Sejas, R. Rani, T. Koretsky, G. C. Bagby, and Q. Pang. 2006. Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 281:16536-45.
17. Lin, M., C. D. Morrison, S. Jones, N. Mohamed, J. Bacher, and C. Plass. 2009. Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14-3-3zeta in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 125:603-11.
18. Lugardon, K., R. Raffner, Y. Goumon, A. Corti, A. Delmas, P. Bulet, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2000. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 275:10745-53.
19. Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A. E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J. Biol. Chem.* 276, 35875-35882
20. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM, Parmer RJ. 1997. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest.* 100; 6:1623-33.

21. Manevich, Y., and A. B. Fisher. 2005. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* 38:1422-32.
22. Matsui, S., S. Matsumoto, R. Adachi, K. Kusui, A. Hirayama, H. Watanabe, K. Ohashi, K. Mizuno, T. Yamaguchi, T. Kasahara, and K. Suzuki. 2002. LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 277:544-9.
23. Merrifield, R. B. 1965. Automated synthesis of peptides. *Science* 150:178-85.
- 24- Metz-Boutigue, M. H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti R., and Aunis, D. (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 217, 247-257
25. Metz-Boutigue, M. H., Y. Goumon, K. Lugardon, J. M. Strub, and D. Aunis. 1998. Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 18:249-66.
26. Modlin I. M., Gustafsson B. I., Moss S. F., Pavel M., Tsolakis A. V. and Kidd M. (2010). Chromogranin A- Biological Function and Clinical Utility in Neuro Endocrine Tumor Disease. *Ann Surg Oncol* 17:2427–2443
27. Naoe, T., T. Suzuki, H. Kiyoi, and T. Urano. 2006. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 97:963-9.
28. Schreibelt, G., J. van Horssen, R. F. Haseloff, A. Reijerkerk, S. M. van der Pol, O. Nieuwenhuizen, E. Krause, I. E. Blasig, C. D. Dijkstra, E. Ronken, and H. E. de Vries.

2008. Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 45:256-64.
29. Shandilya, J., V. Swaminathan, S. S. Gadad, R. Choudhari, G. S. Kodaganur, and T. K. Kundu. 2009. Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol* 29:5115-27.
30. Stein, U., S. Bergmann, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, H. D. Royer, P. M. Schlag, and W. Walther. 2005. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene* 24:3606-18.
31. Stein, U., W. Walther, and V. Wunderlich. 1994. Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *Eur J Cancer* 30A:1541-5.
32. Ulvila, J., L. M. Vanha-aho, A. Kleino, M. Vaha-Makila, M. Vuoksio, S. Eskelinen, D. Hultmark, C. Kocks, M. Hallman, M. Parikka, and M. Ramet. 2011. Cofilin regulator 14-3-3zeta is an evolutionarily conserved protein required for phagocytosis and microbial resistance. *J Leukoc Biol* 89:649-59.
33. Yung, B. Y. 2007. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. *Chang Gung Med J* 30:285-93.
34. Zhang, D., P. Shooshtarizadeh, B. J. Laventie, D. A. Colin, J. F. Chich, J. Vidic, J. de Barry, S. Chasserot-Golaz, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, F. Schneider, K. Helle, D. Aunis, G. Prevost, and M. H. Metz-Boutigue. 2009. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One* 4:e4501.

