



HAL
open science

Analyse d'interaction de peptides, pseudopeptides et glycoconjugués aux activités antimicrobiennes et anti-leishmaniennes avec différents modèles membranaires

Abderrakef El Harras

► **To cite this version:**

Abderrakef El Harras. Analyse d'interaction de peptides, pseudopeptides et glycoconjugués aux activités antimicrobiennes et anti-leishmaniennes avec différents modèles membranaires. Autre. Université Rennes 1, 2020. Français. NNT : 2020REN1S051 . tel-03189120

HAL Id: tel-03189120

<https://theses.hal.science/tel-03189120>

Submitted on 2 Apr 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ÉCOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : Chimie Moléculaire et Macromoléculaire

Par

Abderrafek EL HARRAS

**Analyse d'interaction de peptides, pseudopeptides et glycoconjugués
aux activités antimicrobiennes et anti-leishmaniennes avec différents
modèles membranaires**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 décembre 2020

Unité de recherche : UMR CNRS 6226 ISCR

Rapporteurs avant soutenance :

Céline Landon CR CNRS, CBM, Orléans

Christina Sizun DR CNRS, ICSN, Gif-sur-Yvette

Composition du Jury :

Examineurs : Philippe Uriac

Yannick Fleury

Dir. de thèse : Arnaud Bondon

Co-dir. de thèse : Laurent Legentil

PU, Université de Rennes 1

Maître de conférences, UBO

DR CNRS, Université de Rennes 1

CR CNRS, ENSCR

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont principalement été réalisés au sein de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes - UMR CNRS 6226 – Équipe : CORINT. - Cette thèse a été réalisée sous la direction d'Arnaud Bondon, directeur de recherche CNRS au sein de l'université de Rennes 1 et de Laurent Legentil, chargé de recherche CNRS au sein de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR).

Je tiens à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance à Arnaud Bondon pour la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée et pour l'encadrement dont j'ai bénéficié durant cette thèse. Un grand merci pour avoir été à l'écoute de mes besoins mais également pour la liberté accordée au cours de mes trois années de thèse. Cette liberté que tu m'as accordée m'a permis d'enrichir et d'étendre ma culture scientifique. Je te remercie pour m'avoir guidé dans mes recherches dès la première expérience et pour tes nombreux conseils tous très perspicaces. Merci pour ta patience, ton calme, ta gentillesse, ta persévérance et ta bonne humeur, j'ai énormément appris à ton contact.

Je tiens à remercier Laurent Legentil pour m'avoir encadré au cours de mes trois années de thèse notamment lors de mes passages à l'ENSCR. Je te remercie pour le temps que tu m'as accordé pour me former à la culture de parasite alors que je n'y connaissais rien mais également pour tes précieux conseils, ton esprit critique et ton soutien tout au long de cette grande aventure. Je te remercie pour ta gentillesse, ta faculté d'écoute et pour l'encadrement pédagogique dont tu m'as fait bénéficier.

Je remercie Christina Sizun, directrice de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) et Céline Landon, chargée de recherche au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), pour avoir accepté d'être les rapportrices de mes travaux de thèse.

Je remercie également Philippe Uriac, professeur à l'université de Rennes 1 et Yannick Fleury, maître de conférences à l'université de Bretagne Occidentale (UBO) pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens également à remercier Véronique Vié, maître de conférences à l'université de Rennes 1 et Loïc Lemiègre, maître de conférences à l'ENSCR pour le soutien et les conseils scientifiques qu'ils m'ont apporté lors des comités de thèse.

Je remercie Irène Nicolas pour la synthèse des pseudopeptides, les discussions très intéressantes et ses nombreux conseils.

Une partie de ce travail a été réalisée dans le laboratoire de parasitologie de Villejean. Je tiens à remercier Christelle Manuel pour sa disponibilité et son implication dans les tests d'activités antiparasitaires et de cytotoxicité. Les professeurs Florence Robert-Gangneux et Jean pierre Gangneux pour les discussions scientifiques et leurs expertises en parasitologie. Je remercie également Kévin Ory qui m'a transmis le protocole de préparation du milieu de culture et avec qui j'ai beaucoup discuté de la culture des parasites de *Leishmania*.

Je remercie tous les membres du sous-sol du bâtiment 5 pour leur accueil et leur soutien au cours de ces trois années. Un grand merci particulièrement à Sandrine Pottier pour son aide et ses conseils à chaque fois que je l'ai sollicitée. Je remercie également, Giulio Gambarota pour m'avoir apporté son soutien dans la rédaction de ce manuscrit, merci pour les nombreuses discussions très variées allant du foot à la rédaction de la thèse. Je remercie Louis Marage pour son soutien lors de la rédaction du manuscrit de thèse, nos pauses café et nos week-end passés seuls au laboratoire à rédiger. Mes remerciements vont également à Elsa Caytan, Pierre-Antoine Eliat, Fanny Noury, Hervé Saint-Jalmes, Éric Hitti, Angélique Chéron, Christophe Tascon et Noémie Buisard.

Je tiens à remercier les stagiaires Youssef Bahri et Marie Gamblin avec qui j'ai travaillé à différents moments de ma thèse.

Je remercie toutes les personnes que j'ai omises involontairement lors de la rédaction de ces quelques lignes.

Je remercie chaleureusement mes parents pour m'avoir soutenu dans mes choix ainsi que pour le soutien, les encouragements et leur présence dans les moments de faiblesse. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée. Sans vous, je n'aurai jamais pu entreprendre ce long parcours. Je vous suis éternellement redevable. Je remercie également mes frères et sœurs

pour m'avoir encouragé, soutenu et motivé durant ma thèse. Je remercie ma femme pour m'avoir encouragé et motivé. Je te remercie pour ton attention et pour avoir été présente dans les moments où j'en avais besoin. Merci pour ta patience. Je remercie également mes deux fils Anes et Saib pour m'avoir remonté le moral chaque fois qu'il était au plus bas. Merci pour vos sourires qui m'ont beaucoup apporté.

Introduction générale

Contrairement à la membrane des cellules eucaryotes qui est essentiellement composée de protéines et de phospholipides zwitterioniques, la surface des membranes bactériennes et parasitaires présente en majorité des glycoconjugués. Ces derniers tapissent la couche externe des membranes et constituent la première barrière contre toutes les interactions avec l'extérieur de la cellule. Cette couche de glycoconjugués est appelée le glycocalix. Elle permet de filtrer les molécules qui peuvent atteindre la membrane cytoplasmique. Dans le cadre de la résistance aux composés antimicrobiens, des modifications importantes du glycocalix ont été détectées chez les souches mutantes et résistantes. Au cours de ma thèse, je me suis donc fortement intéressé à ces notions d'interaction à la surface des membranes bactériennes et parasitaires. Avant mon arrivée en thèse, les deux groupes dans lesquels j'ai réalisé ma thèse travaillaient déjà sur ces concepts d'interaction de surface. L'objectif de ma thèse était de parvenir à obtenir une meilleure compréhension des relations existantes entre les composés antimicrobiens et antiparasitaires avec le glycocalix des bactéries et des parasites.

Cette thèse est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre traite de la structure tridimensionnelle d'un peptide antimicrobien produit par les souches bactériennes de *pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 lorsqu'il est en interaction avec des micelles de lipopolysaccharide (LPS) Le second a pour objet l'étude structurale de pseudopeptides antimicrobiens de synthèse en interaction avec divers modèles membranaires. Dans le troisième chapitre nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de l'interaction de plusieurs galactofuranolipides avec le parasite *leishmania tarentolae*, une souche de parasite non pathogène appartenant au genre leishmanie.

Les antibiotiques sont des composés découverts durant la seconde moitié du 20^{ème} siècle qui permettent de détruire ou d'inhiber la croissance bactérienne. Fréquemment utilisés en routine pour le traitement d'infections, la découverte des antibiotiques a révolutionné la médecine moderne¹. Cependant, leur utilisation abusive a provoqué un accroissement considérable de la résistance aux antimicrobiens chez de nombreuses bactéries pathogènes qui sont désormais devenues résistantes à de multiples antibiotiques (Multi-Drug Resistance : MDR). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que la résistance aux antibiotiques représente une des plus grandes menaces de santé publique². En effet, la mortalité associée aux infections provoquées par des micro-organismes multi-résistants est en augmentation par rapport à celle associée aux bactéries sensibles³. Selon une étude récente, au moins 10 millions de personnes mourront chaque année d'ici 2050 en raison de la résistance aux antibiotiques s'il

n'y a aucune nouvelle alternative aux antibiotiques conventionnels⁴. La progression de la résistance aux antibiotiques associée à l'apparition continuelle d'agents pathogènes mutants devenant parfois incurables nécessitent de découvrir et de développer de toute urgence de nouveaux composés antimicrobiens⁵.

Les peptides antimicrobiens (PAM) qu'ils soient naturels ou synthétiques représentent une source de composés actifs contre de nombreux agents pathogènes incluant les bactéries (Gram négatif et Gram positif), les virus, les champignons ainsi que les protozoaires⁶. Ainsi, avec leur spectre d'action très large, les PAM offrent une véritable alternative pour le renouvellement de l'arsenal thérapeutique. Les PAM naturels proviennent d'organismes vivants variés tels que les animaux, les plantes, les insectes et même les micro-organismes comme par exemple les bactéries⁷. Ainsi les océans regorgent de micro-organismes pathogènes. Par conséquent, les espèces aquatiques ont dû s'adapter et développer des moyens de défense contre ces nombreux pathogènes. Ces moyens de défense reposent principalement sur les mécanismes de l'immunité innée avec comme acteurs principaux les PAM.

Dans ce contexte, l'équipe de Y. Fleury a isolé de l'hémolymphe d'huîtres, *Crassostrea gigas*, prélevées dans l'archipel de Glénan, plusieurs composés antimicrobiens produits par les souches bactériennes de *pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42^{8,9}. Cette équipe a ensuite testée l'activité antimicrobienne de ces composés sur une large gamme de bactéries à Gram négatif et plus précisément les *Vibrio*. La structure tridimensionnelle d'un de ces composés antimicrobiens (altérine980) par RMN en présence de micelles de lipopolysaccharide (LPS) et l'étude de la relation structure-activité sont présentées dans le chapitre 1. L'utilisation de ce type de micelles permet de mimer efficacement le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif correspondant à la première zone d'interaction et agissant comme un filtre contre toutes les molécules¹⁰. Les souches hCg-6 et hCg-42 de *pseudoalteromonas* ont été envisagées pour le développement de nouveaux probiotiques à destination de l'aquaculture.

Une limite à l'utilisation des PAM est leur forte sensibilité à la dégradation induites par les protéases¹¹. Pour faire face à ce manque de stabilité, *in vivo*, l'équipe de M. Baudy Floc'h (Institut des Sciences Chimiques de Rennes : ISCR) a développé la synthèse d'aza- β^3 -aminoacides. L'incorporation de résidu aza- β^3 permet de diminuer la reconnaissance par les protéases et donc d'améliorer la durée de vie¹². Les aza- β^3 -peptides développés résultent d'une

modification de la liaison peptidique et correspondent donc à des pseudopeptides, analogues de peptides antimicrobiens (PAM) naturels¹³⁻¹⁷. Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la structure tridimensionnelle et au mode d'action de ces aza- β^3 -peptides.

Il convient de souligner que la résistance aux antimicrobiens ne concerne pas uniquement les bactéries mais également d'autres micro-organismes comme par exemple les parasites¹⁸. C'est dans ce contexte que s'inscrit le troisième chapitre de ma thèse. L'apparition de nombreuses résistances des parasites de *Leishmania* contre certaines molécules mais également le coût relativement élevé des traitements représentent de véritables problèmes. La découverte ainsi que le développement de nouveaux composés anti-leishmaniens à des coûts raisonnables est donc nécessaire. Le β -D-galactofuranose d'octyle a été envisagé par les équipes de V. Ferrières et F. Robert-Gangneux comme un potentiel traitement anti-leishmaniens qui agit sur le lipophosphoglycane (LPG) majoritairement présent à la surface des parasites de *Leishmania*¹⁹. Après une première partie bibliographique, je présenterai les résultats d'interaction entre le β -D-galactofuranose d'octyle avec *L. tarentolae*, une souche de leishmanie qui ne présente pas de LPG et *crithidia fasciculata*, un micro-organisme qui exprime le LPG. Ces interactions ont été étudiées par RMN. L'étude a ensuite été élargie à des tests d'activités anti-leishmaniens avec plusieurs galactofuranolipides sur le parasite de *L. tarentolae*. J'exposerai ensuite des résultats préliminaires très prometteurs obtenus avec un aza- β^3 -peptide sur des souches pathogènes de *Leishmania* à savoir *L. donovani* (leishmaniose viscérale anthroponotique) et *L. infantum* (leishmaniose viscérale zoonotique).

Je commencerai par une partie bibliographique qui présentera les différentes classes de PAM et les mécanismes d'actions des PAM les plus fréquemment rencontrés. Les différents modèles membranaires compatibles avec des études RMN ainsi que les outils RMN utilisés seront également présentés.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	21
1 LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....	22
1.1 LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS NATURELS.....	23
1.1.1 Les helices α amphipathiques.....	23
1.1.2 Les PAM riches en cystéine.....	24
1.1.3 Les PAM riches en autres acides aminés	25
1.1.4 Les PAM composés d'acides aminés rares.....	26
1.1.5 Les PAM cycliques.....	27
1.2 LES PEPTIDES SYNTHETIQUES MODIFIES	28
1.3 LES PEPTIDOMIMETIQUES OU PSEUDOPEPTIDES ANTIMICROBIENS	30
1.3.1 Les β -peptides.....	30
1.3.2 Les α -peptoïdes et β -peptoïdes.....	31
1.3.3 Les azapeptides et azapeptoïdes	31
1.3.4 Les aza- β^3 -peptides.....	32
2 LES MEMBRANES DES BACTERIES.....	36
2.1 LE FEUILLET EXTERNE DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF.....	36
2.1.1 Localisation du lipopolysaccharide (LPS).....	36
2.1.2 Composition et structure du LPS.....	37
2.1.3 Hétérogénéité du LPS :	40
2.2 LES BACTERIES A GRAM POSITIF	42
3 MECANISME D'ACTION DES PAM.....	43
3.1 SELECTIVITE DES PAM	43
3.2 LES ETAPES INDUISANT LA MORT CELLULAIRE.....	44
3.2.1 Attraction et association des PAM.....	44
3.2.2 Insertion des PAM et perméabilisation de la membrane.....	45
4 MODELES MEMBRANAIRES ET ETUDES STRUCTURALES DES PAM PAR RMN	51
4.1 MICELLES DE DETERGENT	51
4.2 BICELLES.....	52
4.3 LIPOSOMES	54
5 LES EXPERIENCES RMN DE TRANSFERT D'AIMANTATION.....	58
5.1 LE TR-NOESY	58
5.2 LA STD.....	60
5.3 LE WATER-LOGSY	62
CHAPITRE I - ÉTUDE STRUCTURALE D'UN CYCLOLIPOPEPTIDE NATUREL	63
1 INTRODUCTION.....	64
1.1 LES BACTERIES DU GENRE VIBRIO.....	65
1.2 L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUE EN AQUACULTURE.....	67
1.3 L'UTILISATION DE PROBIOTIQUE EN AQUACULTURE.....	69
1.4 LE GENRE <i>PSEUDOALTEROMONAS</i> COMME PROBIOTIQUE	71
1.5 LES ALTERINES.....	71
1.5.1 Caractérisation de la structure chimique.....	71
1.5.2 Activité antibactérienne des Altérines.....	73
1.5.3 Propriété de liaison au LPS.....	75

2	OBJECTIF	77
3	RESULTATS	78
3.1	ÉTUDE DE L'ALTERINE980 DANS L'EAU	78
3.2	ÉTUDE DE L'ALTERINE980 EN PRESENCE DE LPS	78
3.3	STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ALTERINE980 LIEE AUX MICELLES DE LPS.....	81
4	DISCUSSION	90
CHAPITRE II - ÉTUDE STRUCTURALE DE PSEUDOPEPTIDES		97
1	INTRODUCTION	98
1.1	L'ORIGINE DES PSEUDOPEPTIDES ETUDIÉS	98
1.2	LES ACTIVITES ANTIBACTERIENNES	100
2	OBJECTIF	103
3	RESULTATS	104
3.1	STRUCTURE CHIMIQUE DU PEP18	104
3.2	STRUCTURE CHIMIQUE DU PEP19	105
3.3	STRUCTURE CHIMIQUE DU PEP16	106
3.4	ÉTUDE DES PEPTIDES DANS L'EAU	107
3.4.1	Attribution du Pep18.....	108
3.4.2	Attribution du Pep19.....	113
3.5	ÉTUDE DU PEP18 ET DU PEP19 EN PRESENCE DE LPS	117
3.6	STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE	118
3.6.1	Utilisation de micelles de LPS.....	118
3.6.2	Utilisation de SUV anioniques DOPC/DOPS.....	127
3.6.3	Utilisation de SUV zwitterioniques DOPC.....	133
3.7	EXTENSION DE LA METHODOLOGIE AU PEP16	139
4	DISCUSSION	142
CHAPITRE III - ÉTUDE DE L'INTERACTION DE GALACTOFURANOLIPIDES AVEC LA SOUCHE PARASITAIRE DE LEISHMANIA TARENTOLAE		152
1	INTRODUCTION	153
1.1	ORIGINE DU TERME <i>LEISHMANIA</i>	153
1.2	MORPHOLOGIE.....	153
1.3	LES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DE LEISHMANIOSES.....	154
1.3.1	<i>La leishmaniose viscérale</i>	154
1.3.2	<i>La leishmaniose cutanée</i>	154
1.3.3	<i>La leishmaniose cutanéomuqueuse</i>	154
1.4	REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA LEISHMANIOSE.....	155
1.5	VECTEUR PRINCIPAL DE TRANSMISSION DE LA LEISHMANIOSE.....	156
1.6	CYCLE DE VIE DE <i>LEISHMANIA</i>	156
1.7	TRAITEMENT DE LA MALADIE	158
1.7.1	<i>Sels d'antimoine</i>	158
1.7.2	<i>Amphotéricine B</i>	159
1.7.3	<i>Pentamidine</i>	160
1.7.4	<i>Paromomycine</i>	160
1.7.5	<i>Miltéfosine</i>	161
1.8	LE GLYCOCALYX DE <i>LEISHMANIA</i>	162
1.8.1	<i>Le LPG</i>	163
1.8.2	<i>Les GIPL</i>	165
1.8.3	<i>La GP63</i>	165
1.8.4	<i>Les protéophosphoglycans</i>	166
1.8.5	<i>Les phosphatases acides sécrétées</i>	166
2	OBJET DE L'ETUDE	167
3	RESULTATS ET DISCUSSION	169

3.1	RESULTATS RMN	169
3.2	RESULTAT D'ACTIVITE ANTI-LEISHMANIENNE DU GALF-OCT	171
3.3	RESULTATS D'ACTIVITE ANTI-LEISHMANIENNE DE LA BIBLIOTHEQUE DE COMPOSES	173
3.3.1	<i>Les galactofuranoses d'acyle</i>	173
3.3.2	<i>Les Furanosides d'octyle fluoré</i>	176
4	CONCLUSION	180
5	ÉTUDE PRELIMINAIRE DE L'ACTIVITE ANTI-LEISHMANIENNE DE PSEUDOPEPTIDES.....	182
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	185
	MATERIELS ET METHODES - CHAPITRE I ET II.....	188
1	PREPARATION DES SUV.....	189
2	PREPARATION DES MICELLES DE LPS.....	189
3	BACTERIE UTILISEE EN RMN	189
3.1	COMPTAGE DES BACTERIES	190
4	DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	190
5	SPECTROSCOPIE RMN	191
6	MODELISATION MOLECULAIRE	192
	MATERIELS ET METHODES - CHAPITRE III	193
1	CULTURE DES <i>LEISHMANIA</i>	194
2	CULTURE DE <i>C. FASCICULATA</i>	194
3	COMPTAGE DES PARASITES	194
4	TRAITEMENT DES CULTURES ET PREPARATION D'ECHANTILLONS POUR L'ETUDE PAR RMN.....	194
5	PREPARATION DES GALACTOFURANOSSES D'ACYLE ET DES FURANOSIDES D'OCTYLE FLUORE POUR LES TESTS D'INHIBITIONS	195
6	TEST D'INHIBITION	195
	BIBLIOGRAPHIE	197
	ANNEXE – LISTE DES ACTIONS DE DIFFUSION ET DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	226

Liste des abréviations

2D : Bidimensionel(le)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMBER : Assisted Model Building and Energy Refinement

APD : Antimicrobial Peptide Database

ARN : Acide RiboNucléique

CFU : Unité Formant Colonie

CLP : CycloLipoPeptide

CMC : Concentration Micellaire Critique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COSY : COrrrelation SpectroscopY

DHPC : Dihexanoylphosphatidylcholine

DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion de lumière)

DMPC : DiMyristoylPhosphatidylCholine

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

DPC : DodecylPhosphoCholine

FAO : Food and Agriculture Organization

fPPG : Protéophosphoglycans filamenteux

GIPL : GlycoInositol PhosphoLipids

GP63 : GlycoProtéine 63

GPI : Glycosyl-PhosphatidylInositol

GUV : Giant Unilamellar Vesicles

HEPES : Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

KDO : Acide-3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique

LAL : Lysat d'Améboocytes de Limules

LB = Luria-Bertani

LPG : LipoPhosphoglycane

LPS : Lipopolysaccharide

LUV : Large Unilamellar Vesicles

MDR : Multi-Drug Resistance

MeOH : Méthanol

MLV : Multilamellar Vesicles

mPPG : Protéophosphoglycans membranaires

NOE Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OLV : Oligolamellar Vesicles

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAM : Peptide AntiMicrobien

PBS : Phosphate Buffered Saline

PMB : Polymyxine B

PME : Polymyxine E

PPG : Protéophosphoglycans

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

R-LPS : Rough-LPS

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root Mean Square Deviation

ROESY : Rotating-frame Overhauser Spectroscopy

RX : Rayon-X

S-LPS : Smooth-LPS

sAP : secreted Acid Phosphatase

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méthicilline

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

sPPG : Protéophosphoglycans sécrété

SPR : Surface Plasmon Resonance (Résonance Plasmonique de Surface)

SR-LPS : Semi-Rough-LPS

STD : Saturation Transfer Difference

SUV : Small Unilamellar Vesicles

TFE : TriFluoroEthanol

TOCSY : TOtal Correlation Spectroscopy

Tr-NOE : Transferred Nuclear Overhauser Effect

Tr-NOESY : Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

TSP : TriméthylSilyl Propionate

Water-LOGSY : Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy

Arg	Arginine
Aza-Val	Aza-valine
DAB	Acide-2,4-diaminobutyrique
DHB	Déhydrobutyrine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Nal	Aza- β^3 -naphthylalanine
OH-DAB	Acides-2-hydroxy-diaminobutyriques
Phe	Phenylalanine
Trp	Tryptophane

Comme souvent en science de nombreux termes ou concept sont traditionnellement en anglais. J'ai essayé de les traduire, néanmoins il se peut que certains termes soient restés en anglais, je vous prie de bien vouloir m'en excuser.

Introduction bibliographique

1 Les peptides antimicrobiens

Représentant la première ligne de défense dans la lutte contre les agents pathogènes, les peptides antimicrobiens (PAM), présents dans quasiment tous les organismes vivants sont majoritairement impliqués dans la réponse immunitaire innée^{7,20,21}. Certains PAM peuvent être exprimés de façon constitutive, d'autres peuvent être induit suite à une infection causée par des agents infectieux externes²².

Bien qu'ils soient issus d'une très grande diversité d'organismes vivants, ils présentent des propriétés communes caractéristiques. En général, les peptides antimicrobiens sont composés d'environ 50% de résidus hydrophobes, comportent au maximum 50 acides aminés et un excès de résidus basiques (arginine, histidine, lysine) leur conférant un caractère cationique global marqué à pH physiologique²³.

Les PAM suscitent un vif intérêt notamment en raison de leur éventail d'activité considérable contre divers micro-organismes. En effet, la majorité des PAM présente des activités contre les bactéries (Gram – et Gram +), les virus, les champignons ainsi que les protozoaires. Un grand espoir est placé en ces peptides afin de lutter contre l'émergence accrue de micro-organismes développant de multiples résistances aux antibiotiques⁶.

Avec plus de 3000 PAM référencés, l'APD (Antimicrobial Peptide Database) créée en 2003 est la base de données la plus importante sur les peptides antimicrobiens²⁴. Les PAM peuvent être classés en trois grandes familles, les PAM naturels, les PAM synthétiques modifiés et les pseudopeptides antimicrobiens.