Figure 1

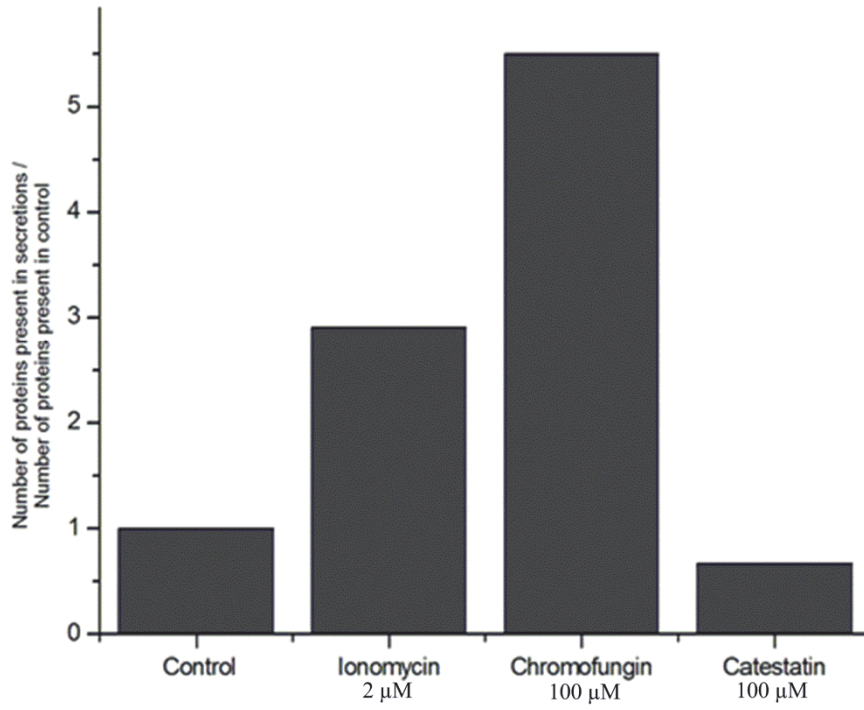
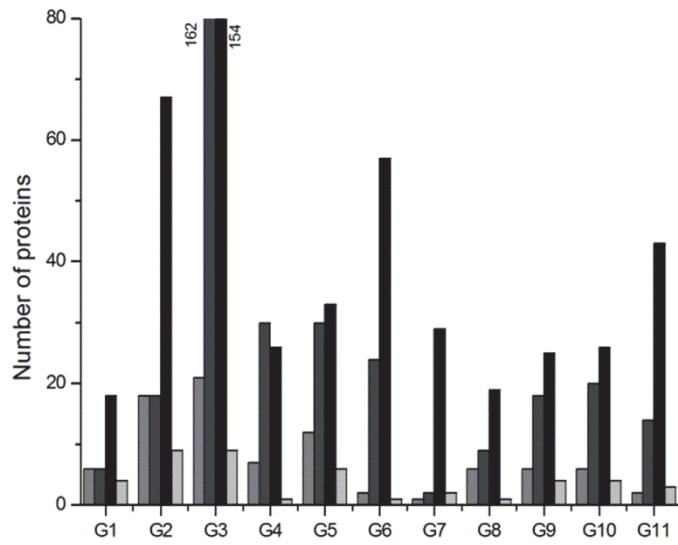


Figure 2



- G1: Immune and inflammatory proteins
- G2: Proteins involved in tissue and organs development
- G3: Transcription and translation proteins
- G4: Carbohydrate metabolic process
- G5: Proteins related to homeostasis
- G6: Proteins involved in proteolysis or protein complex formation
- G7: Proteins involved in metabolic process
- G8: Cell adhesion and movement
- G9: Oncogenes proteins
- G10: Enzymes and coenzymes
- G11: Proteins related to transport

Figure 3

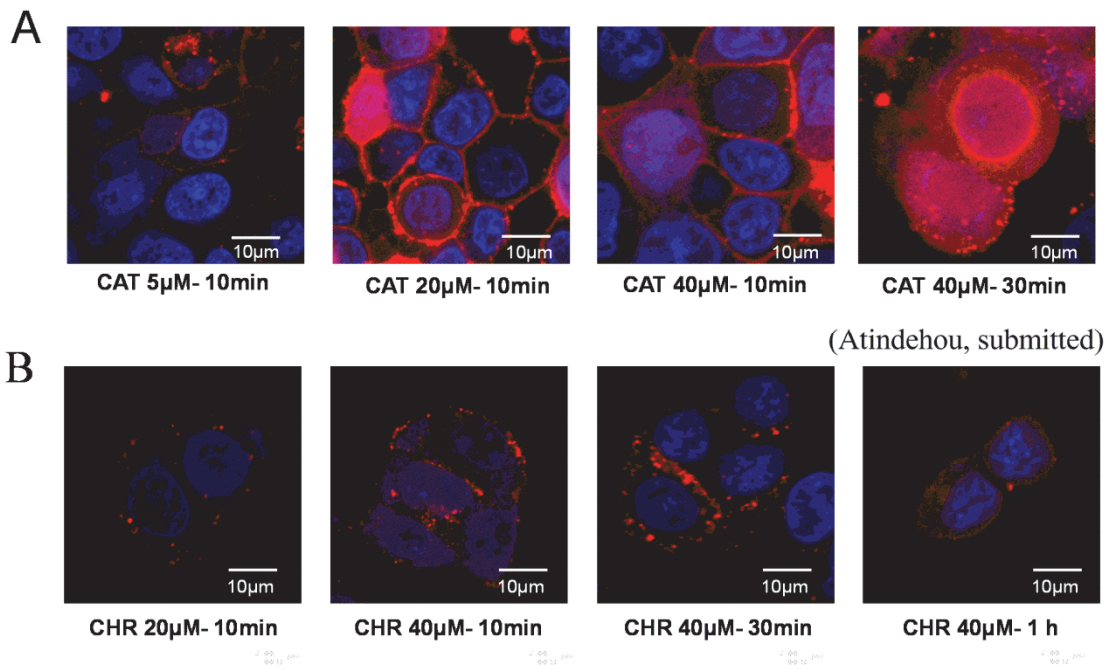


Figure 4

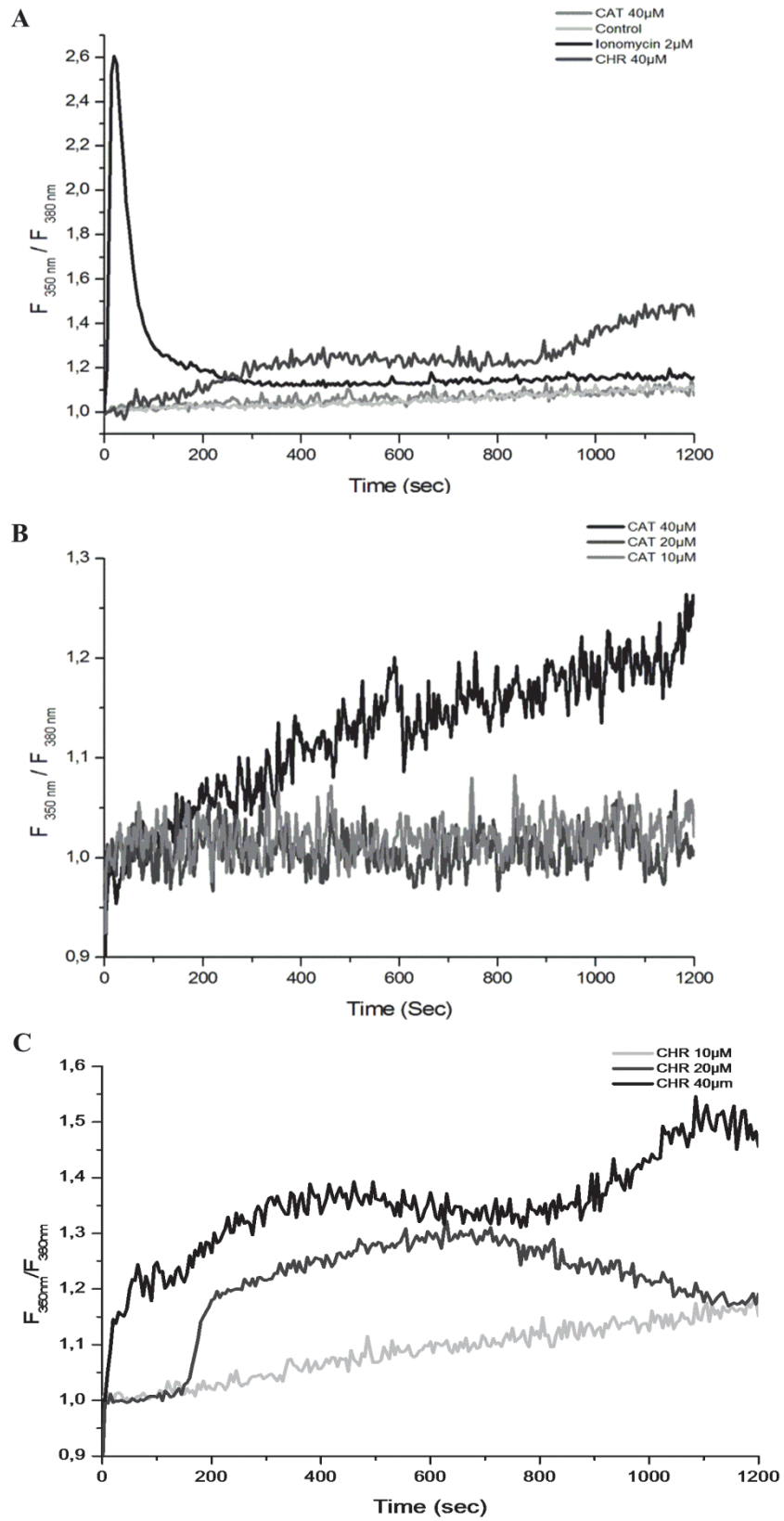