1.1 Les peptides antimicrobiens naturels

Les PAM naturels sont des peptides provenant d'organismes vivants variés tels que les animaux, les plantes, les insectes et même les bactéries. Le premier PAM a été découvert par René Dubos en 1939 suite à l'extraction de la gramicidine des bactéries à Gram positif de *Bacillus brevis*²⁵.

Les PAM naturels sont classifiés dans des groupes créés en s'appuyant sur différents critères comme la structure secondaire, la structure tridimensionnelle, la présence ou non de ponts disulfures ainsi que la composition en acides aminés.

1.1.1 Les helices α amphipathiques

La classe des peptides linéaires se structurant en hélice α amphipathique en milieu membranaire représente la classe de peptide la plus répandue et la plus largement étudiée. Certains de ces peptides possèdent une activité antimicrobienne et une faible cytotoxicité. C'est notamment le cas des cécropines²⁶, isolées par Boman à partir des pupes du papillon *Hyalophora cecropia*²⁷ ainsi que celui des magainines (Figure 1) extraites par Zasloff de la peau de *Xénotopus laevis*, la grenouille africaine à griffes²⁸. Certaines études montrent que ces peptides se structurent en hélice α amphipathique dans une solution aqueuse contenant du trifluoroéthanol^{29,30}.

A l'inverse des cécropines et des magainines présentant une activité sélective pour les micro-organismes, la pardaxine isolée de *Pardachirus marmoratus*, la sole de Moïse³¹ et de *Pardachirus pavoninus*, la sole paon³² ainsi que la mélittine, extraite du venin d'*Apis mellifera*, l'abeille européenne domestique³³, sont deux autres peptides à la fois antimicrobien et cytotoxique³⁴. Chez certains PAM, comme la magainine, la structuration en hélice α amphipathique est indispensable pour présenter une activité antimicrobienne^{35,36}. En revanche, la disparition de cette structuration peut s'avérer bénéfique dans le cas de certains peptides tel que la pardaxine. En effet, l'absence d'hélice α chez ce dernier engendre la perte de sa cytotoxicité pour les cellules de mammifères tout en conservant une activité antimicrobienne élevée³⁶⁻³⁸.

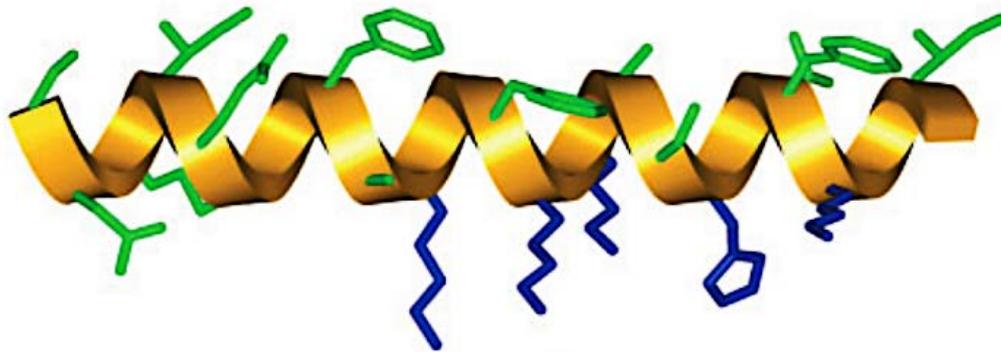


Figure 1 : Structure de la magainine 2 avec la partie hydrophobe en vert et la partie polaire en bleu. D'après Nüsslein, 2006³⁹ - Détermination structurale par RMN (PDB : 2MAG)

1.1.2 Les PAM riches en cystéine

Exprimés dans de nombreux organismes vivants, cette classe de peptides est caractérisée par la formation d'un ou plusieurs ponts disulfures due à la présence de résidus cystéines. Certains de ces peptides se structurent en feuillets β , en épingle à cheveux β tandis que d'autres adoptent des structures mixtes hélice α /feuillets β ⁴⁰.

Les peptides constitués d'un unique pont disulfure tels que les tigérinines d'amphibiens⁴⁰, la thanatine d'insecte (Figure 2)⁴¹, la bacténécine des mammifères⁴², ainsi que ceux composés de deux ponts disulfures comme les protégrines extraites des leucocytes de porcs⁴³ et la gomésine exprimée par l'araignée *Acanthoscurria Gomesiana*⁴⁴ présentent une structure en épingle à cheveux.

Considérées comme les constituants majeurs des PAM riches en cystéine, les défensines présentes chez les vertébrés, les invertébrés et les plantes sont constituées de trois ou quatre ponts disulfures. Le terme défensine regroupe deux superfamilles de protéines indépendantes en termes de structure et de phylogénie^{45,46}.

- La première famille comporte essentiellement les défensines de vertébrés avec les α -défensines agencées en feuillets béta, et les β -défensines pouvant comporter également une hélice N-terminale.
- La seconde superfamille rassemble particulièrement les défensines de plantes et d'insectes organisées autour d'un motif CS $\alpha\beta$ (Cystéin-Stabilized alpha-helix beta-sheet)⁴⁷.

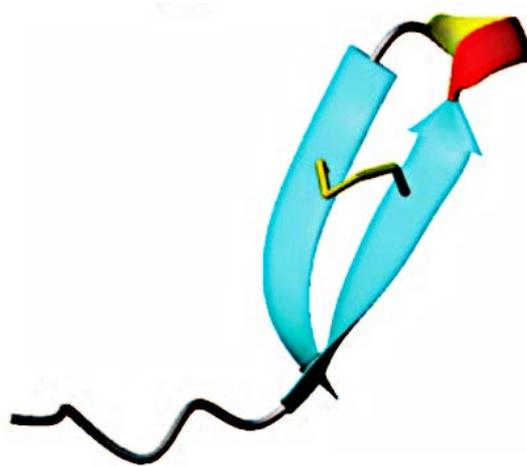


Figure 2 : Structure de la thanatine présentant un unique pont disulfure (pont disulfure en jaune). D'après Jenssen, 2006⁴⁸ - Détermination structurale par RMN (PDB : 8TFV)

1.1.3 Les PAM riches en autres acides aminés

Dépourvus de structure en hélice α et feuillet β , ces peptides sont très peu structurés. Cette classe de PAM concerne les peptides comportant un nombre élevé en certains acides aminés dans leur séquence. Par exemple, les bacténécines Bac-5 et Bac-7^{49,50} ainsi que le peptide PR-39⁵¹ provenant respectivement du bœuf et du porc sont riches en prolines et arginines. L'histatine⁵²⁻⁵⁴ sécrétée dans la salive humaine est riche en histidine alors que les indolicidines (Figure 3)⁵⁵ isolée du bœuf sont composés majoritairement de tryptophanes. La tritrypticine extraite du porc est composée principalement d'arginine et de tryptophane (Figure 3)⁵⁶.

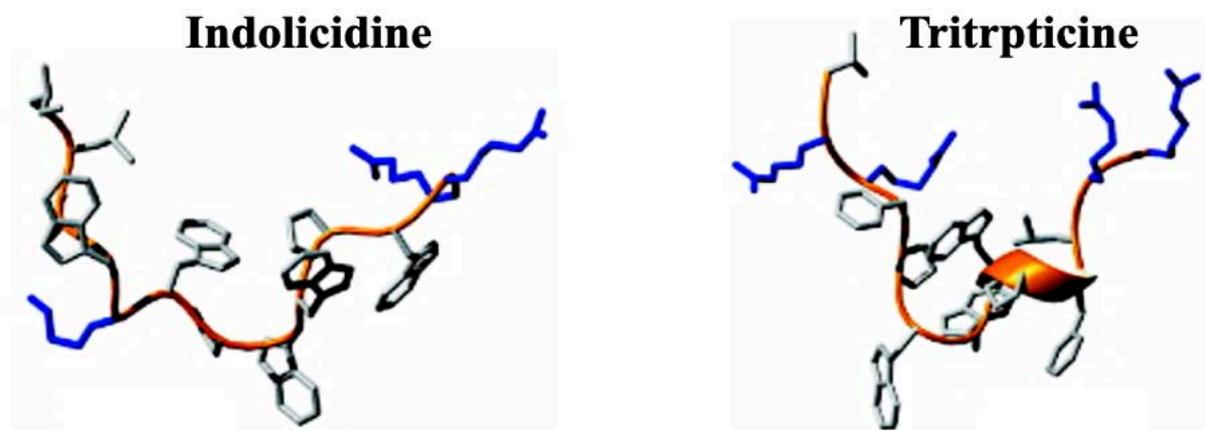


Figure 3 : Structure de l'indolicidine et de la tritrypticine. D'après Nguyen, 2011⁵⁷ - Détermination structurale par RMN : Indolicidine (PDB : 1G89) - Tritrypticine (PDB : 1D6X)

1.1.4 Les PAM composés d'acides aminés rares

Les lantibiotiques⁵⁸ et les peptaïbols⁵⁹, isolés respectivement de bactéries ou de champignons, représentent les deux familles de cette classe de PAM composés d'acides aminés rares.

- Les lantibiotiques

La nisine (Figure 4)⁶⁰ extraite de la bactérie *Lactococcus lactis* représente le lantibiotique le plus populaire⁶¹. Elle comporte dans sa séquence des résidus tels que la lanthionine, la méthyllanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine⁶². La présence de ces acides aminés dans la famille des lantibiotiques provient de modification post-traductionnelle⁶³. La subtiline⁶⁴ ainsi que l'épidermine^{65,66} font également partie de la famille des lantibiotiques.

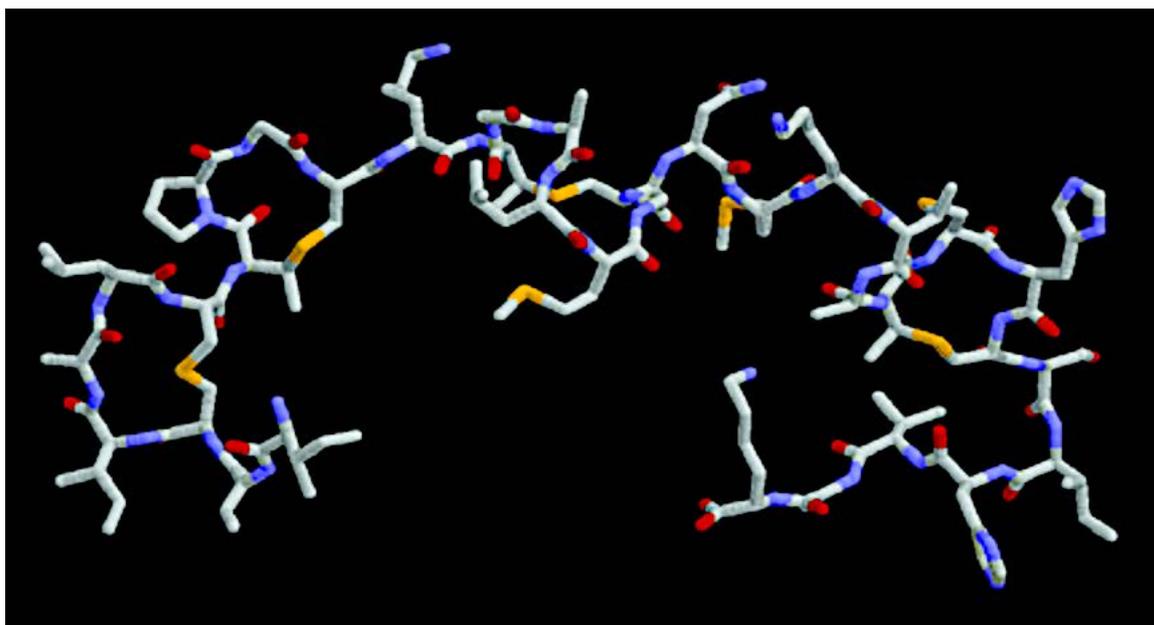


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la nisine. D'après Chatterjee, 2005⁶² - Détermination structurale par RMN (PDB : 1WCO)

- Les peptaïbols

Actif contre les bactéries et les levures, les peptaïbols comme l'alaméthicine provenant de *trichoderma viride*⁶⁷ ou encore les trichorzianines⁶⁸ et les longibrachines⁶⁹ comportent dans leurs séquences des résidus rares telles que de l'acide α -aminoisobutyrique, de l'isovaline et un amino-alcool à l'extrémité C-terminale⁷⁰.

1.1.5 Les PAM cycliques

Cette dernière classe de PAM naturels rassemble les peptides dont la structure est cyclique comme la gramicidine S découverte en 1944 par Gause et Brazhnikova⁷¹. Cette dernière, isolée à partir de la bactérie du sol *Aneurinibacillus migulanus*⁷² est composée d'un cycle de dix acides aminés dont certains sont peu fréquents telles que la phénylalanine en configuration D et l'ornithine⁷³. La gramicidine S est active contre plusieurs types de micro-organismes tels que de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi qu'une multitude de champignons, cependant elle est fortement hémolytique. Il a été démontré qu'elle se structure en feuillets β antiparallèles⁷⁴.

La polymyxine B (Figure 5) et la colistine (polymyxine E) exprimées par la bactérie *Paenibacillus polymyxa*⁷⁵⁻⁷⁷ sont deux antibiotiques cyclolipopeptidiques découverts fin 1950 début 1960⁷⁸⁻⁸⁰. Elles présentent des activités contre de nombreuses bactéries à Gram négatif⁸¹. Néanmoins, en raison de leurs néphrotoxicité sévère, elles sont aujourd'hui utilisées seulement en dernier recours^{79,82}. Du fait d'une toxicité et d'une fluctuation pharmacocinétique plus élevée pour la colistine, la polymyxine B est la plus employée^{82,83}. La polymyxine B est un décapeptide comportant un cycle avec sept acides aminés et une chaîne latérale de trois résidus à laquelle est liée par une liaison amide une chaîne grasse. Sur les dix acides aminés composant la polymyxine B, six correspondent à l'acide 2,4-diaminobutyrique (Dab) conférant à ce lipopeptide cyclique une charge cationique marquée (+5) à pH physiologique. Comme la gramicidine S, elle comprend une phénylalanine en configuration D. Sa cyclisation est réalisée par le biais du Dab en position quatre^{79,84}.

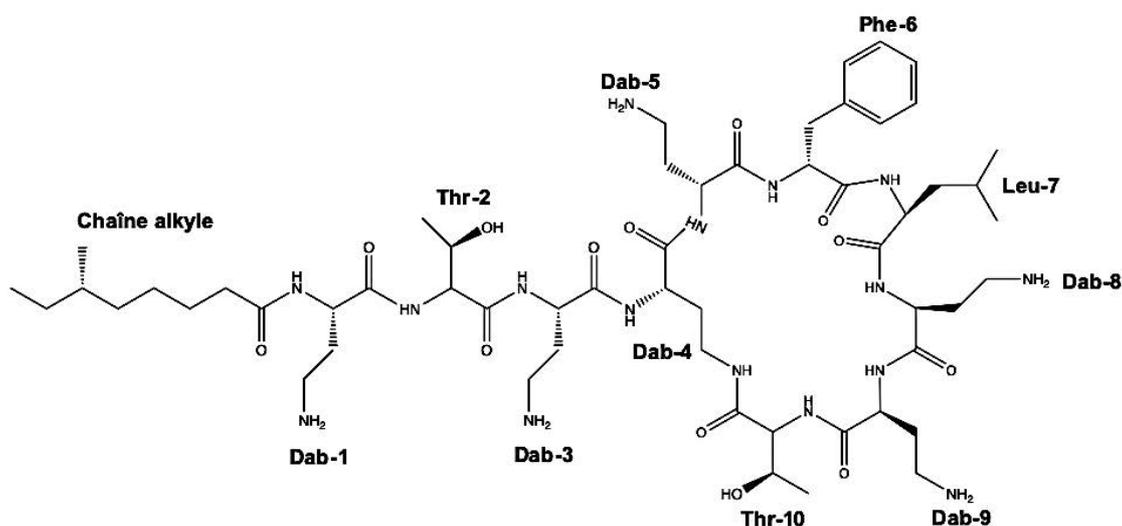


Figure 5 : Structure chimique de la polymyxine B. D'après Avedissian, 2019⁸³

1.2 Les peptides synthétiques modifiés

Les PAM suscitent depuis de nombreuses années un fort intérêt, cependant leurs mécanismes d'action ne sont pas tous entièrement caractérisés et parfaitement compris. De plus, pour obtenir une quantité convenable de PAM issus d'organismes vivants, il est nécessaire d'utiliser une quantité considérable de matière première. Par exemple, afin de purifier 40 µg de dermaseptine, il est requis d'utiliser 1g de peau séchée de grenouille *phyllomedusa sauvagii*⁸⁵. Ainsi pour palier à ces problèmes, la synthèse de PAM par voie chimique sur support solide⁸⁶⁻⁸⁸ a vu le jour, permettant d'obtenir des rendements élevés de peptide et de ce fait d'augmenter le nombre d'essais en vue d'une meilleure compréhension de leurs modes d'action.

Outre la possibilité d'obtenir des quantités abondantes de peptide, la synthèse chimique des peptides a ouvert la voie à de nombreuses possibilités telles que la substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés de configuration D, ou d'autres résidus non naturels ainsi que la cyclisation de certains PAM linéaires ou encore l'incorporation d'une chaîne grasse. Le but de ces modifications est d'accroître la stabilité des peptides afin de résister aux protéases mais également d'augmenter l'index thérapeutique c'est-à-dire d'augmenter l'activité antimicrobienne des peptides tout en diminuant la toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes. Dans cette partie, seul quelques exemples de peptides obtenus par synthèse chimique seront présentés.

La magainine, isolée directement de la grenouille africaine à griffes dont la configuration des acides aminés est L et son énantiomère D synthétisée par voie chimique présentent une activité antimicrobienne quasiment identique et sont tous deux dépourvus de toxicité envers les érythrocytes humains. En revanche, la substitution des acides aminés L par leurs homologues D confère au peptide une meilleure résistance à la dégradation par les protéases^{35,89}.

La pardaxine a été synthétisée avec une substitution partielle de certains acides aminés L par leurs homologues D. Ces diastéréoisomères de la pardaxine dépourvus de structure en hélice α amphipathique conservent une activité antimicrobienne importante. Cependant, à l'inverse de la pardaxine isolée de la sole, aucune cytotoxicité n'a été décelée pour les cellules de mammifères³⁸.

De la même façon que la substitution d'acides aminés L par leurs homologues D peut permettre une augmentation de la stabilité, la synthèse chimique a permis d'augmenter la stabilité de certains peptides par la substitution de quelques acides aminés naturels par d'autres résidus peu fréquents. C'est notamment le cas de l'oncocine avec le remplacement de deux arginines par deux ornithines qui a engendré une dégradation beaucoup plus lente du peptide⁹⁰.

Le groupe de Dathe s'est penché sur les effets engendrés par la cyclisation des PAM linéaires et notamment les hexapeptides riches en arginines et tryptophanes de type Ac-RRWWRP-NH₂⁹¹. Ces hexapeptides linéaires présentent une activité antimicrobienne élevée tout en ayant une faible toxicité⁹²⁻⁹⁴. La cyclisation a permis d'augmenter encore plus l'activité antimicrobienne de ces peptides mais a provoqué une légère augmentation de leur cytotoxicité contre les érythrocytes. Bien que ces cyclohexapeptides présentent une cytotoxicité supérieure à leurs analogues linéaires, la concentration bactéricide est nettement inférieure. Ainsi ces cyclohexapeptides présentent un index thérapeutique bien plus élevé.

La chaîne grasse composant la polymyxine B s'est avérée primordiale pour son activité antimicrobienne⁹⁵. En effet, elle permet au peptide de s'insérer dans la membrane et de la déstabiliser. Lorsque la polymyxine B en est dénuée, son activité antimicrobienne est insuffisante. Ainsi, une multitude de peptides naturels tels que la cathépsine G⁹⁶ ou encore les magainines⁹⁷ se sont vus additionner une chaîne alkyle avec comme effet une augmentation considérable de l'activité bactéricide pour la cathépsine G et fongicide pour les magainines.

1.3 Les peptidomimétiques ou pseudopeptides antimicrobiens

La dégradation des PAM par les protéases représente un problème majeur en raison d'une durée de vie relativement faible. Il a été montré que les PAM ne comportant que des acides aminés naturels sont rapidement dégradés par les protéases. Pour parer à ce manque de stabilité des peptides, l'ultime alternative a été de développer des pseudopeptides antimicrobiens, résultant d'une modification de la liaison peptidique¹¹. En général, ces pseudopeptides antimicrobiens, présentent une activité antimicrobienne et une sélectivité voisine de celles du PAM parent. Néanmoins, leur résistance aux protéases est nettement supérieure⁹⁸. Du fait d'une trop grande diversité de peptidomimétiques, seuls les β -peptides, les α - et β -peptoïdes ainsi que les azapeptides et azapeptoïdes sont brièvement présentés. Les aza- β^3 -peptides étudiés et caractérisés au cours de cette thèse font l'objet d'une analyse plus approfondie.

1.3.1 Les β -peptides

C'est en 1996 que les premiers travaux sur les β -peptides, ont été publiés par les deux groupes : Seebach⁹⁹ et Gellman¹⁰⁰. Les β -peptides comportent des acides aminés β , caractérisés par la présence d'un groupement méthylène supplémentaire localisé entre l'acide carboxylique et l'amide permettant de leur conférer une plus grande flexibilité. Ainsi, la chaîne latérale des acides aminés β peut se situer soit sur le carbone en position 2 (c'est-à-dire à côté du carbonyle) soit sur le carbone en position 3 (c'est-à-dire à côté de l'amide) (Figure 6). Les dénominations β^2 - et β^3 -peptides ont alors été soumises par Seebach permettant de préciser le carbone portant la chaîne latérale¹⁰¹. Les β -peptides présentent une grande résistance à la dégradation protéolytique¹⁰².

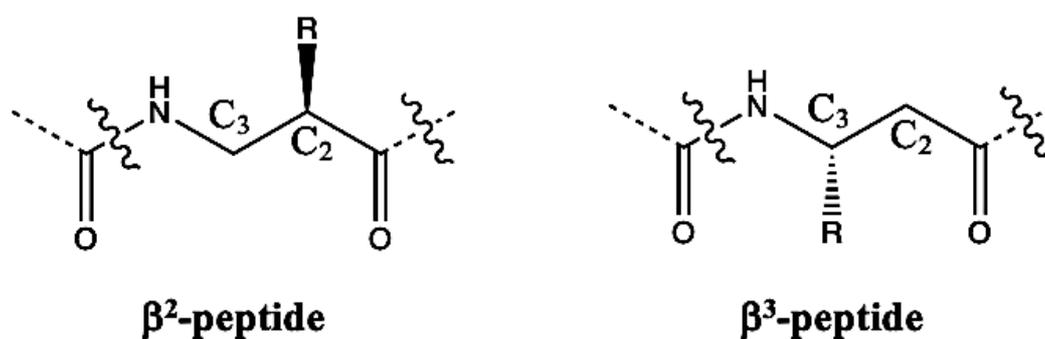


Figure 6 : Exemple de β^2 - et β^3 -peptides

1.3.2 Les α -peptoïdes et β -peptoïdes

Contrairement aux peptides conventionnels dont les chaînes latérales se situent sur les carbones $C\alpha$, les peptoïdes, développés en 1992 par Zuchermann, arborent leurs chaînes latérales sur les atomes d'azotes (Figure 7)^{103,104}. En lien avec les β -peptides, Hamper a développé les β -peptoïdes à la fin des années 90¹⁰⁵.

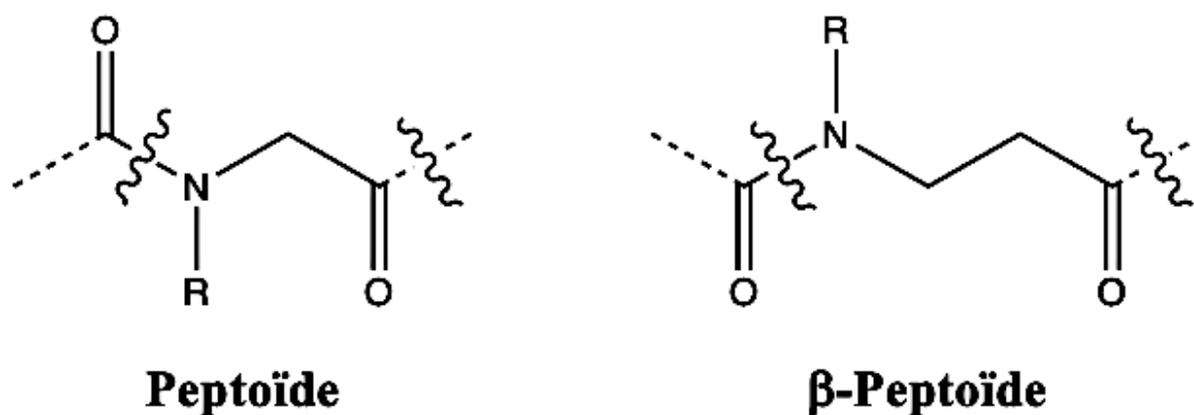


Figure 7 : Peptoïde et β -Peptoïde

L'absence de liaison hydrogène ainsi que la présence de groupement méthylène sur le squelette peptidique rend ces pseudopeptides très flexibles desservant donc la structuration secondaire^{106,107}. Exempts de protons amides, ces pseudopeptides traversent aisément les membranes ce qui permet d'augmenter leurs biodisponibilités¹⁰⁸. De plus, la résistance à la dégradation par les protéases^{109,110} ainsi que la simplicité de synthèse¹¹¹ font que ces pseudopeptides suscite un vif intérêt.