Figure 5

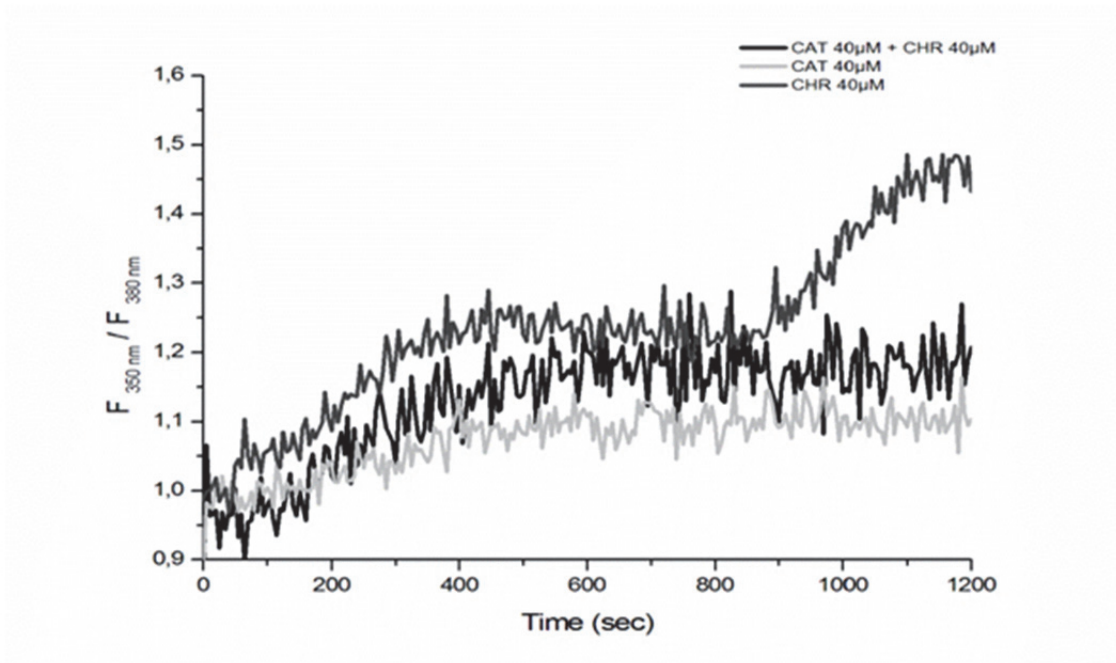


Figure 6

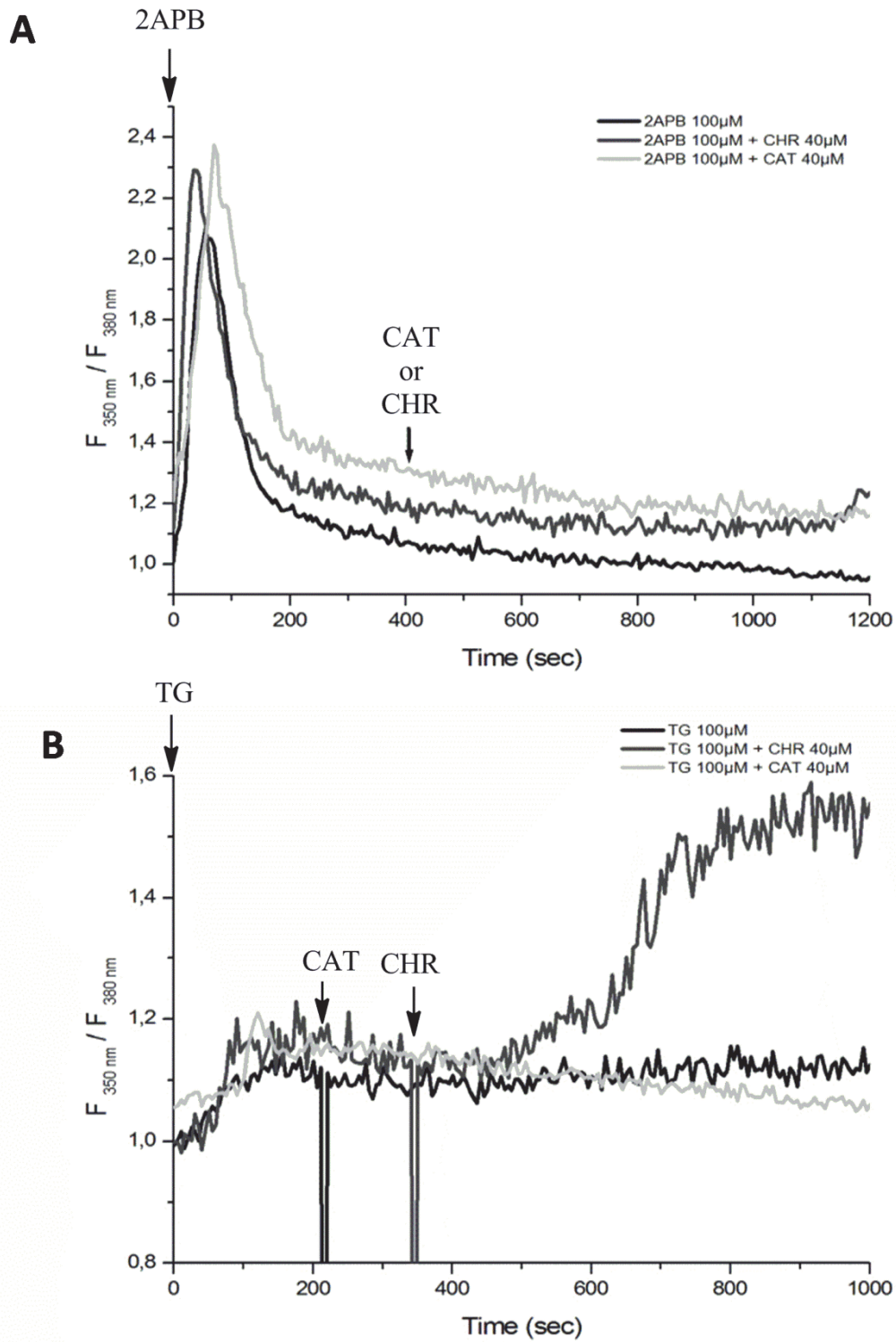


Figure 7

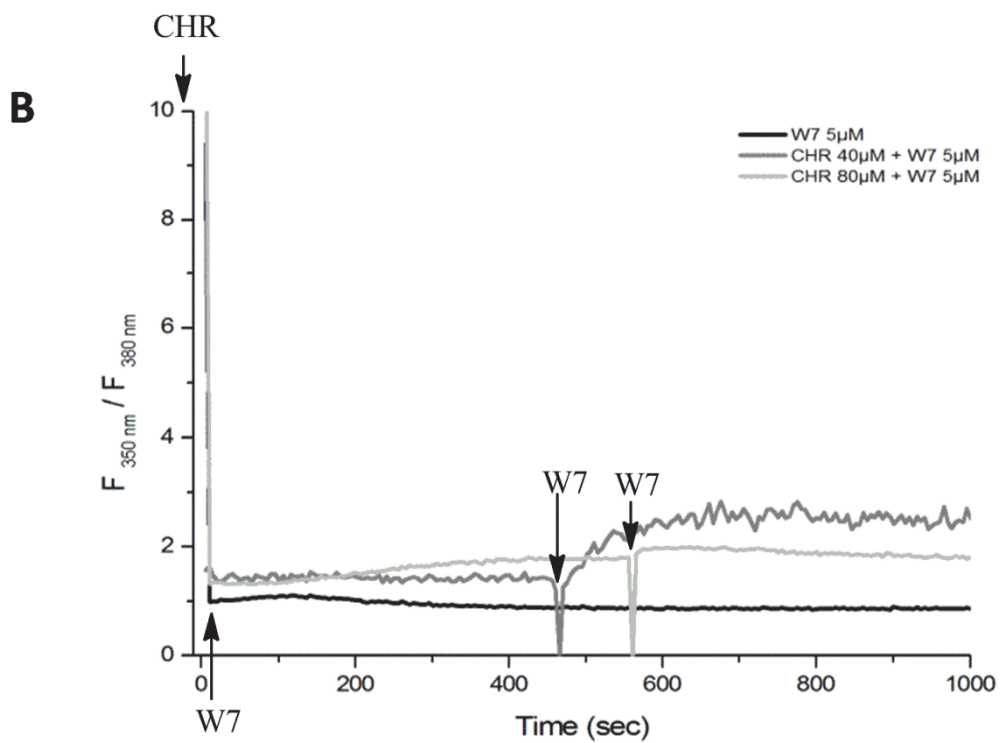