1.3.3 Les azapeptides et azapeptoïdes

Les azapeptides et azapeptoïdes disposent d'au moins un résidu « aza » issu du remplacement du carbone $C\alpha$ par un atome d'azote (Figure 8). Pour les azapeptides, les chaînes latérales des résidus « aza » se situent sur l'atome d'azote $N\alpha$ ¹¹², tandis que les acides aminés « aza » des azapeptoïdes arborent leurs chaînes latérales sur l'atome d'azote $N\beta$ ¹¹³.

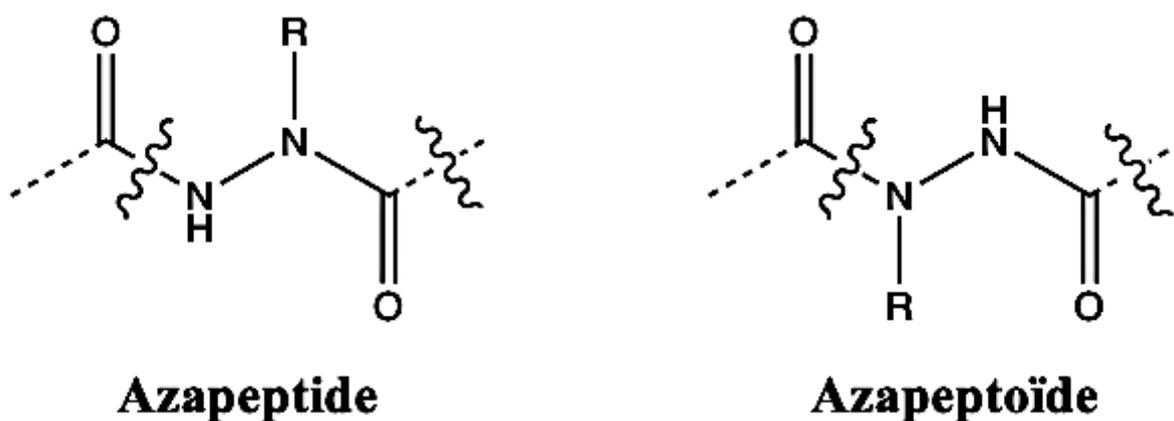


Figure 8 : azapeptide et azapeptoid

La première substitution d'un acide aminé dans un peptide naturel par un résidu « aza » a été réalisé en 1963 par Hess¹¹⁴. Les azapeptides présentent une remarquable résistance aux enzymes protéolytiques¹¹². En effet, ils sont en incapacité de présenter des structures étendues en feuillet β empêchant ainsi le clivage par des peptidases qui se lient au substrat peptidique dans une telle conformation comme par exemple la chymotrypsine¹¹⁵. Les azapeptides permettent de bloquer l'activité de certaines protéases comme la protéase NS3 indispensable à la multiplication du virus de l'hépatite C^{116,117}.

1.3.4 Les aza- β^3 -peptides

Par analogie aux azapeptides, les aza- β^3 -peptides résultent de la substitution du carbone C_β des acides aminés β^3 par un atome d'azote pouvant alterner entre une configuration R ou S (Figure 9)^{13,14,118}. La configuration que prendra l'atome d'azote dépendra de l'environnement, de l'encombrement stérique ainsi que des interactions. Ainsi, tous les acides aminés aza- β^3 sont en capacité de mimer les acides aminés β^3 de configuration L ou D¹⁵. La présence de groupement méthylène supplémentaire dans les aza- β^3 -peptides permet une augmentation de la flexibilité.

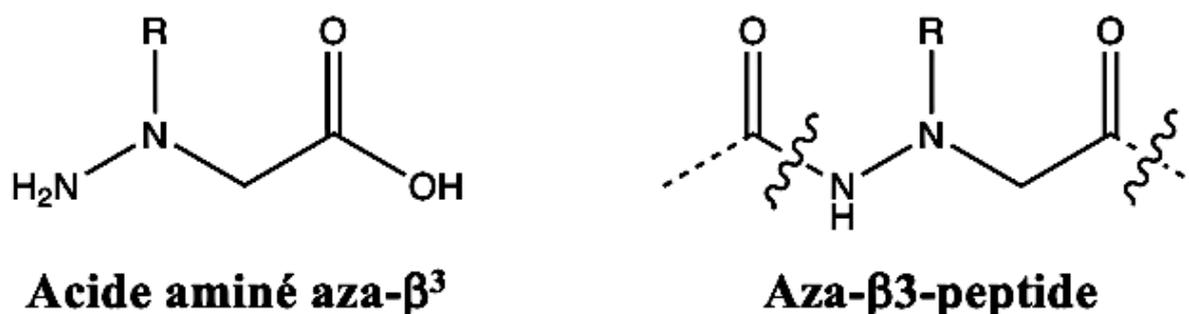


Figure 9 : représentation d'un acide aminé aza- β^3 et d'un aza- β^3 -peptide

A l'état solide ainsi qu'en solution dans un milieu organique ou aqueux, les aza- β^3 -peptides adoptent des conformations stabilisées par des réseaux de liaisons hydrogène (Figure 10)^{16,17}. Une liaison hydrogène s'établit entre le proton de l'azote $H_{N_{i+1}}$ et le doublet non-liant de l'oxygène du carbonyle O_{i-1} et une autre se forme entre le proton $H_{N_{i+1}}$ et le doublet non-liant de l'azote N_i (Figure 11).

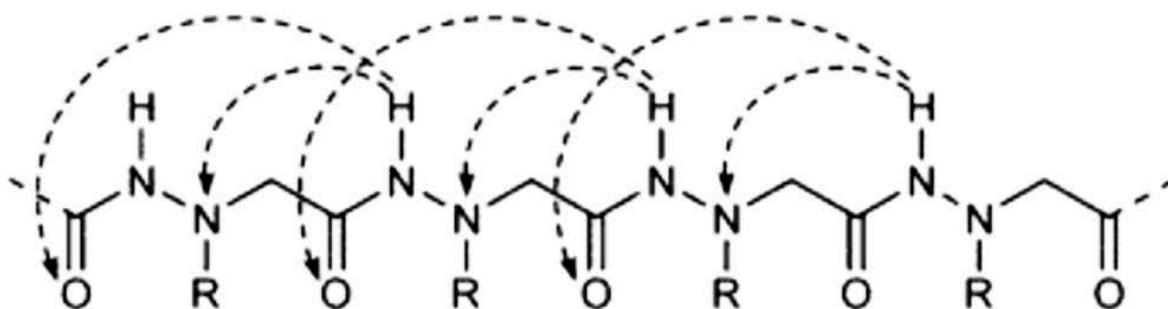


Figure 10 : liaisons hydrogène formées dans les aza- β^3 -peptide. D'après Le Grel, 2006¹¹⁹

Il résulte de ces liaisons hydrogènes, le déblindage en RMN des protons amides aza- β^3 avec des déplacements chimiques qui se situent aux alentours de 9 ppm ainsi que la formation d'une répétition consécutive de pseudocycles bifides à huit chaînons qualifiés d'hydrazinoturns (N-N turns) (Figure 11)¹¹⁸.

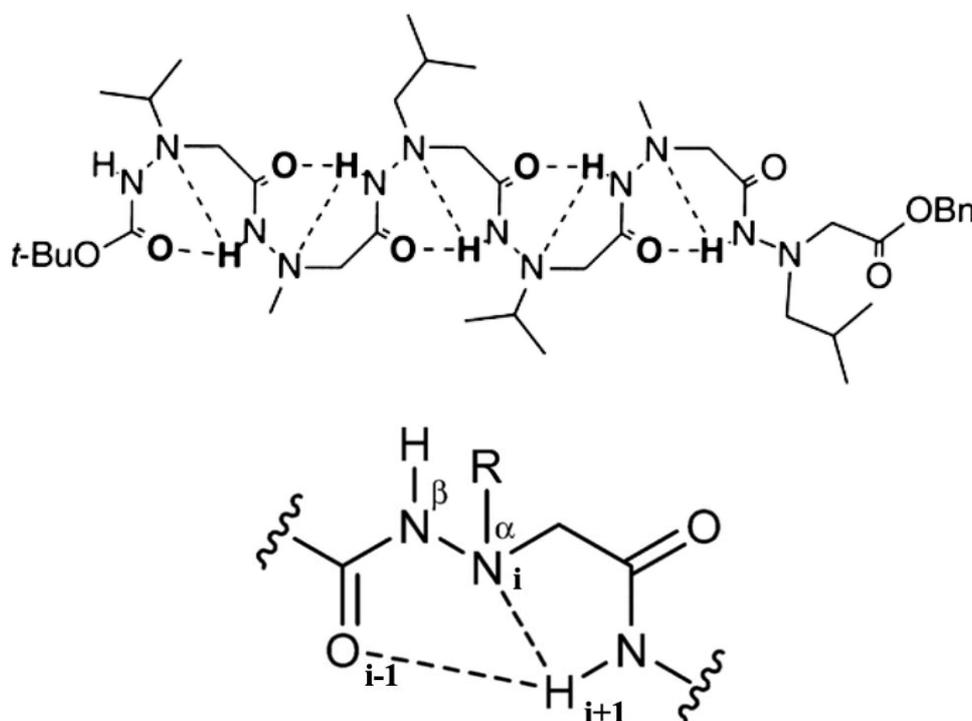


Figure 11 : Répétition consécutive de pseudocycles bifides à huit chaînons (haut). D'après Cheguillaume, 2001¹³. Motif hydrazinoturn (bas). D'après Le Grel, 2006¹¹⁹

L'analyse par Rayon-X (RX) d'un aza- β^3 -cyclohexapeptide a confirmé la variation de configuration des atomes d'azote arborant les chaînes latérales. En effet, deux énantiomères sont observables pour ce pseudopeptide cyclique entièrement constitué de résidus aza- β^3 montrant clairement le changement alternatif R et S des azotes pyramidaux (Figure 12)¹¹⁹. Ainsi, les aza- β^3 -peptides ne présentent pas une unique structure secondaire¹¹⁸.

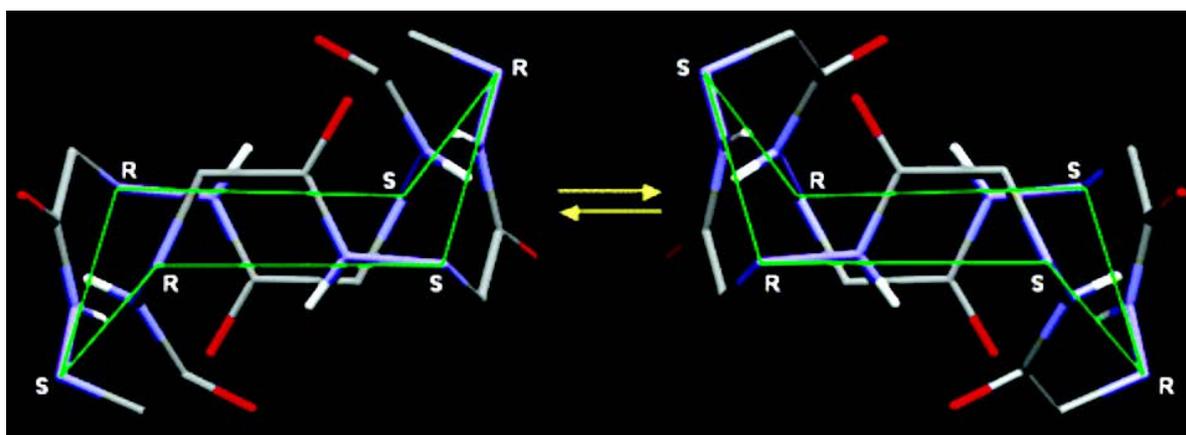


Figure 12 : représentation des deux structures adoptées par un aza- β^3 -cyclohexapeptide. D'après Le Grel, 2006¹¹⁹

La configuration des atomes d'azotes pyramidaux peut aussi être maintenue dans les peptides cycliques de compositions mixtes, alternant entre des résidus aza- β^3 et des acides α -aminés naturels^{15,17,120}. Ces pseudopeptides cycliques hybrides présentent aussi la capacité de former des hydrazinoturns. Cela va engendrer la formation d'une liaison hydrogène entre le proton de l'azote $H_{N_{i+2}}$ et le doublet non-liant de l'oxygène du carbonyle O_i de deux résidus aza- β^3 permettant ainsi la formation d'un pseudocycle à sept chaînons stabilisant des γ -turns à l'endroit de l'acide α -aminé (Figure 13)¹⁷.

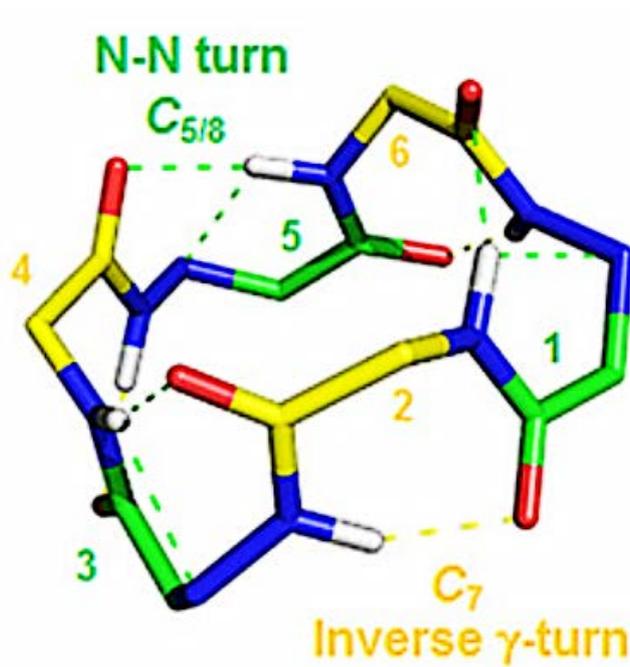


Figure 13 : Liaisons hydrogène formées dans un peptide hybride composé de résidus aza- β et d'acides α -aminés naturels - Jaune : α -acide aminé, vert : acide aminé aza- β , bleu : atome d'azote, rouge : atome d'oxygène, blanc : atome de proton, pointillé vert : N-N turn, pointillé jaune : γ -turn inverse. D'après Laurencin, 2018¹⁷

2 Les membranes des bactéries

La surface bactérienne est associée à la première ligne de défense pour faire face aux agents antimicrobiens ainsi qu'aux stress engendrés par les variations d'environnement proche de la bactérie. La compréhension des interactions bactérie-hôte passe par la caractérisation de la surface bactérienne.

2.1 Le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif

2.1.1 Localisation du lipopolysaccharide (LPS)

Les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par deux membranes bien distinctes, la membrane interne et la membrane externe (Figure 14). Cette dernière comporte un double feuillet lipidique asymétrique, le feuillet interne composé de phospholipides et le feuillet externe dont le lipopolysaccharide (LPS) également connu sous le nom d'endotoxine est l'élément principal¹²¹. C'est un glycolipide qui est spécifique et unique aux bactéries Gram négatif. Une estimation du recouvrement de la membrane externe par le LPS est évaluée à 90 %¹²². Les molécules de LPS se lient entre elles via des cations divalents de magnésium (Mg^{2+}) et de calcium (Ca^{2+}). Des ponts sont ainsi formés entre les phosphates des molécules de LPS par l'intermédiaire de ces cations permettant à la membrane externe d'être suffisamment imperméable aux agents bactéricides^{123,124}.

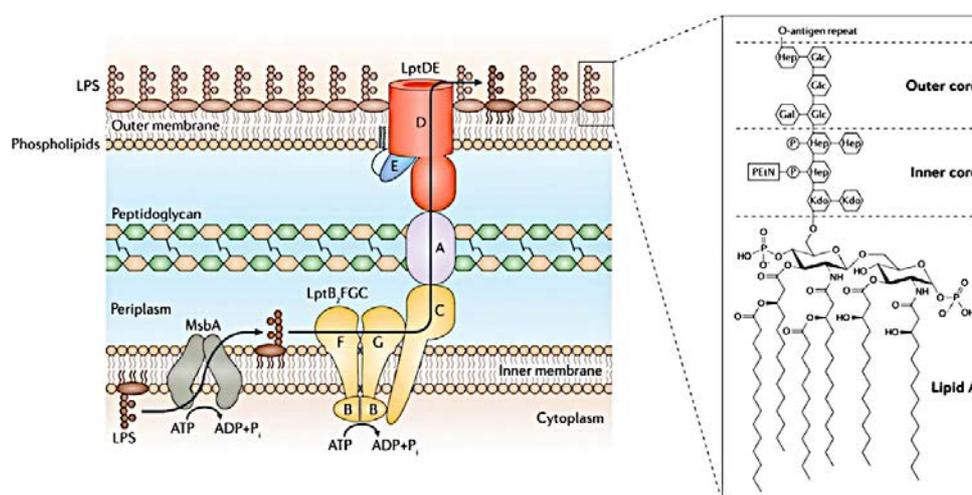


Figure 14 : Représentation schématique d'une membrane de bactérie à Gram négatif avec zoom sur le LPS. D'après Sondhi, 2020¹²⁵

2.1.2 Composition et structure du LPS

Le LPS, élément majeur des bactéries à Gram-négatif est une molécule amphiphile dont la masse moléculaire est de l'ordre de 10 kDa¹²⁶. Pour un grand nombre de bactéries, il est composé de trois parties bien distinctes, le lipide A, le cœur oligosaccharide et l'antigène O (Figure 15)¹²¹.

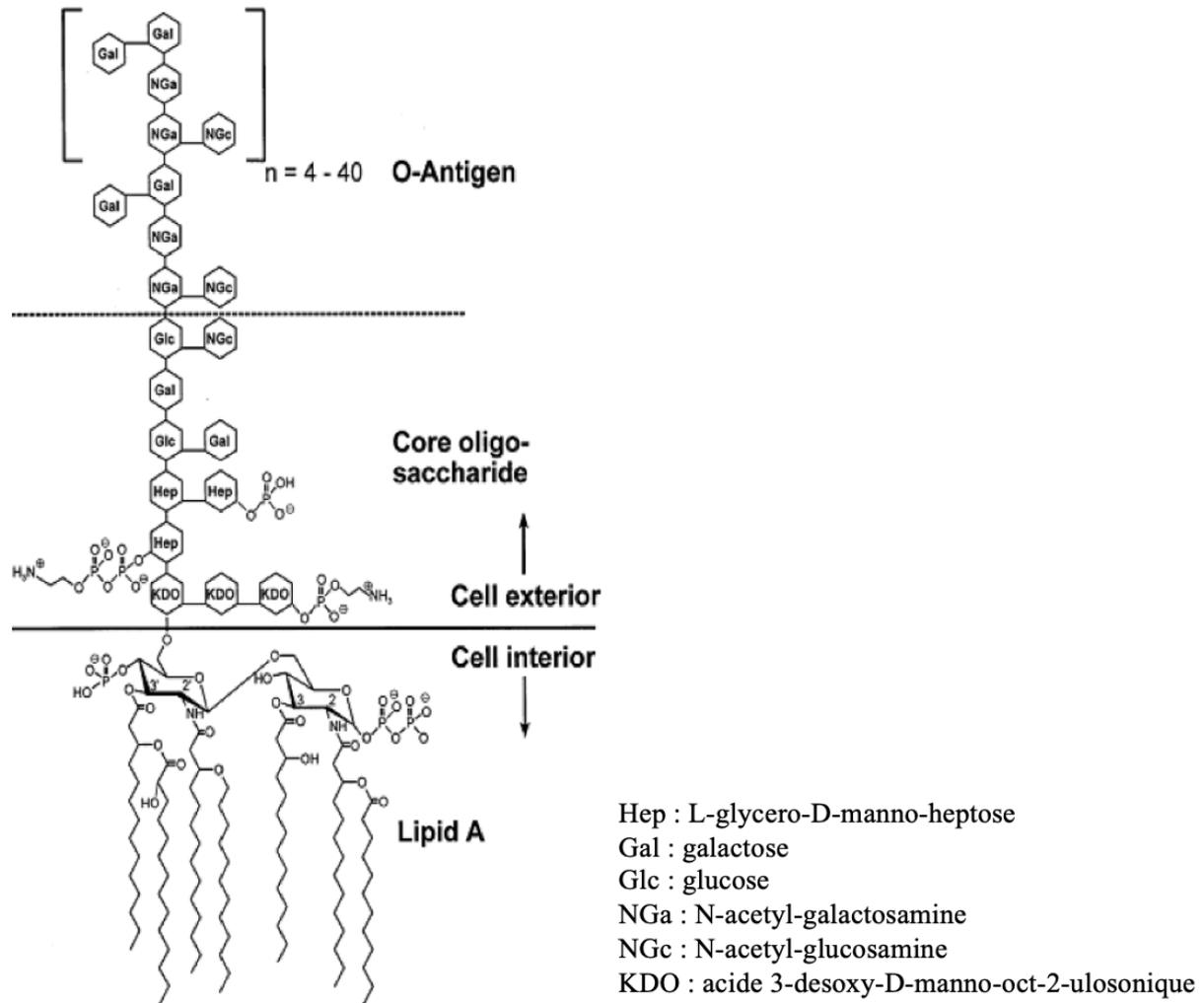


Figure 15 : Structure chimique d'un LPS. D'après Ohno, 1989¹²⁷

2.1.2.1 Lipide A

De manière générale, le lipide A est composé d'un disaccharide phosphorylé sur lequel sont greffées des chaînes grasses correspondant à la partie lipidique du LPS. Ces chaînes grasses correspondent à la zone hydrophobe et font parties intégrantes du feuillet externe de la

membrane externe des bactéries à Gram négatif (Figure 14). Le lipide A est le constituant bioactif du LPS responsable de l'activation du système immunitaire inné impliquant le récepteur TLR4 pouvant conduire jusqu'au choc septique¹²⁸⁻¹³⁰.

Il correspond à l'une des structures bactériennes extrêmement préservée. Néanmoins, l'étude structurale du lipide A de multiples organismes a révélé une diversité étonnamment grande¹³¹. Les caractéristiques structurales du lipide A contribuant à l'activation du récepteur TLR4 comprennent le nombre de chaînes grasses ainsi que leurs longueurs et le degré de phosphorylation¹³¹. Le lipide A d'*E. Coli* activant de manière efficace le système immunitaire est composé de deux groupes phosphates et de six chaînes grasses comportant 12 à 14 atomes de carbones (Figure 16)¹³².

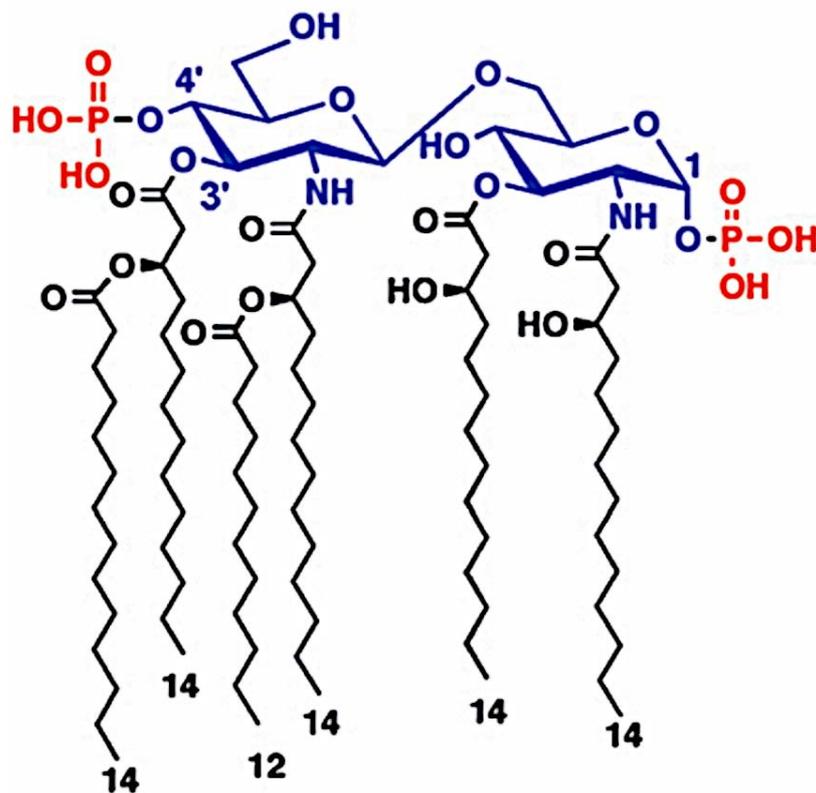


Figure 16 : Structure du lipide A de *E. Coli*. D'après Raetz, 2009¹³²

2.1.2.2 Cœur oligosaccharide

Le cœur oligosaccharide également appelé noyau est un oligosaccharide qui relie le lipide A et l'antigène O. Il est composé de deux sous-parties, le noyau interne et le noyau externe. Le noyau interne contient de manière générale des motifs L-Glycero-D-manno-heptose (Hep) et l'acide-

3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (KDO) (Figure 17). Ce dernier est un sucre à huit carbones qui est directement relié au lipide A.

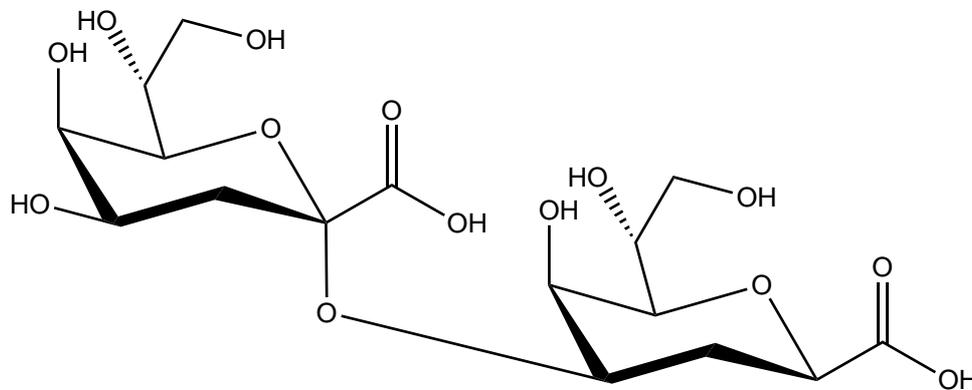


Figure 17 : Acide-3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (KDO)

Le noyau externe, connu également sous le nom de région hexose est composé principalement de motif glucose, galactose et N-acétylglucosamine (GlcNac).¹³³ Le noyau externe est relié à l'antigène O. Chez certaines souches de bactéries le noyau du LPS peut comporter des constituants non glucidiques, comme par exemples des éthanolamines ou des groupements phosphates.

2.1.2.3 L'antigène O

L'antigène O pour Kapsel¹³⁴ est un polysaccharide relié au noyau externe. Composé de sous-unités répétitives comportant entre trois et cinq sucres, l'antigène O est à l'interface entre la bactérie et l'environnement extérieur. Cette région du LPS correspond donc à la première ligne de défense contre tous types d'agents bactéricides. Une répartition des cultures bactériennes à Gram négatif a été établie dans un premier temps en fonction de leur aspect. En effet, l'allure des colonies a conduit à établir deux groupes, d'un côté les colonies lisses autrement dit « smooth » et de l'autre les rugueuses soit « rough ». Par la suite, l'antigène O a été identifié comme étant la partie du LPS responsable de ces deux textures. Cette terminologie a alors été préservée afin d'évoquer les variations de longueur de l'antigène O. Les LPS réduits à leur lipide A et au noyau oligosaccharide, ne possédant donc pas d'antigène O, présentent un aspect rugueux (R) et sont donc désigné comme R-LPS. Tandis que les LPS possédant l'antigène O sont qualifié de « smooth » donc S-LPS. Les LPS composés du lipide A, du noyau

oligosaccharide et d'une seule sous-unité d'antigène O sont nommés « Semi-Rough » soit SR-LPS¹³⁴.

2.1.3 Hétérogénéité du LPS :

Tous les agents pathogènes à Gram négatif ne produisent pas une partie lipide A pouvant activer une bonne réponse du système immunitaire. En effet, la variation du domaine lipidique A du LPS est une stratégie utilisée par les bactéries à Gram négative pour favoriser la survie en fournissant une résistance aux composants du système immunitaire inné et en aidant à échapper à la reconnaissance par TLR4. Le lipide A présente une structure complexe et son activité endotoxique est dirigée par ses divers constituants ou caractéristiques structurelles. Il a été prouvé que le lipide A hexaacycle de type E. coli (Figure 18) induit les meilleures réponses endotoxiques chez l'homme. Le schéma de phosphorylation semble influencer l'activité endotoxique, car la structure monophosphorylé est significativement moins active que la structure bisphosphorylée. En effet, la substitution d'un groupe phosphate par un groupe oxyéthyle ou l'omission volontaire d'un groupe phosphoryle engendre une réduction de l'activité endotoxique d'un facteur 10^3 . Les lipides A sous forme monosaccharide sont de loin les moins actifs de tous avec une réduction de l'endotoxicité d'un facteur 10^7 . L'altération au niveau de la région hydrophobe du lipide A a également des conséquences sur l'activité. En effet, l'addition ou l'abstraction d'une chaîne grasse donnant ainsi respectivement l'heptaacycle et le pentaacycle engendre une perte de l'activité d'un facteur 10^2 . Un lipide A analogue tétraacycle correspondant à un précurseur biosynthétique désigné lipide Iva résulte de l'abstraction de deux chaînes grasses. Celui-ci est totalement dépourvu d'activité et adopte un comportement antagoniste avec une réduction de la bioactivité d'un facteur supérieur à 10^7 . La pleine activité endotoxique est exprimée par un lipide A contenant deux résidus hexosamine, deux groupes phosphates et six chaînes grasses avec une longueur de chaîne bien définie et dans un emplacement bien distinct, ce qui correspond structurellement au lipide A d'E. coli (Figure 18). Les structures partielles privé de l'un de ces éléments, possédant des composants différents ou seulement un arrangement différent sont soit significativement moins actives soit strictement pas actives¹³⁵⁻¹³⁸.

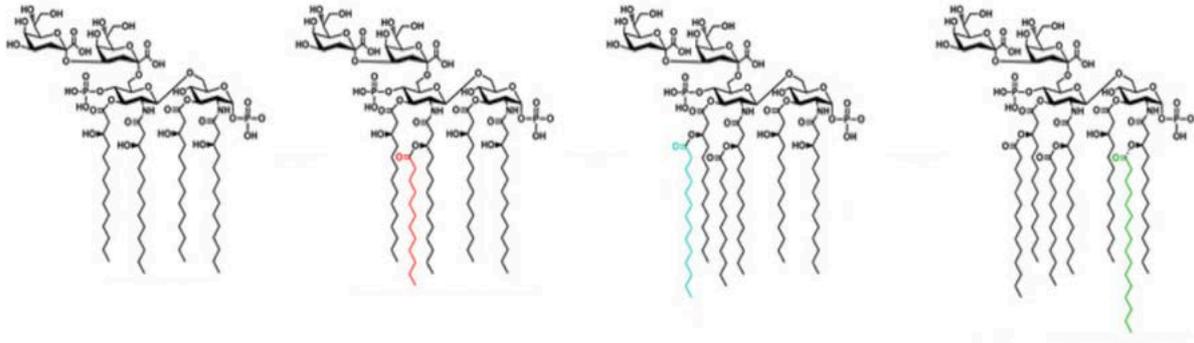


Figure 18 : Lipide A tétra, penta, hexa et heptaacylé. Adapté de Mamat, 2015¹³⁹

De manière générale, l'enveloppe des bactéries à Gram négatif est composée de trois parties principales :

- La membrane externe dont le feuillet externe a été décrit précédemment
- L'espace périplasmique et peptidoglycane
- La membrane interne

L'espace périplasmique, contenant une fine couche de peptidoglycane, est situé entre la membrane externe et la membrane interne¹⁴⁰. L'espace périplasmique peut représenter jusqu'à 40 % du volume de la cellule¹⁴¹. Il présente de nombreuses fonctions comme par exemple : l'oxydation, la sécrétion et le repliement des protéines, la sécrétion de LPS vers la membrane externe, mais également la synthèse du peptidoglycane. Ce dernier (également connu sous le nom de mureine) et la membrane externe sont liés par la lipoprotéine de Braun ou lipoprotéine de mureine (Lpp)¹⁴².

La membrane interne est une bicouche phospholipidique mais contrairement à la membrane externe, elle ne comporte pas de LPS. Dans le cas de la bactérie *E. Coli*, les phospholipides qui composent cette membrane sont la phosphatidyl éthanolamine, le phosphatidyl glycérol, la phosphatidyl sérine et la cardiolipine¹⁴³.

2.2 Les bactéries à Gram positif

La structure des bactéries à Gram positif (Figure 19) diffère de manière significative de celle des bactéries à Gram négatif. En effet, il y a entre ces deux familles de bactéries deux grandes différences à savoir l'absence de membrane externe pour les bactéries à Gram positif et la présence d'un peptidoglycane qui est bien plus épais que pour les bactéries à Gram négatif. Ces deux différences majeures, sont responsables de la diversité des molécules présentes en surface de ces deux familles de bactéries¹⁴⁴.

Les bactéries à Gram positif sont caractérisées par la présence d'acides teichoïques. Ces composés sont des polymères anioniques liés au peptidoglycane et sont très souvent les plus abondants chez les bactéries à Gram positif. Les acides teichoïques sont impliqués dans plusieurs processus tels que la division cellulaire mais également la pathogénèse^{145,146}. Plusieurs études montrent que les acides teichoïques jouent un rôle majeur dans la modulation de la sensibilité aux antibiotiques cationiques ainsi que dans la résistance aux β -lactames chez *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM)¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est une cible bien connue pour les antibiotiques tandis que les acides teichoïques impliqués dans la pathogénèse sont envisagés comme cibles pour le développement de nouveaux traitements visant à lutter contre les bactéries résistantes^{145,146}.

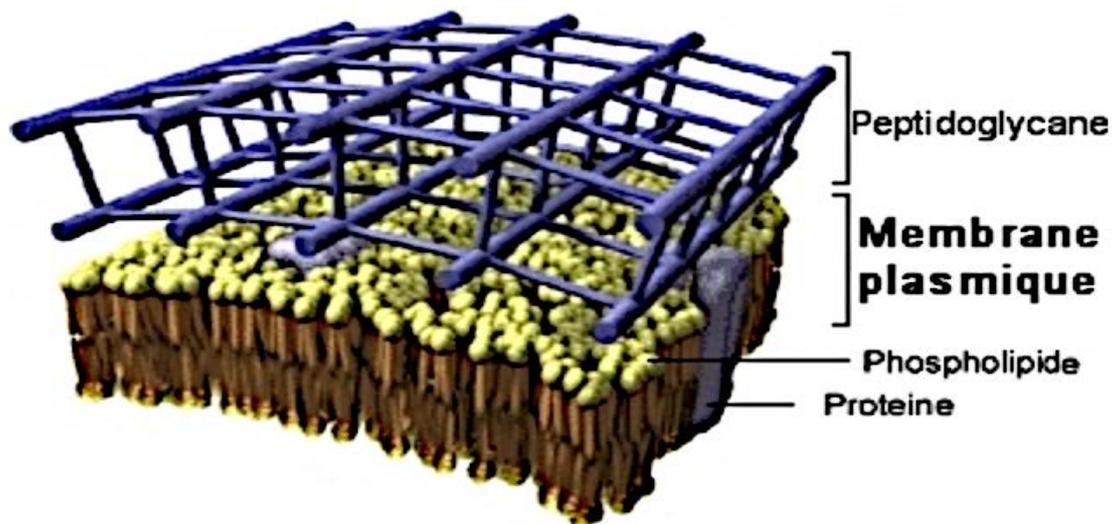


Figure 19 : Représentation schématique d'une membrane de bactérie à Gram positif. D'après Laurencin, 2008¹⁵⁰

3 Mécanisme d'action des PAM

Il apparaît que la grande majorité des PAM induisent la mort cellulaire suite à une perturbation de la membrane bactérienne. En effet, il semblerait qu'ils interagissent en premier lieu de manière sélective avec la membrane des micro-organismes¹⁵¹. Suite à cette première interaction, ils se fixent à la membrane puis pénètrent à l'intérieur de celle-ci provoquant sa déstabilisation et la libération des composants intracellulaire^{152,153}. Cependant, quelques PAM induisent la mort de la cellule en agissant sur des constituants présents à l'intérieur du cytoplasme tels que l'ADN, l'ARN ou des protéines.

3.1 Sélectivité des PAM

La membrane externe des cellules eucaryotes est composée essentiellement de phospholipides zwitterioniques telles que la phosphatidylcholine, la sphingomyéline ou encore la phosphatidyléthanolamine, conférant aux cellules eucaryotes une charge globale neutre. En revanche, les procaryotes disposent d'une membrane constituée de phospholipides hydroxylés tels que la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol ainsi que la cardiolipine, conférant donc une charge globale négative aux procaryotes. De plus, la présence d'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positive ou de lipopolysaccharides (LPS) pour les bactéries à Gram négative tous les deux chargés négativement, contribue grandement à une charge négative marquée. De charge globale positive, les PAM agissent préférentiellement sur les cellules procaryotes¹⁵⁴.

Cette action spécifique des PAM sur les cellules procaryotes a fait l'objet de plusieurs investigations et il apparaît que celle-ci est essentiellement due à la différence de composition en phospholipides des membranes des cellules eucaryotes et procaryotes^{154,155}. Néanmoins, une reconnaissance du genre ligand-récepteur a également été envisagée afin d'expliquer cette spécificité d'action des PAM^{156,157}.

3.2 Les étapes induisant la mort cellulaire

Il existe une multitude de modes d'actions des PAM et pour un même PAM plusieurs de ces modes d'actions peuvent être possible. Par conséquent, il est primordial de distinguer avec précision les divers stades permettant d'induire la mort de la cellule. En général, le mode d'action des PAM est composé de trois stades : dans un premier temps l'attraction et la fixation initiale puis dans un second temps l'insertion du peptide dans la membrane induisant sa déstabilisation et pour finir la mort cellulaire.

3.2.1 Attraction et association des PAM

Il apparait clairement que la première interaction entre les PAM et la membrane des cellules procaryotes est dû à une attraction électrostatique¹⁵⁸⁻¹⁶¹. En effet, de fortes interactions électrostatiques se produisent entre les groupes phosphates composant les bicouches lipidiques des membranes et les acides aminés chargés positivement des peptides à savoir le plus souvent l'arginine et la lysine¹⁶². Suffisamment fortes sur de grandes distances, ces interactions électrostatiques donnent ainsi lieu à un rapprochement des PAM avec la membrane bactérienne.

Concernant les bactéries à Gram négatif, les PAM se lient aux molécules de LPS présent à la surface de la membrane externe provoquant alors le déplacement des cations divalents de magnésium (Mg^{2+}) et de calcium (Ca^{2+})^{163,164}. Dans le cas des bactéries à Gram positif, les PAM se fixent aux acides lipotéichoïques présent dans le peptidoglycane¹⁶⁵.

Ces interactions électrostatiques sont suivies par des interactions hydrophobes qui se produisent entre les résidus hydrophobes composant les PAM et les chaînes lipophiles des phospholipides composant la membrane. Ces puissantes interactions hydrophobes sont aspécifiques et engendre couramment chez les PAM une cytotoxicité¹⁶⁶. Ainsi, la fixation des PAM à la membrane bactérienne est régie par l'attraction électrostatique d'une part et par l'interaction hydrophobe d'autre part.

3.2.2 Insertion des PAM et perméabilisation de la membrane

L'association des PAM avec la membrane bactérienne dépend de trois facteurs principaux, à savoir le seuil d'activité, la conformation adoptée par le peptide et l'auto-association. Le seuil d'activité est fonction de¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ :

- La concentration en peptide
- L'aptitude du peptide à adopter une structure
- La composition et la fluidité de la membrane
- La température
- Le pH

L'interaction du PAM avec la membrane peut correspondre seulement à une étape du mécanisme d'action permettant la traversée du peptide vers l'intérieur de la cellule ou la formation de pores ou conduire à la déstabilisation permanente ou transitoire de la membrane^{170,171}.

Divers modèles sont proposés dans la littérature pour expliquer le phénomène de perméabilisation membranaire. Les modèles les plus fréquemment rencontrés sont : le modèle des pores en douves de tonneaux et le modèle des pores toroïdaux. Nous parlerons également du modèle en tapis et des cibles intracellulaires^{154,172,173}.

3.2.2.1 Les modèles des pores

La liaison des PAM à la membrane s'effectue suivant deux états bien distincts, les « états S et I » correspondant à un état de surface pour « l'état S » et de formation de pores pour « l'état I ». « L'état S » représente un état de liaison fonctionnellement inactif intervenant à de faible ratio peptide/lipide. Dans cet « état S » les PAM sont adsorbées à la surface de la membrane et orientées parallèlement à celle-ci¹⁷⁴. A « l'état S », les PAM provoquent un amincissement de la membrane¹⁷⁵. La transition de « l'état S » à « l'état I » est dépendante de l'accroissement du ratio peptide/lipide. En effet, cette transition intervient lorsque la concentration en peptide est suffisamment élevée. A « l'état I », les peptides s'orientent perpendiculairement à la membrane et s'insèrent à l'intérieur de celle-ci aboutissant ainsi à la formation de pores transmembranaires¹⁷⁰.

3.2.2.1.1 Le modèle en douves de tonneaux

Dans le modèle en douves de tonneaux (« barrel-stave model »), un certain nombre de molécules de peptides vont former des canaux à l'apparence de tonneaux dans la membrane (Figure 20). Les planches du tonneau correspondent aux molécules de peptides qui sont disposées autour d'un pore aqueux¹⁵⁴. Les peptides qui agissent suivant ce mode d'action se lient à la surface de la membrane présentant une structure amphipathique. Lorsque la concentration en peptide est suffisamment élevée, les peptides sous forme monomère vont s'auto-assembler et former de grandes structures complexes permettant une insertion beaucoup plus profonde des domaines hydrophobes dans la membrane suite à une orientation perpendiculaire des structures peptidiques par rapport à la bicouche phospholipidique^{154,176}. Cette internalisation va engendrer la formation de pores en forme de tonneau dont la face externe hydrophobe est orientée vers la partie hydrophobe de la membrane et la face interne hydrophile en direction du pore aqueux^{170,176,177}.

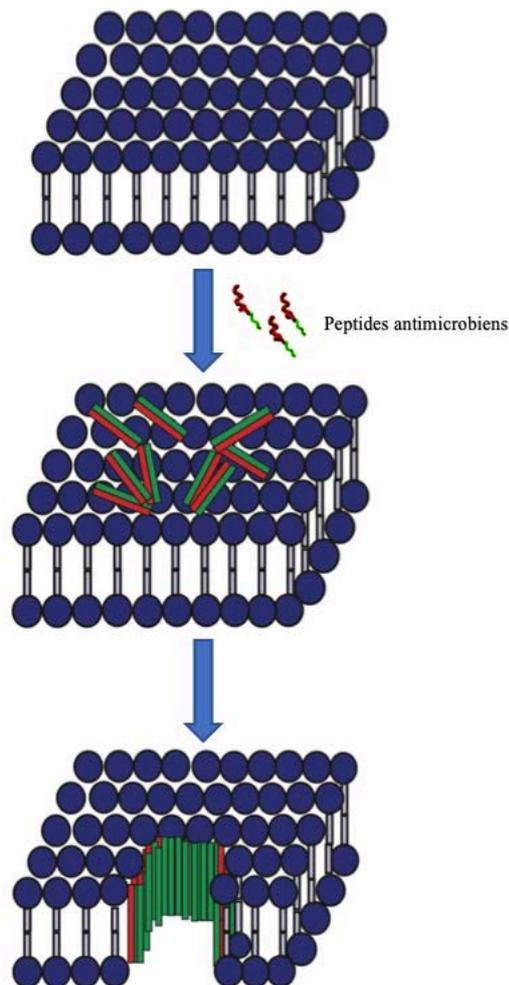


Figure 20 : Représentation du modèle des pores en douves de tonneaux. Adapté de Pushpanathan, 2013¹⁷³

La formation des pores est régie par les interactions hydrophobes nécessitant un nombre minimal de résidus afin de traverser la membrane. En effet, afin de perforer la bicouche phospholipidique, 22 résidus sont nécessaires pour les peptides adoptant une structure en hélice α , alors que 8 acides aminés suffisent pour les peptides ayant une structure en feuillets β ¹⁷². La pardaxine¹⁷⁸, l'alaméthicine^{175,179,180} et la dermcidine¹⁸¹ sont des PAM hélicoïdaux utilisant le mécanisme d'action correspondant au modèle des pores en douves de tonneaux.

3.2.2.1.2 Le modèle des pores toroïdaux

Le modèle des pores toroïdaux (« wormhole model ») présente un mécanisme ressemblant à celui du modèle en douve de tonneau. Cependant dans le cas du modèle des pores toroïdaux, les lipides de la bicouche s'intercalent avec les structures peptidiques dans le canal transmembranaire et font donc partie intégrante du pore (Figure 21)¹⁵⁴. Dans la première étape de ce modèle, les peptides se lient à la membrane avec une orientation parallèle à la bicouche phospholipidique¹⁸². Ils se lient avec leurs domaines hydrophobes ce qui induit un déplacement des têtes polaires des phospholipides provoquant de ce fait une courbure de la membrane. Lorsque la concentration seuil est atteinte, les peptides vont s'auto-assembler puis s'orienter perpendiculairement à la membrane et s'insérer à l'intérieur de celle-ci aboutissant ainsi à la formation des pores toroïdaux¹⁷⁶. L'intérieur du pore est alors constitué du domaine polaire des structures peptidiques et des têtes polaires des phospholipides^{48,154,183}. La différence de ce modèle par rapport au modèle des pores en douves de tonneaux c'est que les peptides sont en permanence liés aux têtes hydrophiles des phospholipides¹⁸³. La charge peptidique diminue la stabilité des pores toroïdaux en raison de la répulsion électrostatique. Les demi-vies des pores toroïdaux diminuent avec l'augmentation du nombre de résidus chargés positivement^{154,166,176}. La magainine 2¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ ainsi que la mélittine^{183,187} sont deux PAM formant des pores toroïdaux.

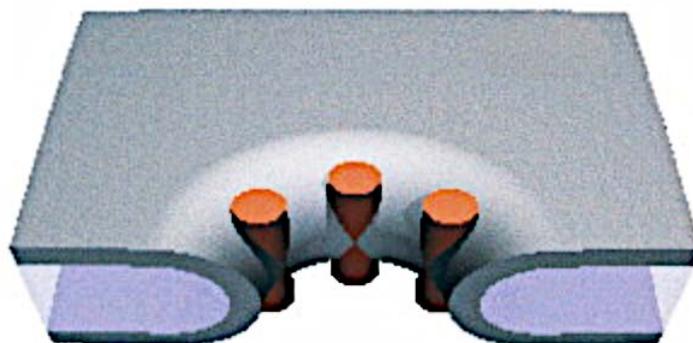


Figure 21 : Représentation schématique d'un pore toroïdal. D'après Yang, 2001¹⁸³

3.2.2.2 Le modèle en tapis

Le modèle en tapis (« carpet-like model ») a été suggéré initialement pour décrire le mécanisme d'action de la dermaseptine S¹⁸⁸ et a ensuite été envisagé pour expliquer le mode d'action de la cécropine P1¹⁸⁹. Ce modèle est basé sur une disposition rigoureusement parallèle des peptides par rapport à la membrane³⁴. En effet, les PAM agissant suivant ce modèle vont commencer par se déposer parallèlement à la bicouche phospholipidique en disposant leurs acides aminés hydrophobes en direction des chaînes lipidiques de la membrane et leurs acides aminés hydrophiles au contact des têtes polaires des phospholipides (Figure 22)¹⁹⁰. Les peptides s'enfouissent partiellement dans la membrane et ne sont pas en contact avec le cœur hydrophobe de la bicouche. Après un accroissement considérable de la concentration en peptides (concentration seuil), la membrane est recouverte d'amas peptidiques à l'apparence d'un tapis provoquant des perturbations de l'agencement des phospholipides^{176,189,191-193}. Cette altération engendre des perforations de la membrane qui induisent la libération des métabolites du cytoplasme puis une rupture complète de la membrane^{34,154}.

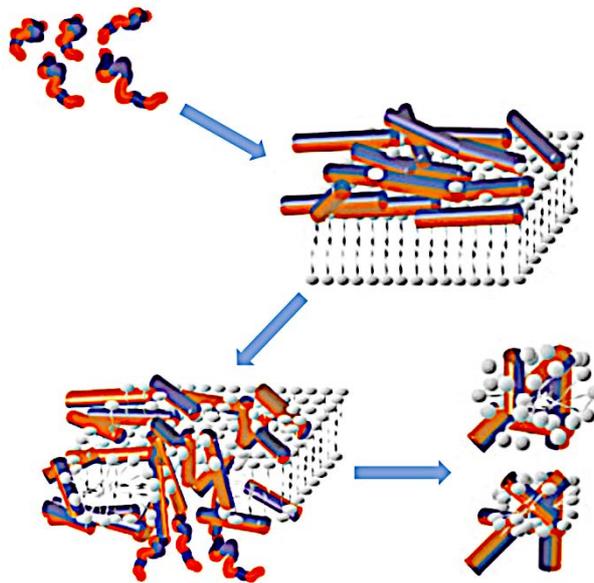


Figure 22 : Représentation du modèle en tapis. Orange : hydrophobe – bleu : hydrophile. Adapté de Shai, 2002¹⁷²

Le Tableau 1 récapitule les trois modes d'action principaux détaillés précédemment ainsi que quelques exemples de PAM qui y sont associés :

Mode d'action	Exemples de PAM
Modèle des pores en douves de tonneaux	Alaméthicine
Modèle des pores toroïdaux	Magainine 2 - Mèlittine - Protegrine 1 - MSI-78 - LL-37
Modèle en tapis	Dermaseptine S - Cécropine - Ovispirine - Caerine 1.1 - Mèlittine

Tableau 1 : Modèles principaux de perméabilisation membranaire et exemples de PAM qui y sont associés¹⁷⁰

3.2.2.3 Cible intracellulaire

La perméabilisation transitoire ou partielle de la membrane peut permettre le passage du PAM à l'intérieur de la cellule et provoquer de multiples effets tels que^{154,194,195} :

- Des perturbations de la respiration cellulaire
- L'arrêt de la synthèse des biopolymères
- Les ruptures de la membrane

En effet, il a été constaté dans plusieurs cas de figure que ce phénomène n'est pas nécessairement à l'origine de la mort cellulaire¹⁹⁶. Certains peptides présentent une concentration bactéricide bien plus faible que la concentration nécessaire pour induire la perméabilisation complète de la membrane¹⁹⁷. Par conséquent, d'autres mécanismes d'actions impliquant des cibles intracellulaires ont été décrits.

Par exemple, la buforine II, un PAM isolée du crapaud asiatique *Bufo bufo garagrizans* présente un mécanisme d'action impliquant une fixation intracellulaire à la suite d'une insertion rapide à l'intérieur du cytoplasme¹⁹⁸. Dans le cas de la bactérie *E. Coli*, la buforine II inhibe les fonctions de la cellule en se liant à l'ADN et à l'ARN provoquant ainsi en très peu de temps la mort de la cellule^{197,199}.

De nombreux PAM provoquent la mort de la cellule par inhibition de l'activité enzymatique. C'est notamment le cas de la drosocine, la pyrrohocicine, l'apidaécine ainsi que l'histatine-

5^{171,200,201}. Le Tableau 2 présente quelques exemples de cibles intracellulaires et des exemples de PAM qui y sont associés. Bien évidemment cette liste n'est pas exhaustive.

Modes d'action intracellulaire	Exemples de PAM
Altération de la membrane cytoplasmique	PR-39 ; PR-26 ; Indolicidine ; Microcine 25
Inhibition de l'activité enzymatique	Drosocine ; Pyrrhocoricine ; Apidaécine ; Histatine
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Pleurocidine ; Dermaseptine ; PR-39 ; HNP-1 ; HNP-2 ; Indolicidine
Inhibition de la synthèse protéique	Pleurocidine ; Dermaseptine ; PR-39 ; HNP-1 ; HNP-2 ; Indolicidine
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Mersacidine

Tableau 2 : Exemples de modes d'action intracellulaire et exemples de PAM qui y sont associés¹⁷⁰

4 Modèles membranaires et études structurales des PAM par RMN

Les petits PAM sont souvent déstructurés en solution aqueuse. Ils acquièrent une structure bien définie seulement lorsqu'ils sont au contact de la membrane bactérienne ou d'un milieu mimant les membranes. Aussi, la membrane constitue la cible d'interaction principale pour une grande majorité de PAM. Néanmoins, l'utilisation de membrane authentique est relativement complexe en première approche. Il convient donc d'utiliser dans un premier temps un modèle membranaire plus élémentaire. Classiquement, l'étude structurale des PAM en RMN est réalisée en utilisant des solvants organiques, des micelles de détergents, des bicelles, des liposomes ainsi que des plus gros objets telles que le LPS permettant de former facilement des micelles de haut poids moléculaire en solution²⁰²⁻²⁰⁴. Des études structurales de PAM ont été réalisées dans des solvants organiques comme par exemple le trifluoroéthanol (TFE)^{205,206} ou encore le méthanol²⁰⁷. Bien qu'il soit reconnu que l'utilisation de solvants organiques représentent le modèle le plus simpliste, celui-ci n'imité pas suffisamment la membrane²⁰⁸. Ainsi, d'autres modèles peuvent être employés pour un mime de membrane plus précis.

4.1 Micelles de détergent

Classiquement utilisés en RMN du liquide pour la détermination structurale de peptide, les micelles anioniques de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS)²⁰⁹ et les micelles zwitterioniques de dodécylphosphocholine (DPC)²¹⁰ constituent un meilleur mime de membrane que les solvants organiques^{209,211}. Lors du processus de formation des micelles, qui se produit à partir d'une certaine concentration appelé concentration micellaire critique (CMC), les molécules amphiphiles de détergents se réorganisent en milieu aqueux de manière à minimiser le contact entre leurs chaînes alkyles et les molécules d'eau (Figure 23)²¹². Le peptide infiltré à l'intérieur de la micelle est en contact avec le cœur hydrophobe de celle-ci^{205,213}. Ce type de modèle membranaire est considérablement exploité depuis de nombreuses années pour la caractérisation des structures des peptides par RMN en solution^{214,215}. Du fait de la petite taille des micelles, les temps de corrélation des objets micellaires sont relativement courts permettant d'obtenir des spectres d'excellente qualité. Cependant, ce modèle membranaire ne permet pas d'obtenir un rigoureux mime de membrane²¹⁵. En effet, les micelles sont composées de

molécules de détergent tandis que les membranes sont composées de lipides²¹⁶. Ainsi, la structure déterminée pour un même peptide peut être différente selon que l'étude structurale soit réalisée en micelle de détergent ou en présence de bicouche lipidique^{217,218}. Par conséquent, le choix du modèle membranaire est d'une importance capitale pour la détermination structurale de peptide.

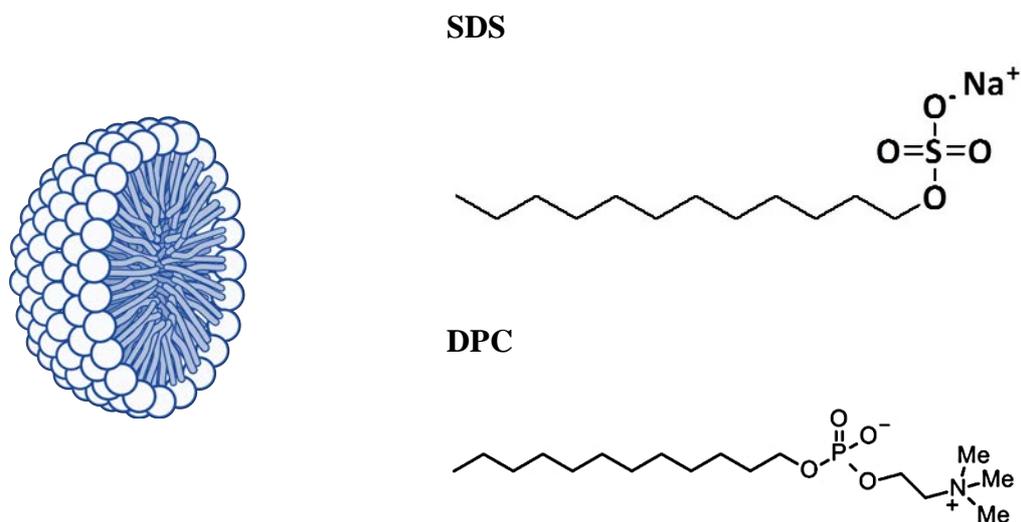


Figure 23 : Représentation schématique d'une micelle de détergent et structures chimiques du SDS et du DPC

Pour mimer au mieux les membranes, des modèles composés de lipides ont été introduits. C'est notamment le cas des bicelles.

4.2 Bicelles

Utilisées depuis les années 1990²¹⁹, les bicelles permettent une meilleure imitation de la membrane que le modèle micellaire²¹⁹⁻²²¹. A l'origine, les bicelles étaient composées d'un mélange de détergents et de phospholipides formant des assemblages discoïdaux. Il est possible d'utiliser des phospholipides avec des chaînes alkyles courtes en tant que détergent afin de disposer de bicelles intégralement composé de phospholipides²²². Ainsi les bicelles sont composées de phospholipides avec de longues chaînes alkyles de 12 à 18 carbones tels que le dimiristoylphosphatidylcholine (DMPC) et de phospholipides avec des chaînes alkyles courtes de 6 à 8 carbones tels que le dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC)²²³ (Figure 24). Les phospholipides à chaîne courte protègent la partie hydrophobe de la bicouche lipidique formée par les phospholipides à chaîne longue²²⁴.

L'association DMPC/DHPC est la plus courante pour la formulation de bicelle²²⁵. La taille et la morphologie des bicelles sont caractérisées par le rapport q correspondant au rapport des concentrations molaires des lipides à longue chaîne sur les lipides à chaîne courte²²⁶. La température²²⁷, le pH²²⁸ ainsi que la force ionique²²⁹ peuvent également avoir une influence sur les bicelles. Pour être adapté à la RMN en solution, le rapport q doit être compris entre 0,1 et 1,0 afin que les bicelles soient isotropes²²⁴.

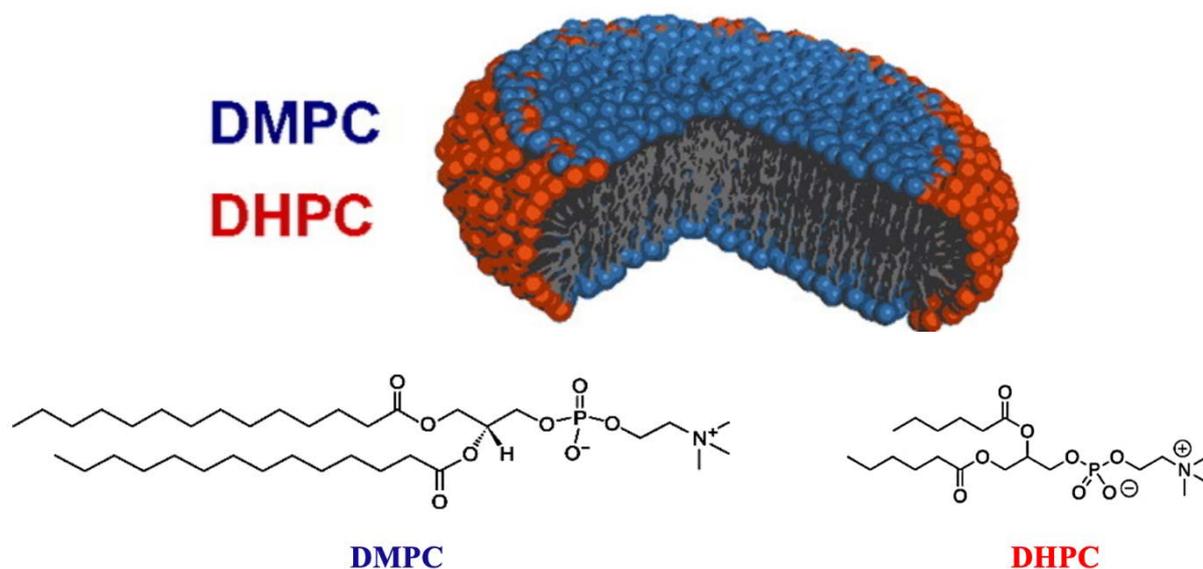


Figure 24 : Représentation schématique d'une bicelle DMPC/DHPC avec un rapport $q = 0,5$. D'après Björnerås, 2015²²¹. Structure chimique du DMPC et du DHPC

De nombreuses modifications peuvent être appliquées aux bicelles telles que l'ajout d'ions lanthanides (Er^{3+} , Tm^{3+} , Eu^{3+} , Yb^{3+}) permettant d'orienter les bicelles suivant l'axe du champ magnétique B_0 (Figure 25)²³⁰. Une autre voie de contrôle de l'orientation des bicelles est d'utiliser des lipides dont au moins une chaîne alkyle dispose d'un groupement biphenyle²³¹.

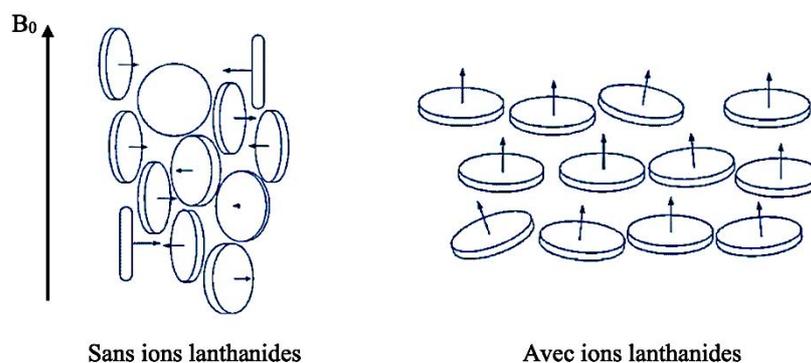


Figure 25 : Représentation schématique de l'orientation des bicelles sans et avec des ions lanthanides. Adapté de Prosser, 1998²³⁰

Il est également possible d'exploiter les bicelles pour des études en RMN du solide^{232,233}. La présence exclusivement de phospholipides à chaîne longue, c'est-à-dire sans ajout de détergent, ou de phospholipides à chaîne courte conduit à la formation de liposomes.

4.3 Liposomes

Initialement introduit en 1965 par Alec Douglas Bangham²³⁴, les liposomes présentent une forme sphérique et sont généralement composés uniquement de phospholipides²³⁵. Ce sont des termes grecques « lipos » et « sóma » signifiant graisse et corps, respectivement, que provient leur appellation liposome²³⁶. Pouvant comporter une seule ou plusieurs bicouches lipidiques et présentant des diamètres qui oscillent entre 30 nm et 5 μm , les liposomes sont considérés comme étant de meilleures mimes membranaires (Figure 26). La possibilité d'incorporer différents lipides représente l'un des avantages majeurs de leur utilisation²³⁷. Ils peuvent être divisés en fonction de deux paramètres à savoir le nombre de bicouche lipidique et le diamètre^{238,239}.

Il existe 5 familles de liposomes²⁴⁰ :

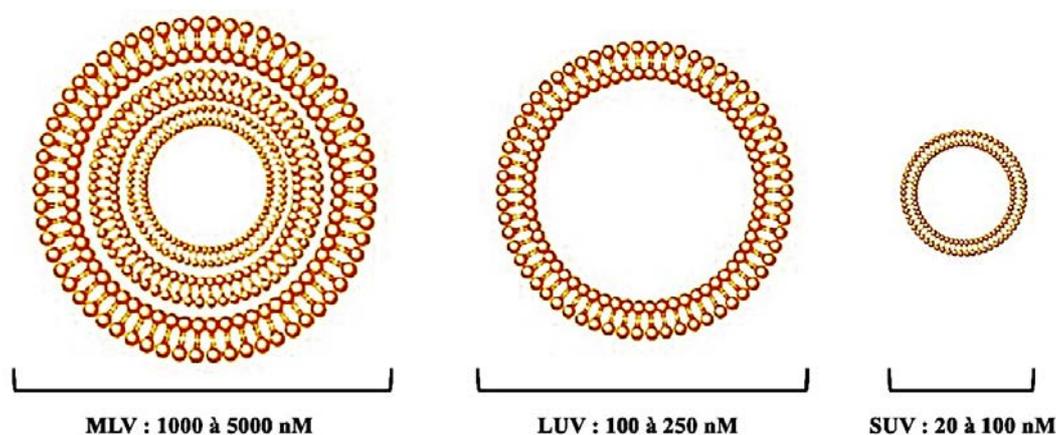
- ⇒ Multilamellar Vesicles (MLV)
- ⇒ Large Unilamellar Vesicles (LUV)
- ⇒ Small Unilamellar Vesicles (SUV)
- ⇒ Giant Unilamellar Vesicles (GUV)
- ⇒ Oligolamellar Vesicles (OLV)

Les MLV, les LUV et les SUV, représentent les classes de liposomes les plus fréquemment rencontrés et vont donc être brièvement présentés (Figure 26).

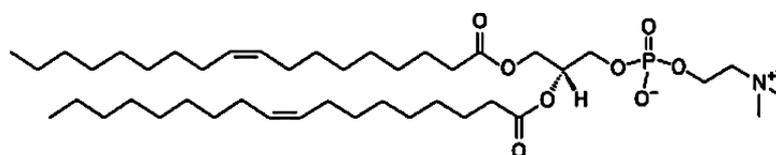
MLV : Les liposomes de cette famille sont composés de multiples bicouches lipidiques. Leurs tailles sont comprises entre 1 μm et 5 μm de diamètre. De trop grande taille pour être utilisé en RMN du liquide, ces liposomes sont exploités en RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning) et en RMN du solide. Des indications sur la dynamique, la disposition et la structure des peptides, en interaction avec les lipides des MLV peuvent être obtenue^{241,242}.

LUV : Ce sont des liposomes unilamellaires c'est-à-dire qu'ils sont constitués d'une unique bicouche phospholipidique. Leur diamètre varie entre 100 et 250 nm. Ils sont rarement utilisés en RMN du liquide du fait de leur grande taille, néanmoins des spectres RMN ^1H avec une bonne résolution ont pu être obtenus pour un peptide de quatre acides aminés en interaction avec des LUV²⁴³. A priori, une telle résolution correspond à une dynamique d'interaction rapide.

SUV : Tous comme les LUV, les SUV sont des liposomes unilamellaires. Ce sont les liposomes les plus petits avec un diamètre de l'ordre de 50 nm. Cependant, ils sont considérés comme étant encore trop grand pour obtenir des spectres de bonne qualité et sont donc relativement peu utilisés pour des applications en RMN du liquide²³⁷. Néanmoins, s'il y a une dynamique d'interaction suffisamment grande entre la molécule d'intérêt et les SUV, il est possible d'obtenir de nombreuses informations comme par exemple la structure tridimensionnelle de la molécule étudiée^{244,245}. Les SUV ont été largement utilisés au cours de cette thèse.



DOPC : 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine



DOPS : 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-L-Serine

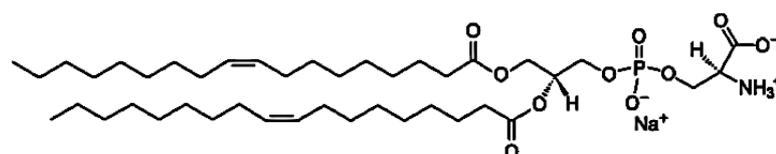


Figure 26 : Représentations schématiques des MLV, LUV, SUV. Adapté de Pandey, 2016²⁴⁶. Exemples de lipides pouvant être utilisés

Plusieurs types de modèles membranaires peuvent être utilisés pour des études structurales en RMN en solution. Bien qu'aujourd'hui encore les modèles les plus élémentaires telles que les solvants organiques et les micelles soient très fréquemment utilisés, ils ne permettent pas de mimer suffisamment les membranes. Les bicelles sont considérées comme des meilleures mimes que le modèle micellaire cependant elles sont également composées d'une partie détergente. Il existe de nombreux autres modèles membranaires, néanmoins, les liposomes représentent le modèle le plus semblable à la membrane (Figure 27) permettant ainsi une meilleure caractérisation des peptides antimicrobiens.

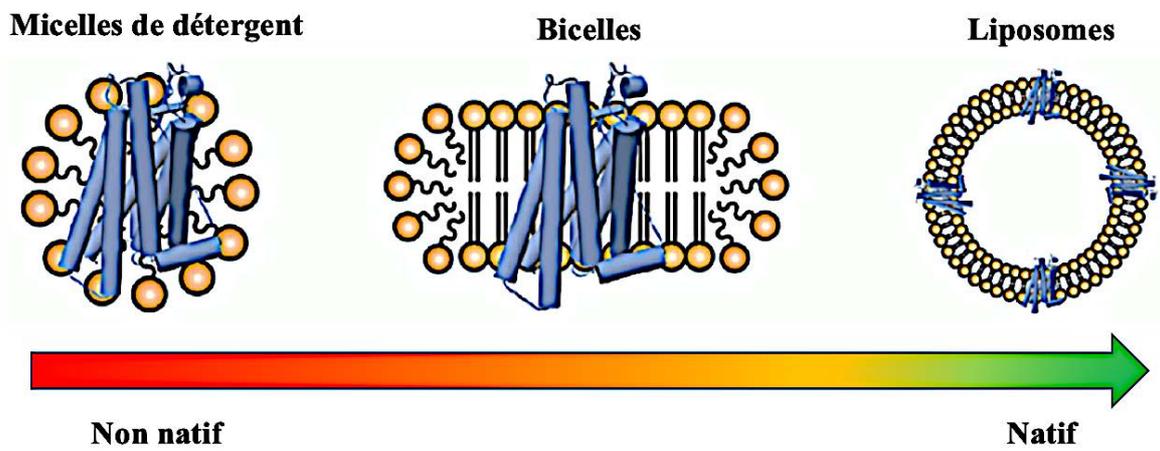


Figure 27 : Classements de quelques modèles mimant la membrane pour des études en RMN. Adapté de Klöpfer, 2019²¹⁵

L'utilisation de modèle membranaire pour des investigations en RMN du liquide de PAM requiert quelques exigences notamment une dynamique convenable. En effet, pour obtenir des spectres exploitables avec une résolution suffisante, il est primordial que le temps de corrélation du peptide reste relativement court et que les temps de relaxation T_2 soient assez longs. Le modèle membranaire choisi doit permettre de mimer au maximum le comportement du peptide en interaction avec une membrane native et ne doit pas engendrer une quelconque altération de la structure du peptide. Le Tableau 3 récapitule les mimes membranaires généralement utilisés en RMN du liquide avec certains d'entre eux qui peuvent également être utilisés en RMN du solide.

Modèle membranaire	Molécules utilisées	Utilisation RMN
Micelles	Molécules amphiphiles ioniques ou zwitterioniques telles que le SDS ou le DPC	RMN du liquide
Bicelles	Le plus souvent le DMPC comme lipide à chaîne longue et un lipide à chaîne courte comme le DHPC ou un détergent	RMN du liquide RMN du solide
Liposomes	Généralement uniquement des phospholipides	RMN du liquide RMN du solide

Tableau 3 : Modèles membranaires utilisé pour les études structurales des PAM en RMN du liquide

5 Les expériences RMN de transfert d'aimantation

La RMN est souvent utilisée pour caractériser des interactions entre un ligand et un récepteur de haut poids moléculaire, telles que des protéines, des membranes, ou des assemblages permettant ainsi d'identifier des molécules pourvues d'activités biologiques. Les expériences de transfert d'aimantation impliquent un excès de ligand et nécessitent une cinétique d'interaction ligand-récepteur qui doit être suffisamment rapide. La détection étant basée sur le ligand, il n'y a aucune restriction concernant le poids moléculaire du récepteur à étudier.

5.1 Le Tr-NOESY

Initialement, la méthode du NOE transféré a été introduite par Bothner-By^{247,248} puis a été développée par Clore²⁴⁹⁻²⁵¹. Amplement utilisée, la méthode du NOE transféré permet la détermination structurale d'un ligand lié à une macromolécule. Les molécules de poids moléculaire faible à intermédiaire présentent des temps de corrélation (τ_c) qui sont courts. Par conséquent, ces molécules ne présentent aucun NOE ou alors seulement des petits NOE positifs. En revanche, les molécules de poids moléculaire élevé telles que des protéines ou des assemblages macromoléculaires présentent des temps de corrélation qui sont long et vont donc donner des NOE intenses négatifs (Figure 28).

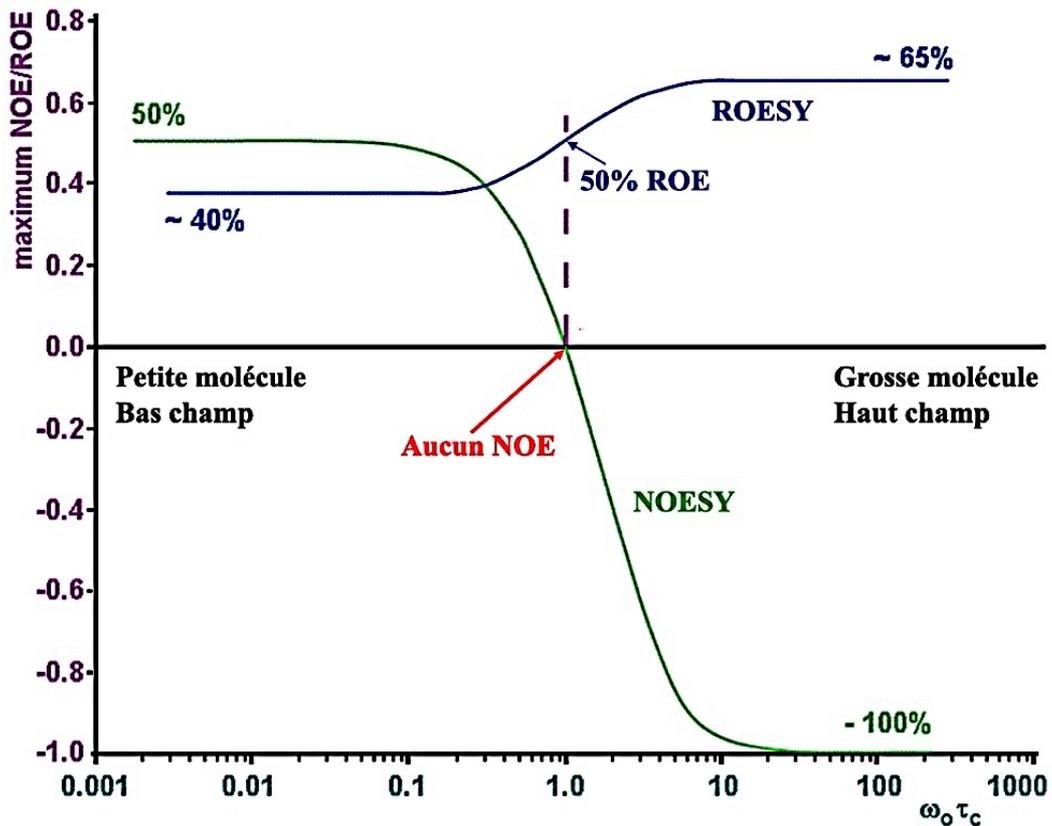


Figure 28 : Intensité NOE/ROE en fonction du champ du spectromètre et de la taille de la molécule pour les expériences ROESY et NOESY. Adapté de Otter, 1988²⁵²

L'observation de NOE transféré est régie par la présence de temps de corrélation différent du ligand entre sa forme libre et sa forme complexée. Lorsqu'il y a interaction, le ligand va s'associer à la macromolécule et va ainsi acquérir les propriétés de mouvement de celle-ci durant toute la durée de son association (Figure 29). Par conséquent, le ligand dans sa forme complexée va présenter des temps de corrélation qui sont longs. Lorsqu'il va se dissocier, il va garder en mémoire les NOE générés pendant qu'il était lié et des NOE intenses négatifs seront détectés qui reflèteront la structure du ligand sous forme complexée.^{253,254}

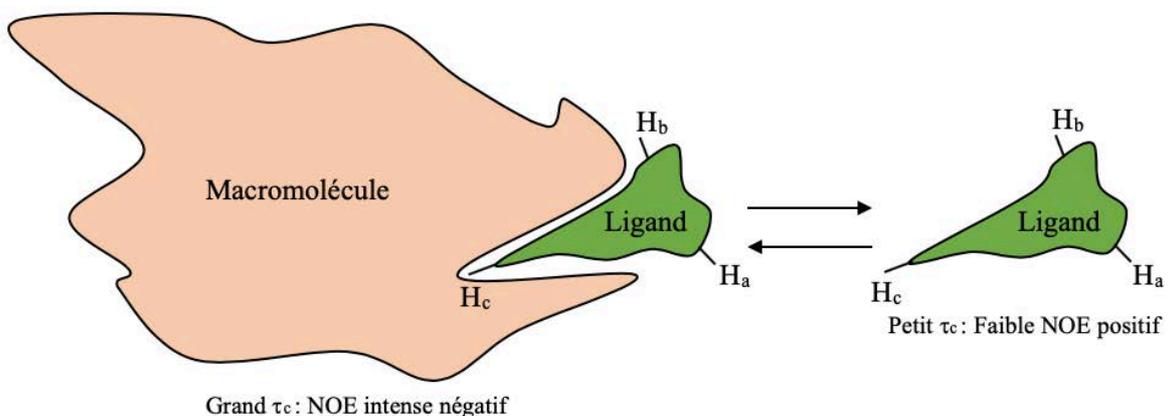


Figure 29 : Ligand de faible poids moléculaire en interaction avec une macromolécule

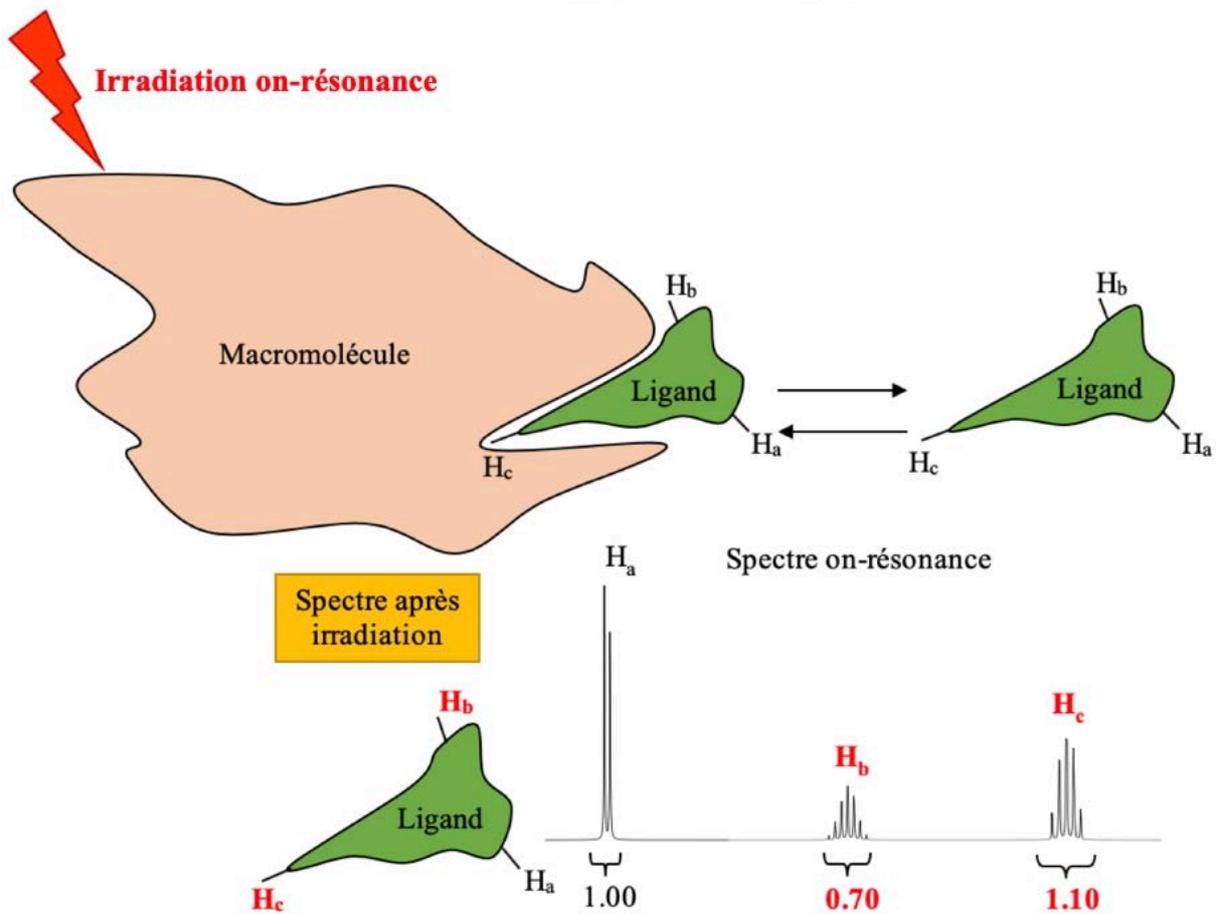
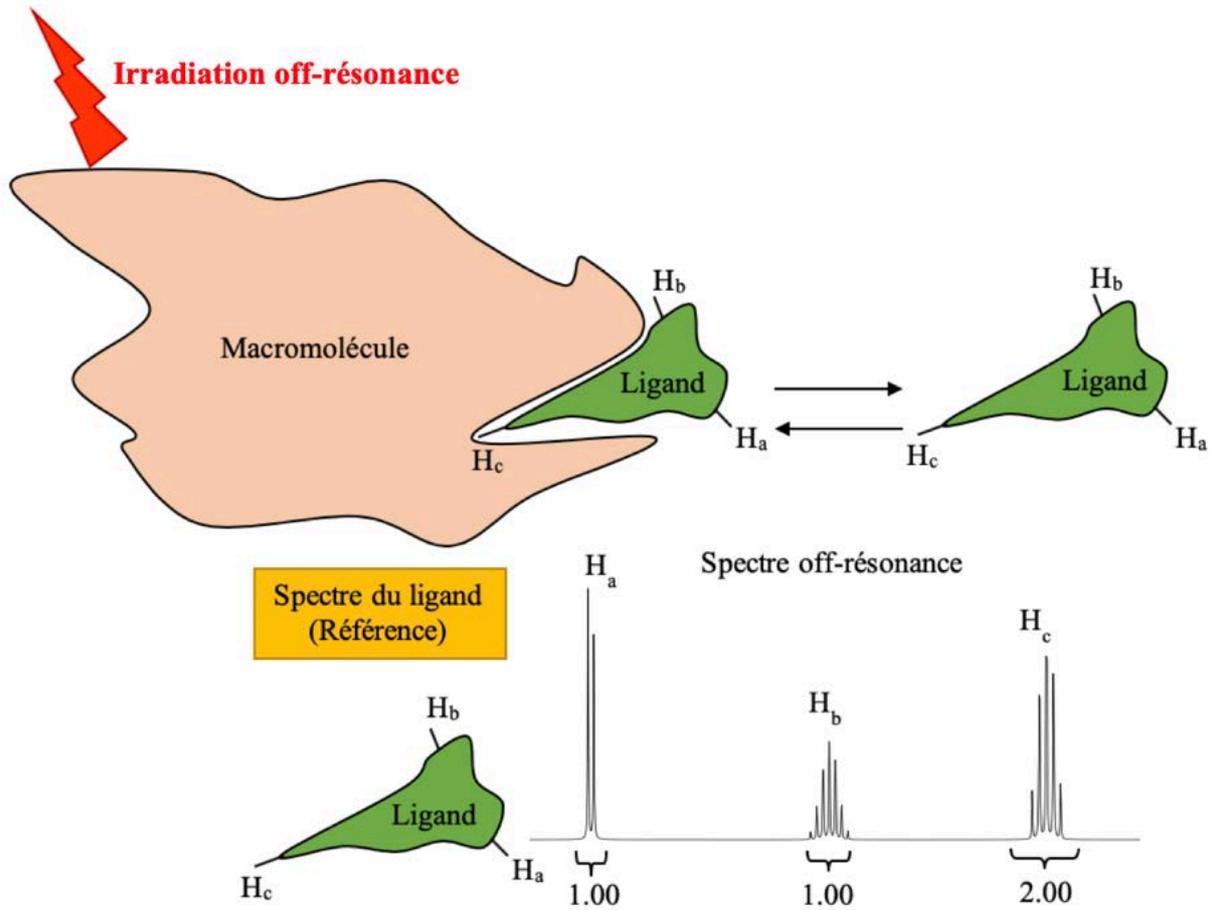
Les expériences de tr-NOESY et NOESY ne présentent pas de différence dans la configuration de l'expérience mais uniquement dans la préparation d'échantillon. Cependant, un ratio ligand-macromolécule excessivement élevé entraînera un grand nombre de ligand libre pouvant engendrer la présence de NOE transféré plus faible en raison d'une quantité de ligand lié insuffisante. Par conséquent, le ratio entre la forme libre et la forme lié du ligand est d'une très grande importance^{254,255}.

5.2 La STD

Les fondements de l'expérience STD (Saturation Transfer Difference) sont définis dans sa dénomination. En effet, cette expérience comporte un transfert de saturation et une différence, nécessitant donc l'enregistrement de deux spectres RMN.

Le premier spectre enregistré est un spectre off-résonance constituant une expérience de référence qui est réalisée avec une irradiation sélective décalée en un endroit très éloigné des résonances du ligand et du récepteur. Le spectre off-résonance doit impérativement être identique à celui obtenu pour une expérience RMN standard ^1H à une dimension du ligand, réalisée sur le même échantillon. C'est pour cette raison que ce spectre est souvent considéré comme une expérience témoin supplémentaire^{256,257}. Le second spectre enregistré est un spectre on-résonance, dans lequel, une irradiation sélective assez longue (~2 s) est appliquée sur une seule région spectrale, ne contenant que des résonances associées au récepteur (région aromatique ou aliphatique) afin de ne pas irradier le ligand. Par le biais du phénomène de diffusion de spin, le récepteur transfère la saturation à travers son vaste réseau de protons incluant les protons des sites de liaison. Par conséquent, lorsque le ligand se lie au récepteur, une partie de la saturation lui est transférée. Ainsi, si la cinétique d'interaction ligand-récepteur est favorable et que le ligand se dissocie au cours de la période de saturation, un nombre considérable de ligands interagiront avec le récepteur donnant lieu à un nombre élevé de ligands saturés. Ce transfert de saturation engendre une atténuation de certains signaux du ligand, qui est accentué en fonction de la proximité de ses protons avec ceux du récepteur, permettant donc de déterminer son site de fixation^{256,257}.

Le spectre STD correspond à la soustraction du spectre off-résonance et on-résonance (Figure 30). Ce spectre ne contient que les signaux des protons à proximité du récepteur^{254,256,257}.



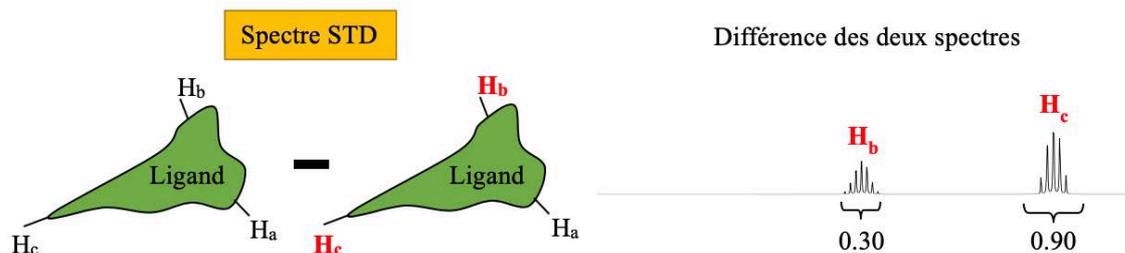


Figure 30 : Représentation schématique du principe de l'expérience STD. Adapté de Cabezas, 2015²⁵⁸

5.3 Le Water-LOGSY

L'expérience Water-LOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy) exploite les molécules d'eau se liant à l'interface ligand-récepteur. Elle comporte une irradiation qui est exécutée au niveau de la fréquence à laquelle résonne l'eau (Figure 31). Il y a alors un transfert d'aimantation qui s'effectue des molécules d'eau présentes dans le site vers le ligand. Ainsi, sur le même principe que la méthode du NOE transféré, le ligand lié au récepteur présente un temps de corrélation élevé, par conséquent, des signaux négatifs sont détectés. En revanche, si le ligand ne se lie pas au récepteur et interagit donc seulement avec les molécules d'eau libre, le temps de corrélation est petit, et les signaux détectés sont alors positifs²⁵⁹⁻²⁶¹.

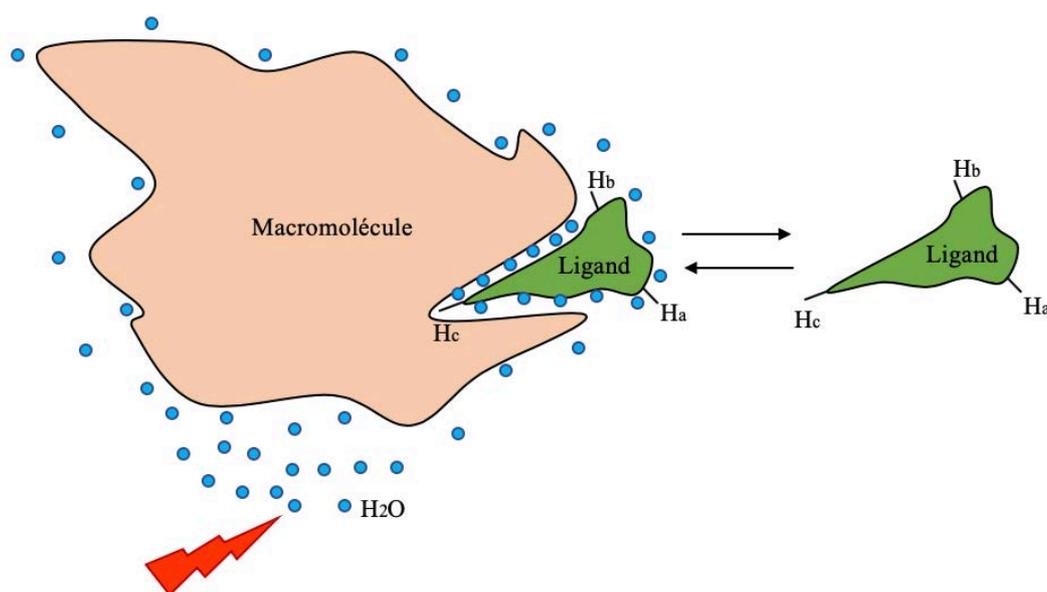


Figure 31 : Illustration du principe de l'expérience Water-LOGSY

Chapitre I - Étude structurale d'un cyclolipopeptide naturel

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Florie Desriac, Abderrafek El Harras, Matthieu Simon, Arnaud Bondon, Benjamin Brillet, Patrick Le Chevalier, Martine Pugnère, Patrice Got, Delphine Destoumieux-Garzon, Yannick Fleury. Alterins Produced by Oyster-Associated Pseudoalteromonas Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (12). <https://doi.org/10.3390/md18120630>.

1 Introduction

L'aquaculture est le terme permettant de désigner l'ensemble des activités de production d'animaux ou de végétaux en milieu aquatique. De ce fait, elle implique la pisciculture, l'ostréiculture, la conchyliculture, la pénéculture, l'astaciculture ainsi que l'algoculture. Elle est pratiquée dans les étangs, les rivières mais également en bordure de mer. L'aquaculture s'est développée initialement en Chine il y a plus de 2000 ans et connaît ces dernières années une croissance rapide²⁶². De nos jours, c'est approximativement 580 espèces qui sont élevées à travers le monde.

D'après le rapport 2020 de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO : Food and Agriculture Organization), la production mondiale d'animaux aquatiques pour 2018 était estimée à 179 millions de tonnes ce qui équivaut à 401 milliards de dollars américains. 82 millions de tonnes d'animaux aquatiques étaient originaires de l'aquaculture soit un total de 250 milliards de dollars américains (Figure 32). La production aquacole dans le monde correspondait donc à 46% de la totalité de la production en 2018 et 52% de la production destinée à la consommation humaine était issue de l'aquaculture²⁶³.

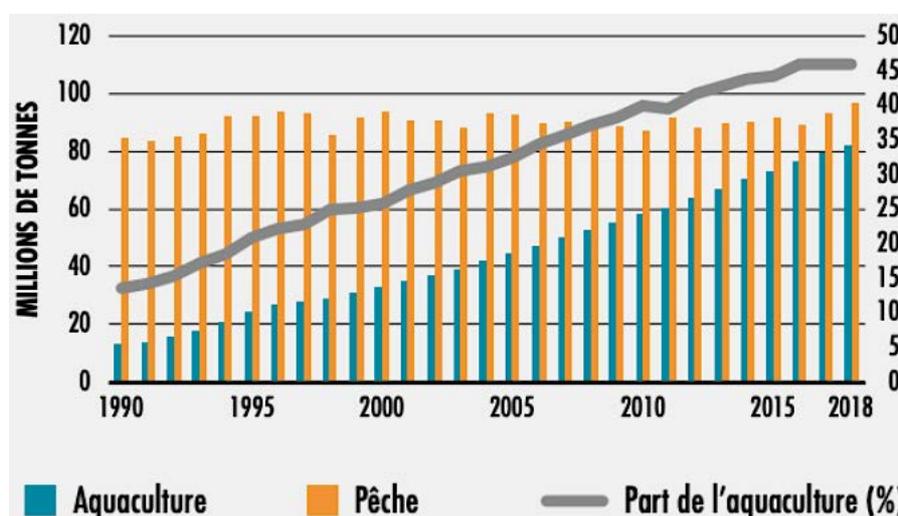


Figure 32 : Production dans le monde d'animaux aquatiques provenant de la pêche et de l'aquaculture de 1990 à 2018. D'après FAO, 2020²⁶³

Depuis 1990, la pêche de poissons sauvages est relativement constante, tandis que l'aquaculture connaît un grand essor. A terme, il est fort probable que la principale source de poisson soit issue de la production aquacole.

Cependant, la hausse des températures ainsi que les conditions de production intensive réunissant un nombre considérable d'animaux provoquent un stress élevé pour les animaux favorisant ainsi l'apparition et le développement de plusieurs pathologies²⁶⁴. Ces dernières engendrent d'importante diminution du taux de production impliquant des pertes économiques conséquentes²⁶⁵. En milieu aquatique, ce sont les bactéries affiliées au genre *Vibrio* qui sont prédominantes^{266,267}.

1.1 Les bactéries du genre *Vibrio*

Le genre *Vibrio* fait partie de la famille des *Vibrionaceae* et il est associé à la classe des γ -protéobactéries²⁶⁸. Les *Vibrio* sont tous issus de milieu aquatique. En effet, ils proviennent de milieux marins, estuariens et également d'eau douce²⁶⁹. Dès 1854, Pacini étudiait le *Vibrio cholerae*, aujourd'hui connu comme étant le *Vibrio* responsable du choléra²⁶⁸. Cependant, ce n'est qu'en 1965 que Véron a introduit la famille des *Vibrionacea*²⁷⁰. Petits bacilles à Gram négatif, les *Vibrio* sont en forme de bâtonnet droits ou incurvés et présentent une longueur allant de 1,4 à 2,6 μm pour un diamètre se situant entre 0,5 et 0,8 μm . Ils peuvent posséder un ou plusieurs flagelles et c'est seulement le flagelle polaire qui leur confèrent une extrême mobilité (Figure 33)^{271,272}.

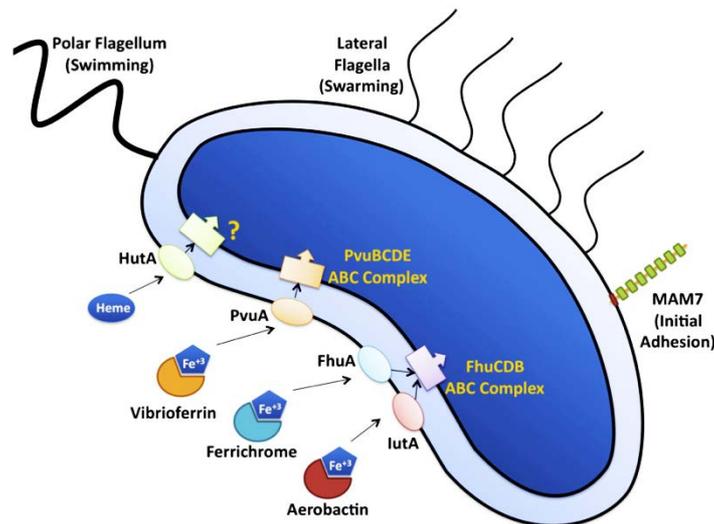


Figure 33 : Représentation schématique d'un *Vibrio*. D'après Broberg, 2011²⁷³

Ils présentent plusieurs formes de vie. Ils peuvent vivre en totale liberté dans le milieu aquatique ou associés à des biofilms ou pour certains interagir de façon symbiotique ou pathogène avec des hôtes eucaryotes. L'aptitude que possèdent certains *Vibrio* à concevoir des biofilms permet

d'améliorer grandement leurs survies en raison d'une meilleure adaptation aux divers changements de l'environnement aquatique^{271,274}. Actuellement, 128 espèces différentes de *Vibrio* ont été caractérisées (<http://www.bacterio.net/>) et 12 sont classées pathogènes pour les humains (Tableau 4)²⁷⁵.

V. cholerae, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont considérés comme étant de sérieux pathogènes humains. *V. cholerae*, agent responsable du choléra contracté suite à l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés provoque d'importantes diarrhées pouvant provoquer la mort en cas d'absence de traitement. *V. parahaemolyticus* est connu pour provoquer essentiellement une gastro-entérite suite à la consommation de produit contaminés provenant de la mer. *V. vulnificus* est associé à trois sortes d'infections, à savoir, une gastro-entérite consécutive à la consommation de fruit de mer, une infection des plaies résultant d'une baignade ainsi qu'une septicémie dans le cas de personne immunodéprimée^{268,275}.

Vibrio pathogènes	
<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. carchariae</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. damsela</i>
<i>V. mimicus</i>	<i>V. fluvialis</i>
<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. furnissi</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. hollisae</i>

Tableau 4 : *Vibrio* pathogènes humains

Les *Vibrio* sont également responsables de la vibriose, une des maladies bactériennes extrêmement répandues et connu pour affecter principalement les poissons et les crustacés marins^{276,277}. Pouvant affecter toutes les étapes de croissance, cette pathologie sévit couramment aux cours des premiers stades larvaires mais atteint principalement les espèces aux stades juvéniles entraînant des taux de mortalité très élevés.

Il existe de nombreux *Vibrio* considérés comme pathogènes pour les espèces aquatiques. Par exemple, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. carchariae* et *V. ichthyenteri* présentent une pathogénicité pour les poissons^{272,278}. Certains sont associés à une

espèce en particulier. C'est notamment le cas de *V. harveyi*, *V. vulnificus* ainsi que *V. splendidus* qui sont spécifiquement liés à la mortalité des crevettes de *Litopenaeus vannamei* et *Penaeus monodon* aux stades larvaires²⁷⁹⁻²⁸². Il est également très courant que des épidémies de vibrioses surviennent dans les bassins de grossissement des crevettes. Celles-ci peuvent être provoquées par *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*, ou bien encore *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida*^{279,280}. D'autres *Vibrio* peuvent engendrer de sérieuses complications en termes de santé des espèces aquatiques, c'est notamment le cas de *V. owensii* et *V. campbelli*²⁸³.

Les épidémies de vibrioses sont souvent responsables de pertes économiques considérables dans le domaine de l'aquaculture mondiale. En raison de ces nombreuses pertes, les pisciculteurs ont constamment recours à un usage massif d'antibiotiques²⁸⁴.

1.2 L'utilisation d'antibiotique en aquaculture

Les antibiotiques sont fréquemment utilisés dans le but de soigner et prévenir d'éventuelles pathologies en santé humaine, et animale comprenant l'élevage d'animaux terrestres et aquatiques.

Pour traiter les contaminations à *Vibrio* chez les êtres humains plusieurs antibiotiques sont couramment employés comme par exemple : les fluoroquinolones, la doxycycline, la tétracycline, ainsi que les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération à savoir la céphalothine, la céfuroxime, la céfotaxime et la ceftazidime²⁸⁵⁻²⁸⁸.

Les pisciculteurs utilisent massivement les antibiotiques afin d'éradiquer les épidémies de vibrioses. En fonction du pays, les antibiotiques approuvés pour une utilisation en aquaculture varient fortement. Par exemple, les antibiotiques tels que les quinolones, le triméthoprime, l'oxytétracycline, les sulfamides et la tétracycline sont utilisés par les pisciculteurs en Asie à titre préventif et curatif²⁸⁸⁻²⁹⁰. En Italie, c'est le triméthoprime, l'oxytétracycline, la tétracycline, l'amoxicilline, la fluméquine et l'alliance triméthoprime - sulfadiazine qui sont autorisés par les autorités²⁹¹. En Norvège, la réglementation est plus stricte et l'utilisation d'antibiotiques est restreinte actuellement à trois types à savoir le florfénicol, l'acide oxolinique et la combinaison triméthoprime - sulfadiazine²⁹². Dans de nombreux pays, l'ensemble des

antibiotiques disponibles sont employés excessivement comme agents prophylactiques par les pisciculteurs avec peu de contrôle concernant les bonnes pratiques d'utilisation de ces derniers.

Dans les élevages aquacoles, les antibiotiques sont habituellement ajoutés soit dans la nourriture soit dans l'eau. Ces méthodes d'administration engendrent la propagation des antibiotiques dans l'environnement (Figure 34). Ainsi, durant une longue période, les différents micro-organismes tels que les *Vibrio* sont sans-cesse en confrontation à d'infimes concentrations d'antibiotiques provoquant alors une certaine adaptation aux antibiotiques^{293,294}. Ces utilisations excessives conduisent à l'émergence de plusieurs souches bactériennes multirésistantes comme il a pu être rapporté pour les souches de *V. parahaemolyticus*, *V. haveyi* et *V. splendidus*^{295,296}. Les souches résistantes sont susceptibles d'être dangereuses pour les humains du fait d'un transfert possible de la résistance entre bactéries²⁹⁷⁻³⁰⁰.

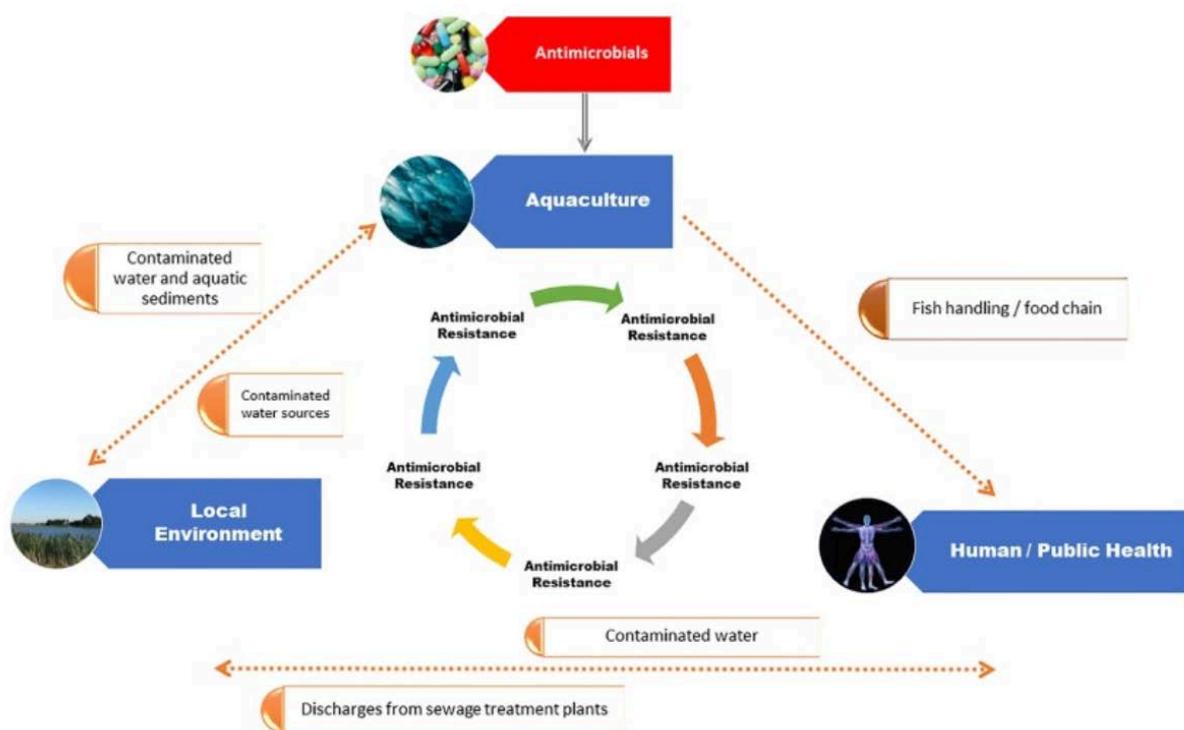


Figure 34 : Liens entre l'utilisation des antibiotiques et le développement des résistances. D'après Santos, 2018²⁹³

La confrontation des pisciculteurs aux réglementations de certains pays limitant de plus en plus l'utilisation des antibiotiques ainsi que l'apparition possible de souches résistantes pouvant présenter un réel risque pour la santé humaine a incité au développement de nouvelles alternatives comme les probiotiques³⁰⁰.

1.3 L'utilisation de probiotique en aquaculture

C'est en 1965, que le terme probiotique a été initialement introduit par Lilly et Stillwell³⁰¹. Le terme probiotique a eu plusieurs définitions. Il a tout d'abord été employé par Lilly et Stillwell pour évoquer des substances sécrétées par des micro-organismes stimulant la prolifération d'autres micro-organismes³⁰¹. Par conséquent, la définition introduite par les inventeurs signifiait absolument le contraire du terme antibiotique. En 1989, Fuller a revisité la définition des probiotiques en essayant de la perfectionner. Il a alors proposé de définir un probiotique comme étant « un complément alimentaire microbien vivant qui affecte de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal »³⁰². Cependant, la définition proposée par Fuller a été remise en question quant à son exactitude. En effet, en 1999, Salminen *et al.*, ont suggéré une définition en se basant sur plusieurs critères tels que les bienfaits procurés par les probiotiques non-viables sur la santé. Ainsi, il a proposé de définir les probiotiques comme étant « des préparations de cellules microbiennes ou des composants de cellules microbiennes qui ont un effet bénéfique sur la santé et le bien-être de l'hôte »^{303,304}. La définition des probiotiques la plus répandue aujourd'hui est celle proposée en 2001 par l'OMS et la FAO qui définissent les probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un bienfait à l'hôte »^{305,306}.

L'utilisation des probiotiques est largement répandue dans l'élevage d'animaux terrestres mais demeure une nouveauté dans les élevages aquacoles. L'utilisation de tels composés a pour but de protéger naturellement les espèces aquatiques. En aquaculture, la définition du terme probiotique nécessite d'être légèrement réadaptée du fait que le microbiote des espèces aquatiques est continuellement en interaction avec l'environnement ambiant. Par conséquent, de manière générale, les probiotiques en aquaculture sont définis en tant que « compléments microbiens vivant qui ont un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte ou ambiante, en assurant une meilleure utilisation de l'aliment ou en augmentant sa valeur nutritionnelle, en améliorant la réponse de l'hôte à la maladie, ou en améliorant la qualité de son environnement ambiant »³⁰⁷. Pour être considéré comme un éventuel probiotique, des conditions doivent être respectées par le micro-organisme. Certaines de ces conditions sont considérées comme primordiales tandis que d'autres sont classées favorables. Les probiotiques doivent obligatoirement remplir les conditions suivantes^{300,308,309} :

- Ne pas présenter de toxicité
- Ne pas présenter de gènes de résistance
- Résister au tractus intestinal de l'espèce aquatique et au pH acide
- Présenter un effet favorable

De manière générale, les pisciculteurs emploient les probiotiques dans le but d'optimiser la santé des espèces aquatiques. Par exemple en favorisant leur croissance mais également en renforçant leur système immunitaire. Les effets des probiotiques sont très nombreux et extrêmement variés pouvant aller de l'amélioration de la qualité de l'eau à l'inhibition de bactéries pathogènes (Figure 35)^{310,311}.

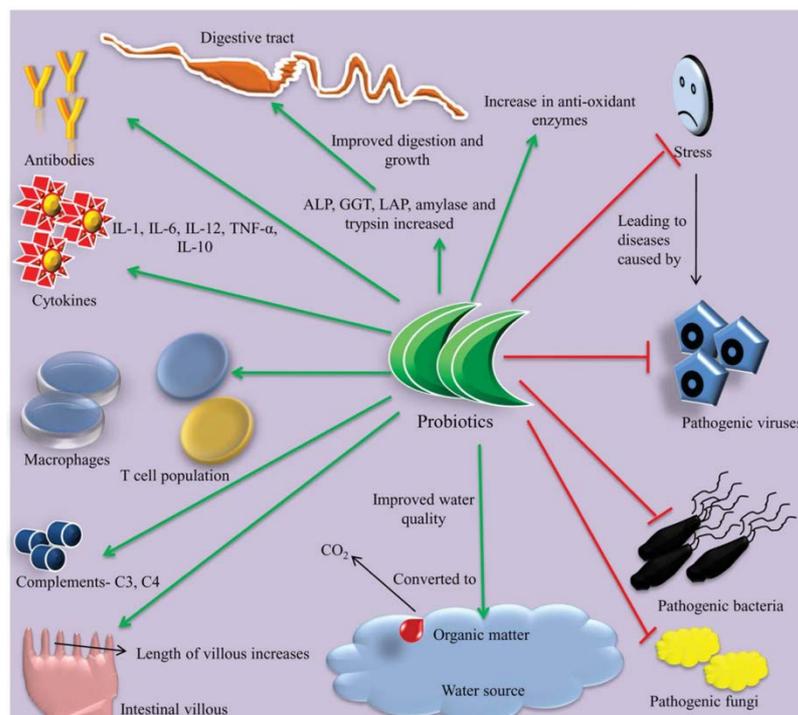


Figure 35 : Résumé des actions produites par les probiotiques dans le cadre de l'aquaculture. Les flèches vertes signalent des actions additives et les axes rouges montrent des actions d'inhibitions. D'après Zorriehzahra, 2016³¹¹

Les micro-organismes pouvant être impliqués en tant que probiotique dans le domaine de l'aquaculture sont très variés. Il peut s'agir de bactéries, de champignons, d'algues ou de levures^{309,311}. Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés aux composés antimicrobiens produits par les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*. Les souches de ce genre pourraient permettre de développer de nouveaux probiotiques à destination de l'aquaculture⁸.

1.4 Le genre *Pseudoalteromonas* comme probiotique

Depuis de nombreuses années, le genre *Pseudoalteromonas* suscite un intérêt de par son aptitude à pouvoir produire des composés biologiquement actifs contre de multiples micro-organismes³¹². Les souches du genre *Pseudoalteromonas* proviennent en général d'organismes marins tels que les mollusques³¹³. Elles présentent la particularité de vivre en parfaite symbiose avec leurs hôtes eucaryotes. Le groupe de Y. Fleury a montré que la souche *Pseudoalteromonas* hCg-6 isolée de l'hémolymphe d'huîtres saines présente un véritable potentiel pour être utilisée comme protection contre *V. harveyi*⁸. Par conséquent, dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à un composé antimicrobien produit par la souche de *Pseudoalteromonas* hCg-6 mais également par la souche de *Pseudoalteromonas* hCg-42 en raison de leur étroite relation phylogénétique⁹.

Les bactéries marines de *Pseudoalteromonas* appelées hCg-6 et hCg-42 ont été isolées de l'hémolymphe d'huîtres en bonne santé, *Crassostrea gigas*, prélevée dans l'archipel de Glénan. La sélection de ces deux souches a été effectuée dans un premier temps pour leur activité antibactérienne avérée contre les bactéries à Gram-négatives puis dans un second temps pour leur facilité de culture. Ces deux souches produisent des peptides antimicrobiens nommés Altérines. Avant de présenter la structure tridimensionnelle obtenue avec des contraintes RMN pour l'un de ces composés, je vais présenter succinctement les travaux antérieurs qui ont déjà été réalisés sur ces Altérines à savoir la caractérisation de la structure chimique, les résultats d'activités antibactériennes et les propriétés de liaison au LPS.

1.5 Les Altérines

1.5.1 Caractérisation de la structure chimique

La combinaison des spectres 2D homonucléaires (TOCSY et ROESY) et hétéronucléaires (¹³C, HSQC et HMBC) couramment utilisée pour l'attribution des déplacements chimiques et l'attribution séquentielle a permis de déterminer la structure chimique de ces peptides antimicrobiens³¹⁴. L'utilisation de la séquence NOESY a donné des signaux qui sont relativement faibles en raison de l'absence de structure correctement définie en solution

aqueuse ainsi qu'un « tumbling » moléculaire intermédiaire de la molécule. Par conséquent, le recours à un spectre ROESY était nécessaire.

Les souches de *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 synthétisent une série de cyclolipopeptides (CLP) avec un fort caractère cationique. Ces cyclolipopeptides partagent tous le même macrocycle heptapeptidique composé de deux acides aminés protéinogènes (Leu - Arg) et de cinq résidus exotiques dont un acide 2,4-diaminobutyrique (Dab), une déhydrobutyrique (Dhb) et trois acides 2-hydroxy-diaminobutyriques (OH-Dab). Une chaîne grasse est liée à ce macrocycle heptapeptidique par une liaison amide. La structure chimique générale de ces cyclolipopeptides est représentée à la Figure 36.

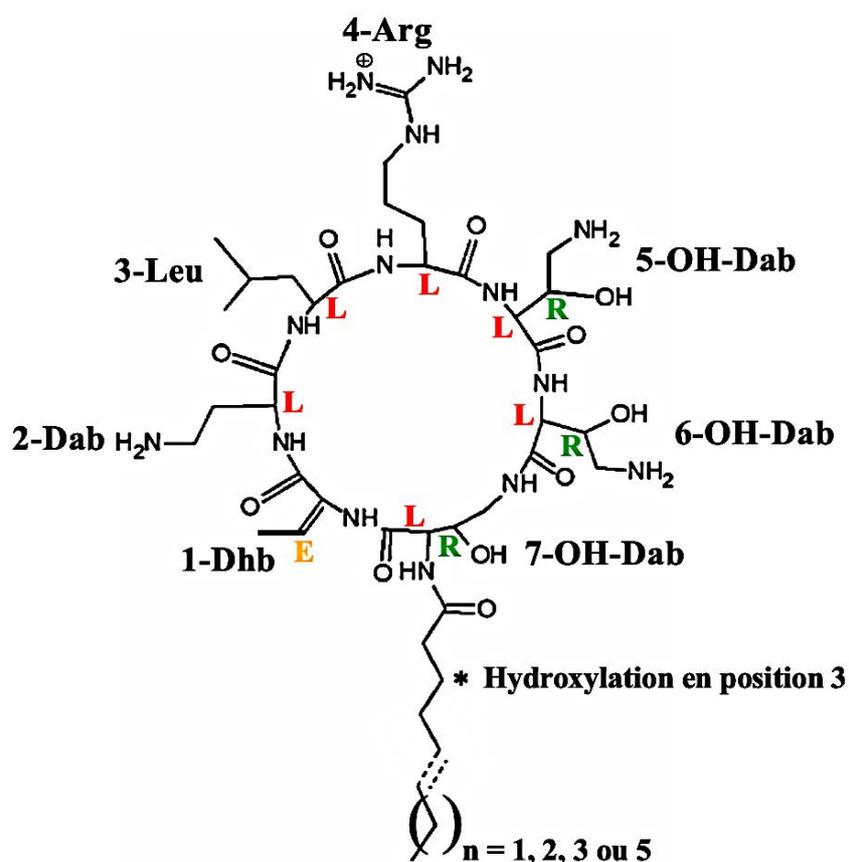


Figure 36 : Structure chimique des Altérines isolés des souches de *pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42. Structure chimique déterminée par RMN³¹⁵

Les CLP diffèrent les uns des autres uniquement par leur chaîne grasse. En effet, les variations de la masse molaire de 926 à 982 Da (Tableau 5) résultent de la nature de la chaîne grasse. C'est-à-dire de sa longueur (8, 9, 10, ou 12 atomes de carbone), de la présence ou de l'absence d'une insaturation en position 5 ou d'une fonction alcool en position 3 (Figure 36).

Ces résultats sont parfaitement cohérents avec les données précédemment rapportées par Hirota-Takahata à l'exception de la stéréochimie du résidu DHB qui est différente³¹⁶. En effet, une insaturation E a été déterminée concernant la chaîne latérale du résidu DHB alors que dans le cas des Ogipeptines, rapportées par Hirota-Takahata, le DHB présentait une insaturation Z³¹⁶. Par conséquent, malgré cette différence de stéréochimie, par souci de cohérence et en référence au genre *Pseudoalteromonas* (producteur commun), l'ensemble de ces cyclolipoptides ont été renommés Altérines.

	Hydrocarbon tail	MW (Da)	<i>Pseudoalteromonas</i> strains		
			hCg-6	hCg-42	SANK 71903
Alterin	C _{8:0}	926	+	+	-
	C _{9:0}	940	+	+	-
	<i>cis</i> C _{10:1} Δ ⁵	952	+	+	-
	C _{10:0}	954	+	+	+
	3'-OH C _{10:0}	970	+	+	-
	<i>cis</i> C _{12:1} Δ ⁵	980	+	+	+
	C _{12:0}	982	+	-	+
	<i>cis</i> C _{14:1} Δ ⁷	1008	-	-	+

Tableau 5 : Variation de la masse molaire des Altérines en fonction de la nature de la chaîne grasse et souches productrices des Altérines. Souche Pseudoalteromonas SANK 71903³¹⁶

1.5.2 Activité antibactérienne des Altérines

Des tests d'activités antibactériennes des sept Altérines ont été réalisés sur divers micro-organismes comprenant des bactéries pathogènes pour l'Homme (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus*) et des bactéries responsables de nombreuses pertes en aquaculture (Tableau 6). L'ensemble des bactéries utilisées pour les tests sont des bactéries à Gram-négatif. Les Altérines principalement produites comprenant l'altérine952, l'altérine954, l'altérine970 et l'altérine980 ont pu être testés contre l'ensemble des bactéries sélectionnées pour cette étude. En revanche, les Altérines dont la production est plus faible, regroupant l'altérine926, l'altérine940 et l'altérine982, ont pu être testées seulement contre quelques bactéries. La polymyxine B (PMB (cf Figure 5), a été utilisée comme contrôle positif permettant de comparer les activités des altérines avec un antibiotique de référence

(Tableau 6). En effet, considéré comme le « gold standard », la PMB présente une activité contre une large gamme de bactéries à Gram-négatif.

Les tests d'activités antibactériennes ont montré que toutes les Altérines présentent une activité puissante contre les bactéries à Gram-négatif. Actifs contre l'ensemble des bactéries de l'étude à l'exception de la souche productrice, *Pseudoalteromonas* hCg-6, et *V. tapetis* CECT 4600, la PMB et les Altérines présentent des spectres d'action qui sont très semblables. Globalement, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) déterminées avec les Altérines les plus efficaces et la PMB étaient proches hormis pour *V. harveyi* ORM4 et *V. parahaemolyticus* 13-028A/3. La souche de *V. harveyi* ORM4 est plus sensible à l'altérine940, l'altérine952, l'altérine954 et l'altérine980 qu'à la PMB. Concernant, la souche de *V. parahaemolyticus* 13-028A/3, elle est totalement inhibée par l'altérine954, l'altérine970 et l'altérine980 à une concentration de 6,25 μM alors que la PMB n'a aucun effet jusqu'à 100 μM .

MW (Da)	Hydrocarbon tail	MICs							
		926 C _{8:0}	940 C _{9:0}	954 C _{10:0}	Alterin			982 C _{12:0}	Polymyxin B
					952 C _{10:1}	970 3'OH C _{10:0}	980 C _{12:1}		
<i>A. caviae</i>	CIP 7616	ND	ND	5,5	ND	17,6	5,8	ND	3,1
<i>A. hydrophila</i>	CIP 7614	-	25	2,7	ND	ND	2,9	ND	0,8
<i>E. coli</i>	ML35	100	50	1,4	25	35	1,5	ND	3,1
<i>E. coli</i>	SBS363	50	25	0,2	0,8	0,1	0,4	6.3	0,2
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	50	22	50	35,2	23	ND	1,6
<i>Pseudoalteromonas</i>	hCg-6	-	-	-	-	-	-	ND	-
<i>Pseudoalteromonas</i>	hCg-42	ND	ND	-	-	-	-	ND	-
<i>S. enterica</i>	CIP 8297	12.5	6.25	0,7	6,25	1,1	1,4	ND	0,8
<i>V. harveyi</i>	ORM4	50	6.25	1,4	12,5	ND	1,4	ND	25
<i>V. parahaemolyticus</i>	13-028A/3	ND	ND	6.25	ND	6.25	6.25	ND	-
<i>V. tapetis</i>	CECT 4600 ^T	ND	ND	-	-	-	-	ND	-
<i>V. tasmaniensis</i>	LGP 32	50	6,25	2,7	50	8,8	2,9	ND	3
<i>Y. ruckeri</i>	ATCC 29473	50	6.25	0,3	0,4	1,1	0,4	12.5	0,4

ND and (-) mean not determined and MIC > 100 μM , respectively.

Tableau 6 : CMI des Altérines contre une sélection de 11 bactéries à Gram négatif

La CMI moyenne ($\overline{\text{CMI}}$) des Altérines principalement produites ainsi que celle de la PMB a été calculée. Bien que celle-ci ne reflète aucune réalité biologique, elle a permis de classer ces composés antimicrobiens en fonction de leurs activités contre les bactéries à Gram-négatif. Ainsi, l'altérine954, l'altérine980 et la PMB présentent des $\overline{\text{CMI}}$ semblables de l'ordre de 4 μM alors que celles de l'altérine952 et l'altérine970 sont relativement plus élevées avec respectivement des $\overline{\text{CMI}}$ de 12 μM et 20 μM .

La relation structure activité a aussi été mise en évidence. En effet, par comparaison de l'altérine954 à l'altérine952 et l'altérine970, il apparaît que la présence d'une insaturation en position 5' (altérine952) ou d'une fonction alcool en position 3' (altérine970) dans la chaîne grasse engendre globalement une réduction de l'activité. Néanmoins, l'allongement de la chaîne grasse avec deux carbones (altérine980) permet de retrouver une activité similaire à celle obtenu avec l'altérine954. Il est également possible d'observer qu'en absence d'insaturation ou d'hydroxylation sur la chaîne grasse (altérine926), l'allongement de la chaîne grasse avec simplement un carbone (altérine940) engendre une diminution de la CMI.

En revanche, il existe certaines exceptions qui dépendent d'une part de la souche ciblée et d'autre part de l'Altérine en question. Par exemple, l'altérine970 présente une plus forte activité que l'altérine954 contre la souche d'*E. Coli* SBS363. Il est également intéressant de noter que l'écart de sensibilité observé pour les souches d'*E. Coli* SBS363 et d'*E. Coli* ML35, particulièrement connues pour exposer respectivement des lipides A à chaîne courte et à chaîne longue peut provenir d'une membrane externe bactérienne différente³¹⁷. De ce fait, l'altérine954, l'altérine970 et l'altérine980 en interaction directe avec le LPS ont été étudiés.

1.5.3 Propriété de liaison au LPS

La PMB a été utilisée comme témoin positif pour l'étude des propriétés de liaison au LPS. Le test de détection d'endotoxine Limulus Amoebocyte Lysate (LAL), a été détourné de manière à obtenir des informations sur les interactions entre le LPS et les trois altérines testés (altérine954, altérine970 et altérine980). Le test de détection a été effectué après 15 min d'exposition de l'altérine954, l'altérine970 et l'altérine980 au LPS de *E. Coli* 0111 : B4 (Figure 37A). La diminution de la détection du LPS observée avec l'augmentation de la concentration en altérine à la Figure 37A illustre la réduction du LPS biologiquement actif et par la même occasion les propriétés de liaison des Altérines au LPS. Sans surprise, l'altérine954 et l'altérine980 ont montré un abaissement plus important de la détection du LPS par rapport à l'altérine970.

Un test de Résonance Plasmonique de Surface (SPR) a été réalisé en employant la technologie Biacore (GE Healthcare) afin d'étudier plus en détail les propriétés de liaison de l'altérine954 et l'altérine970 au LPS (Figure 37B). L'altérine954 a présenté des propriétés de liaison au LPS

semblables à la PMB tandis que pour l'altérine970 la réponse été réduite d'un facteur 2 (Figure 37B). Ainsi, les deux tests réalisés (LAL et SPR) dans le but d'étudier la liaison des Altérines au LPS sont en parfait accord pour l'altérine954. De plus, les propriétés de liaisons au LPS et la hiérarchisation des Altérines établie à partir des \overline{CMI} semblent parfaitement concorder, permettant ainsi de conclure sur le fait que l'activité antibactérienne des Altérines semble être conditionnée par l'aptitude de la liaison au LPS.

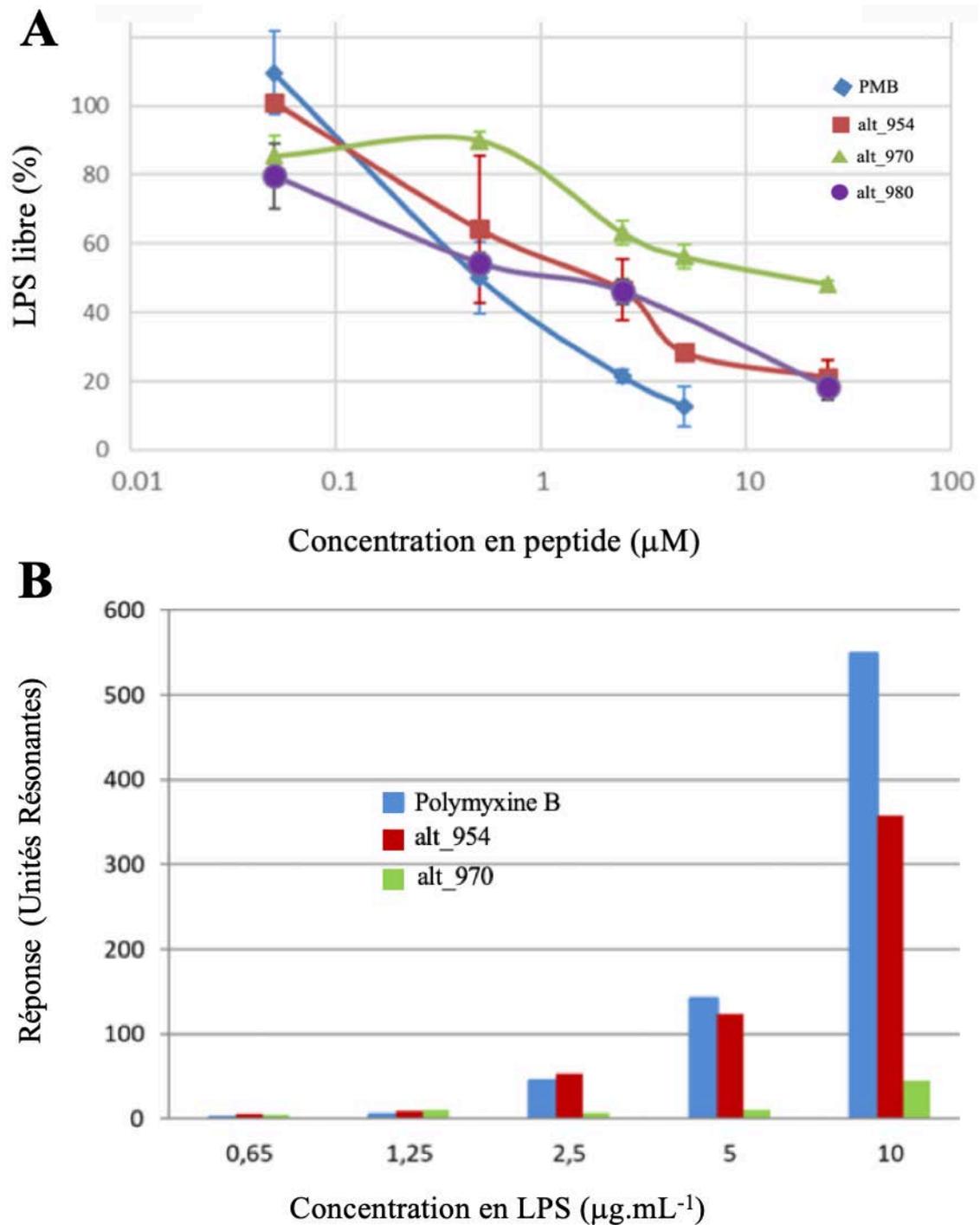


Figure 37 : Propriété de liaison des Altérines et de la PMB au LPS

A : Résultats du test LAL – B : Résultats du test SPR

2 Objectif

Les souches de *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 ont été isolées par le groupe de Y. Fleury de l'hémolymphe d'huîtres saines collectés dans l'océan Atlantique (Bretagne, France). Elles produisent des composés antimicrobiens présentant une activité puissante contre les bactéries à Gram négatif. Le spectre d'action des Altérines était très semblable à celui de la PMB considérée comme le « gold standard ». En effet, les CMI étaient similaires. Néanmoins, les Altérines avaient montré une activité plus élevée que la PMB contre les souches de *V. harveyi* ORM4 et *V. parahaemolyticus* 13-028A/3. Produisant des composés antimicrobiens très puissants contre les *Vibrio* responsables de la vibriose, mais également contre les *Vibrio* pathogènes humains, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, pourraient permettre de développer de nouveaux probiotiques à destination de l'aquaculture.

Parmi, les Altérines principalement produites par *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 (altérine952, altérine954, altérine970 et altérine980) et présentant les meilleures activités antimicrobiennes (altérine954 et altérine980) nous avons choisi de nous intéresser à l'altérine980 (Figure 38) en raison de sa disponibilité immédiate lors de mon arrivée en thèse. Ma mission a été de déterminer la structure tridimensionnelle de l'altérine980 en présence de micelles de LPS par RMN dans le but de définir un mécanisme d'action et de parvenir à mieux caractériser les relations qui existent entre les activités antimicrobiennes et le LPS des bactéries à Gram-négatif.

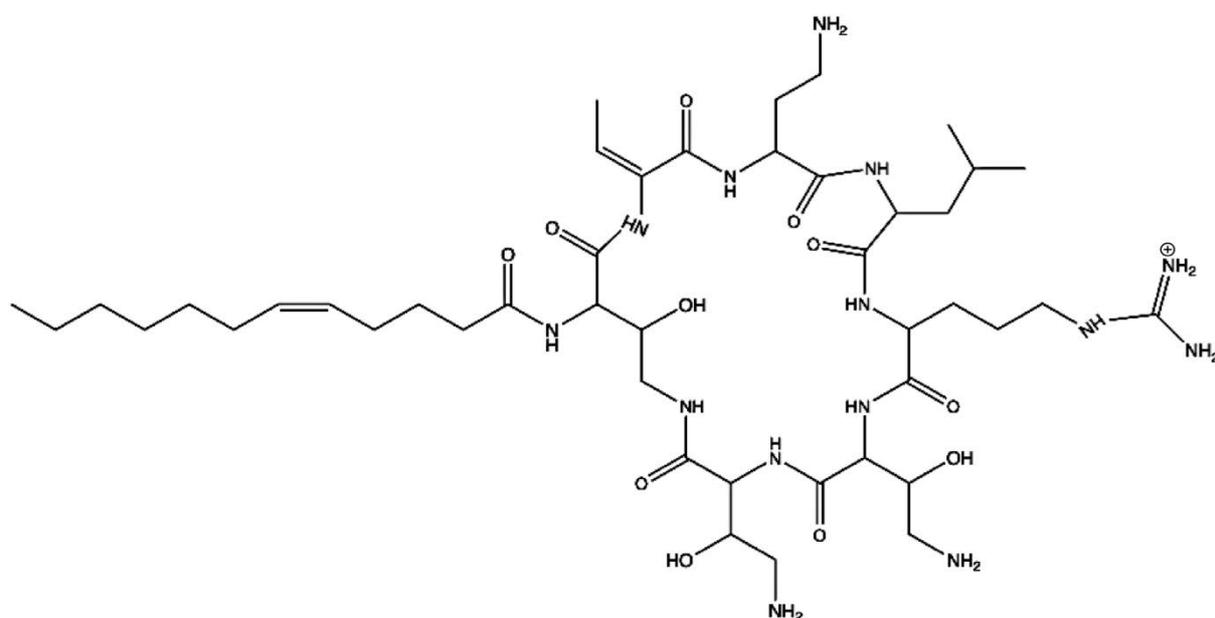


Figure 38 : Structure chimique de l'altérine980³¹⁵

3 Résultats

3.1 Étude de l'altérine980 dans l'eau

L'altérine980 ayant une masse moléculaire intermédiaire (981 g/mol) présente un régime d'agitation moléculaire intermédiaire ce qui se traduit par l'absence de pics de corrélation NOE sur le spectre 2D NOESY de l'altérine980 dans l'eau.

De plus, comme c'est souvent le cas avec de petits peptides antimicrobiens, aucune structure tridimensionnelle définie n'a été observée dans l'eau. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la plupart des peptides antimicrobiens cationiques sont déstructurés en solution aqueuse, et c'est seulement au contact de la membrane bactérienne ou d'un milieu mimant les membranes qu'ils acquièrent une structure tridimensionnelle bien définie. Nous avons donc étudié l'interaction de l'altérine980 en présence de micelles de LPS.

3.2 Étude de l'altérine980 en présence de LPS

Avec une Concentration Micellaire Critique (CMC) de l'ordre du micromolaire (μM), le LPS forme facilement des micelles de haut poids moléculaire en solution³¹⁸. L'ajout de micelles de LPS à une solution aqueuse de l'altérine980 a provoqué un élargissement significatif des pics sur le spectre RMN ^1H à une dimension pour un ratio molaire peptide - LPS de 1 : 0,0141 (Figure 39). A une plus faible concentration en micelle de LPS, (ratio alt_980 : LPS de 1 : 0,0018) il est possible d'observer un élargissement modéré des pics (Figure 39). L'élargissement des résonances indique que l'altérine980 est en échange rapide entre une forme liée au LPS et une forme libre à l'échelle de temps des déplacements chimiques. Les déplacements chimiques des résonances ^1H de l'altérine980 sont restés inchangés pendant la titration par les micelles de LPS.

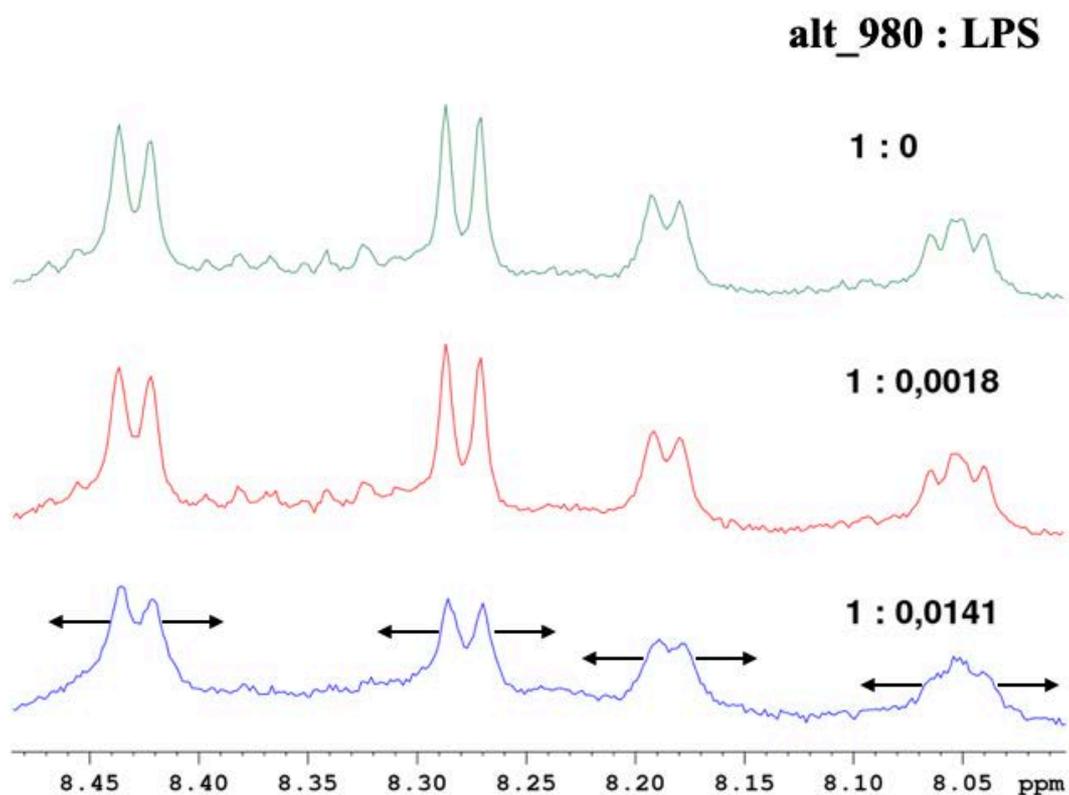


Figure 39 : Portions de spectres RMN ^1H de l'altérine980 en présence de concentration croissante en micelles de LPS (90 % H_2O – 10 % D_2O - 298K – pH 4,5). Les portions de spectre correspondent à la région des protons amides. Les ratios molaires peptide - LPS sont indiqués sur chaque spectre. Sur la dernière portion de spectre (bleu), les concentrations molaires en alt_980 et LPS sont respectivement de 5,24 mM et 0,0741 mM

Des acquisitions de spectres Tr-NOESY ont été réalisées dans le but de déterminer la structure tridimensionnelle de l'altérine980 lorsqu'il est dans son état lié au LPS. Les spectres Tr-NOESY ont donc été réalisés au ratio molaire peptide - LPS de 1 : 0,0141 en raison d'un élargissement des pics de résonances ^1H marqué pour ce ratio.

A l'inverse du spectre NOESY obtenu pour l'altérine980 dans l'eau exempt de LPS, de nombreux pics croisés négatifs ont été détectés dans les spectres Tr-NOESY lorsque des micelles de LPS ont été ajoutées (Figure 40).

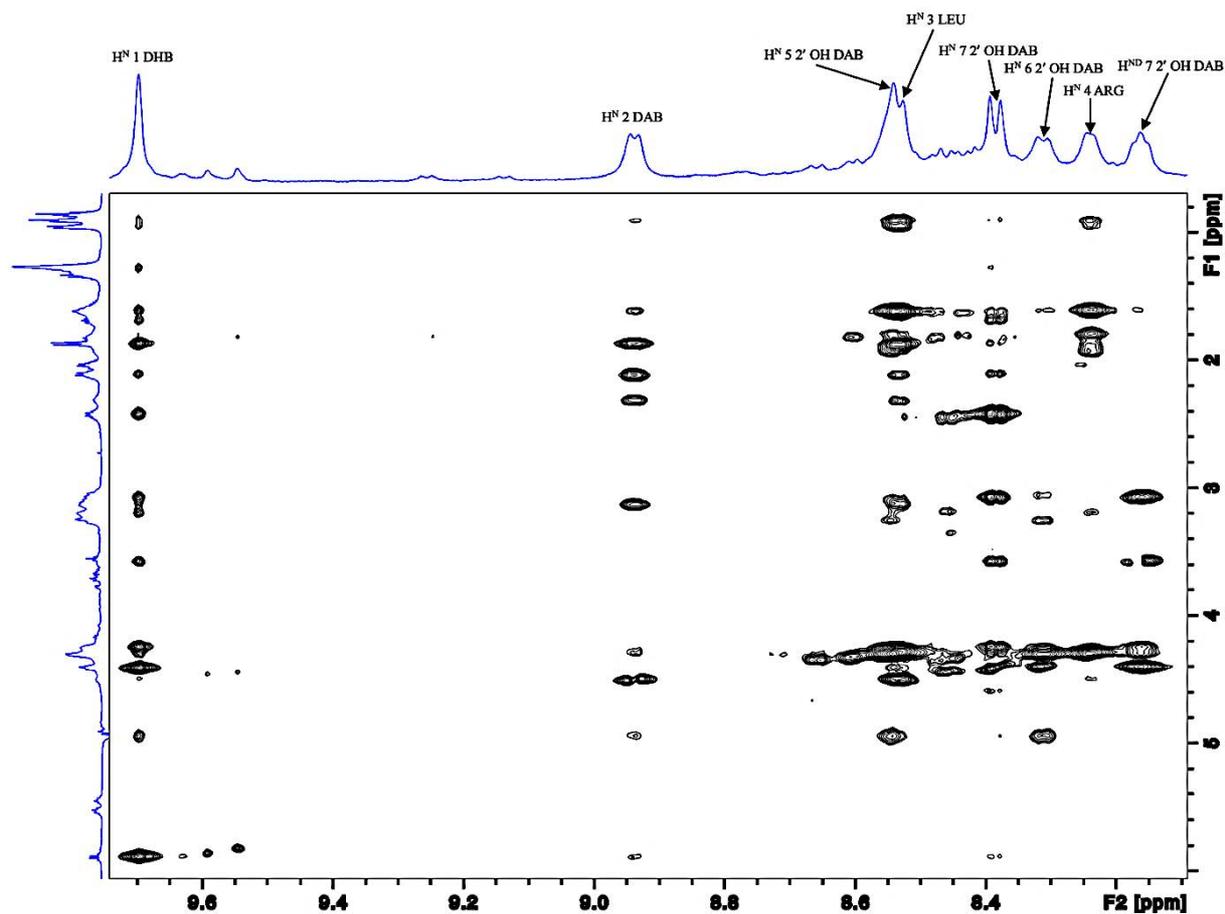


Figure 40 : Portion du spectre 2D ^1H - ^1H Tr-NOESY de l'altérine980 en présence de micelles de LPS avec un temps de mélange de 100 ms. Ratio molaire peptide - LPS de 1 : 0,0141 (90 % H_2O - 10 % D_2O - 283K - pH 4,5). Les concentrations molaires en alt_980 et LPS sont respectivement de 5,24 mM et 0,0741 mM. Les pics négatifs sont les seuls représentés

La détection de ces nombreux pics croisés négatifs sur le spectre Tr-NOESY témoigne de l'association dynamique de l'altérine980 avec les micelles de LPS. En effet, le Tr-NOESY qui est basé sur l'étude des ligands nécessite obligatoirement un échange rapide entre la forme libre et la forme complexée. Le Tr-NOESY est une méthode amplement employée qui permet de déterminer la structure tridimensionnelle de petites molécules en interaction avec des protéines ou des micelles^{10,122,203,318-323}.

Les valeurs de déplacements chimiques ^1H de l'altérine980 sont présentées dans le Tableau 7 :

AA	H ^N	H _α	H _β	Autres
DHB 1	9,70		5,89	γCH ₃ 1,87
DAB 2	8,94	4,50	2,32 ; 2,11	γCH ₂ 3,13 ; δNH ₂ 7,87
LEU 3	8,53	4,29	1,88 ; 1,62	γCH 1,61 ; δCH ₃ 0,96 ; 0,90
ARG 4	8,24	4,30	1,94 ; 1,79	γCH ₂ 1,60 ; δCH ₂ 3,19 ; εNH 7,00 ; ζNH ₂ 7,87
2'OH DAB 5	8,54	4,31	4,25	γCH ₂ 3,25 ; 3,09 ; δNH ₂ 7,87
2'OH DAB 6	8,31	4,40	4,30	γCH ₂ 3,25, 3,04 ; δNH ₂ 7,87
2'OH DAB 7	8,38	4,41	4,25	γCH ₂ 3,55 ; 3,07 ; δNH 8,16

Tableau 7 : Déplacements chimiques ^1H de l'altérine980 ($\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ 90 : 10) à 283 K et à pH 4,50

3.3 Structure tridimensionnelle de l'altérine980 liée aux micelles de LPS

Comme de nombreux pics croisés ont été détectés sur le spectre Tr-NOESY, nous avons pu envisager la détermination de la structure de l'altérine980 dans son état lié au LPS. Pour cela nous avons initialement évalué les distances interprotoniques en se basant sur les intensités des NOE.

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle, la molécule de l'altérine980 a été construite en utilisant une configuration L pour l'ensemble des acides aminés. Cette configuration a été adoptée en se basant sur les données rapportées par Hirota-Takahata³¹⁶.

Concernant la configuration des carbones chiraux en position α des trois résidus acides 2-hydroxy-diaminobutyriques (C_α OH-Dab), nous avons utilisé les deux configurations pour les constructions initiales sous Amber³²⁴ c'est-à-dire que les trois C_α OH-Dab étaient soit dans une configuration L soit dans une configuration D. L'utilisation d'une configuration D n'a pas permis d'obtenir des structures qui convergent. En effet, la convergence des structures s'est produite uniquement lorsque les C_α OH-Dab étaient dans une configuration L.

L'insaturation de la chaîne grasse a été configurée en « cis » en raison d'une valeur de couplage scalaire $^3J_{H-H}$ de l'ordre de 10 Hz. Dans le cas où l'insaturation de la chaîne grasse serait en configuration « trans » la valeur du couplage scalaire $^3J_{H-H}$ serait de l'ordre de 17 Hz.

En ce qui concerne l'insaturation du résidu DHB, celle-ci a été configurée en « trans » contrairement à ce qui a été rapporté par Hirota-Takahata³¹⁶. En effet, l'intensité du pic de corrélation que nous avons mesurée entre les protons $^1H^N$ et $^1H_\beta$ du résidu 1 DHB est beaucoup plus intense (Figure 41 : rouge) que celle mesurée entre les protons $^1H^N$ et $^1H_\gamma$ du résidu 1 DHB (Figure 41 : vert). De plus la valeur du déplacement chimique du $^1H_\beta$ ($^1H_\beta$: $\delta = 5,89$ ppm) permet de confirmer la configuration « trans » (E)-Dhb. En effet, plusieurs études rapportent une valeur de déplacement chimique pour le $^1H_\beta$ se situant à environ 6,5 ppm dans le cas d'un (Z)-Dhb alors que dans le cas d'un (E)-Dhb la valeur se situe entre 5,6 et 5,9 ppm^{316,325-327}.