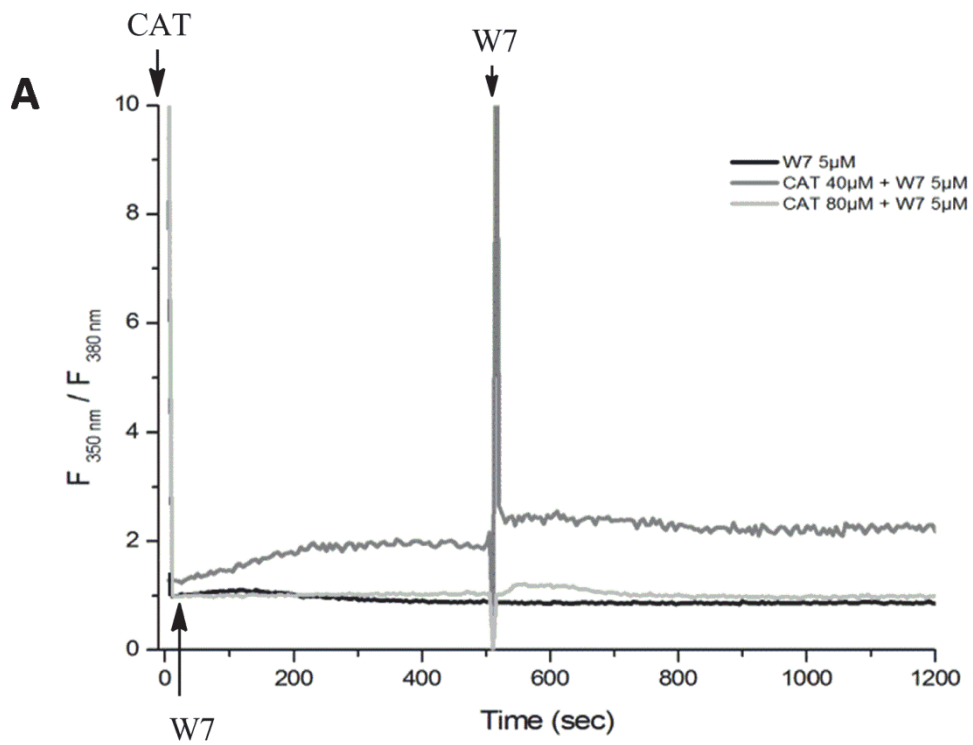
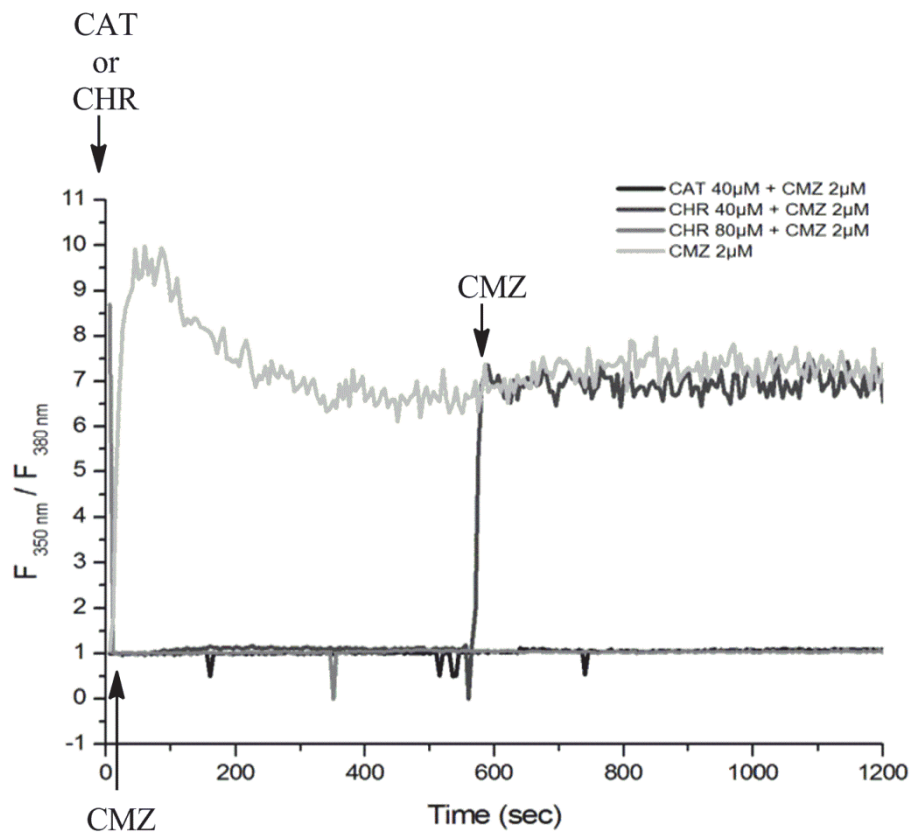


Figure 8



Liste des publications, communications et posters

PUBLICATIONS

- ❖ **Ménonvè Atindehou**, Rizwan Aslam, Jean-François Chich, Gilles Prévost, Francis Schneider, Marie-Hélène Metz-Boutigue. The natural antimicrobial chromogranins/secretogranins-derived peptides: production, lytic activity and processing by bacterial proteases (accepté pour Book Antibacterial Agents, Book 1, Intech ISBN 979-953-307-281-3).
- ❖ Aslam, Rizwan, **Atindehou, Ménonvé**, Lavaux, Thomas, Haïkel, Youssef, Schneider, Francis, Metz-Boutigue, Marie-Hélène. Chromogranin A-Derived Peptides Are Involved in Innate Immunity (publié dans Current Medicinal Chemistry).
- ❖ **Ménonvè Atindehou**, Jean Marc Strub, Alain Van Dorsselar, Youssef Haïkel, Ambaliou Sanni, Marie-Hélène.Metz-Boutigue. Involvement of chromogranin A derived peptides in the host-pathogen interaction during gut infections (à soumettre pour évaluation à Antimicrobial Agents and Chemotherapy).
- ❖ **Ménonvè Atindehou**, Stéphane Ory, Sylvette Chasserot-Golaz, Jean du Barry, Jean Marc Strub, Stéphane Gasman, Alain Van Dorsselar, Youssef Haïkel, Ambaliou Sanni, Francis Schneider, Marie-Hélène Metz-Boutigue. Chromofungin, a chromogranin A-derived fragment is an autocrine regulator of BON cells secretion (soumis pour évaluation à Molecular and Cellular Proteomics).
- ❖ **Ménonvè Atindehou**, Stéphane Ory, Jean du Barry, Sylvette Chasserot-Golaz, Jean Marc Strub, Stéphane Gasman, Alain Van Dorsselar, Youssef Haïkel, Ambaliou Sanni, Francis Schneider, Marie-Hélène Metz-Boutigue.

Chromofungin and catestatin, two Chromogranin A derived fragments modulate BON cells secretion (en préparation).

- ❖ **Ménonvè Atindehou**, Latifou Lagnika, Bernard Guéroid, Jean Marc Strub, Eric Marchioni, Minje Zhao, Alain Van Dorsselaer, Gilles Prévost, Youssef Haikel, Ambaliou Sanni, Marie-Hélène Metz-Boutigue. Characterization of two flavonoids from *Chromolaena odorata* (Asteraceae), active against four diarrheal strains (à soumettre pour évaluation à International Journal of Antimicrobial Agents).

COMMUNICATIONS ORALES

- ❖ Implication des peptides dérivés des chromogranines dans les pathologies intestinales, Inserm U 977, Strasbourg, France. 7 Juin 2011.
- ❖ Involvement of chromogranins and plant extracts in severe infections: septic shock and bowel diseases. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg. 1ère édition. Strasbourg, France. 31 Mars 2011.
- ❖ Recherche de nouvelles molécules actives contre les pathologies intestinales. Mi-parcours. 05 Novembre 2010.
- ❖ Extraits de plantes de la pharmacopée béninoise et peptides dérivés de la chromogranine: Etude de nouveaux moyens de défense contre les pathologies intestinales. Inserm U 575, Strasbourg, France. 26 Octobre 2010.
- ❖ Immunité innée dans les pathologies chroniques intestinales : Implication des fragments dérivés de chromogranines et des extraits de plantes. Faculté de médecine, Strasbourg, France. 26 Mars 2009.
- ❖ Implication des chromogranines et des fragments dérivés dans les inflammations intestinales. Inserm U 575, Strasbourg, France. 15 Janvier 2009.

POSTERS

- ❖ **Atindehou Ménonvè**, Haikel Youssef, Sanni Ambaliou, Metz-Boutigue Marie-Hélène (2012). Cateslytin, an antibiotic CGA derived-peptide against *Salmonella enterica*. Agence d'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur (AERES). Strasbourg, France, 12 Janvier 2012.
- ❖ **Atindehou M**, Strub JM, Haikel Y, Prévost G, Sanni A, Metz-Boutigue MH Dynamic interaction between chromogranin A and *Salmonella enterica* during

intestinal infections. European Workshop on Bacterial Protein Toxins, Oslo, Norvège. 18-22 Juin 2011.

- ❖ R. Aslam, **M. Atindehou**, B. Laventie, G. Prevost, D. Keller, JM Strub, Y. Haikel, MH Metz-Boutigue(2010). Chromogranins in innate immunity: Proteomic profile analysis of the proteins secreted by neutrophils in response to *Staphylococcus aureus* LukE/LukD leucotoxins. 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen, France. 11-15 Juillet 2010.

Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*

Les premières souches bactériennes résistantes aux antibiotiques sont connues depuis 70 ans, mais durant ces deux dernières décennies, les cas de multirésistance bactérienne aux antibiotiques se sont multipliés et depuis 2000, l'OMS les a déclarés "problème de santé publique". Ces bactéries sont responsables de plusieurs types d'infections dont les infections intestinales qui constituent la deuxième cause de mortalité infantile selon l'OMS. Cela est d'autant plus inquiétant que des diarrhées persistantes peuvent conduire à long terme aux maladies inflammatoires de l'intestin et au cancer. Aussi diverses voies (associations thérapeutiques, peptides antimicrobiens, extraits de plantes, bactériophages...) sont explorées pour tenter de trouver des traitements actifs contre ces bactéries multirésistantes.

Notre travail a consisté à proposer de nouveaux outils thérapeutiques dans le traitement des pathologies intestinales infectieuses. Dans cette optique, nous avons étudié des peptides antimicrobiens de la chromogranine A et des extraits de plantes utilisés en médecine traditionnelle béninoise pour le traitement de ces maladies.

La chromogranine A est une protéine libérée par les cellules nerveuses, neuroendocrines et immunitaires au cours d'un stress. Sous l'effet d'enzymes protéolytiques, elle produit des peptides biologiquement actifs. Des techniques de biochimie, microbiologie et chimie nous ont permis de sélectionner deux peptides antimicrobiens, la catestatine et la cateslytine, actifs contre quatre souches bactériennes pathogènes (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* et *Vibrio cholera non O1*) et de comprendre l'interaction bactérie-peptide. Par ailleurs, l'étude de la combinaison peptide-antibiotique montre que la cateslytine est utile pour réduire les doses d'antibiotiques comme la minocycline. Ensuite, nous avons étudié l'implication de deux peptides dérivés de la chromogranine A, la catestatine et la chromofungine, sur un modèle de cellules tumorales neuroendocrines, les cellules BON. L'analyse protéomique et la microscopie calcique montrent que la chromofungine provoque la stimulation des cellules BON en induisant un influx de calcium extracellulaire, tandis que la catestatine est capable de bloquer l'activité de la chromofungine.

Après un screening sur 14 plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise, nos travaux nous ont permis d'isoler deux molécules actives, la sinensétine et l'O-tétraméthyléther scutellaréine, responsables de l'activité antimicrobienne d'une plante, *Chromolaena odorata* grâce à des techniques comme la bioautographie, la HPLC, la chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

Structural and biological characterization of new natural antibacterial agents active in intestinal infections: Chromogranin A-derived peptides and active molecules of *Chromolaena odorata*

The first bacterial strains resistant to antibiotics appeared 70 years ago, but during these last two decades, numerous bacterial multi-resistance to antibiotics have been reported and since 2000, WHO has declared them "public health problems". Such bacteria are responsible of several types of infections including intestinal infections. These latter cause diarrheas and are a selected subject, since they are the second cause of infant mortality according to WHO. It is all the more worrying as persistent diarrheas cause in the long run intestine inflammatory diseases and cancer. Therefore, various ways (therapeutic combinations, antimicrobial peptides, plant extracts, bacteriophages...) are being explored with a view to finding active treatments against such multi-resistant bacteria.

This work consisted of proposing new therapeutic tools in the treatment of intestinal pathologies. In this context, we have studied antimicrobial peptides derived from chromogranin A and plant extracts used in Beninese traditional medicine for the treatment of such diseases.

Chromogranin A is a protein produced by nervous, endocrine, immune-defense and neuroendocrine cells during a stress. It is processed to produce biologically active peptides. The biochemistry, microbiology and chemistry techniques enabled us to identify two antimicrobial peptides, catestatin and cateslytin, which are active against four pathogenic bacterial strains (*Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* and *Vibrio cholera non O1*) and to understand the bacteria-peptide interaction. Moreover, the study of the peptide-antibiotic combination shows that cateslytin is useful for reducing doses of antibiotics such as minocycline. In addition of this work, we have studied the effects of two peptides derived from chromogranin A (catestatin and chromofungin), on neuroendocrine tumors cells with model of BON cells. The proteomic analysis and calcic microscopy analysis show that chromofungin causes the stimulation of BON cells by inducing an influx of extracellular calcium, whereas catestatin is able to block chromofungin's activity.

With plant extracts, after a screening on 14 plants of the Beninese traditional pharmacopeia, our works enabled us to isolate two active molecules, sinensetin and O-tetramethylether scutellarein, responsible of the antimicrobial activity of a plant, *Chromolaena odorata* with bioautography, HPLC, thin layer and gas chromatography, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance.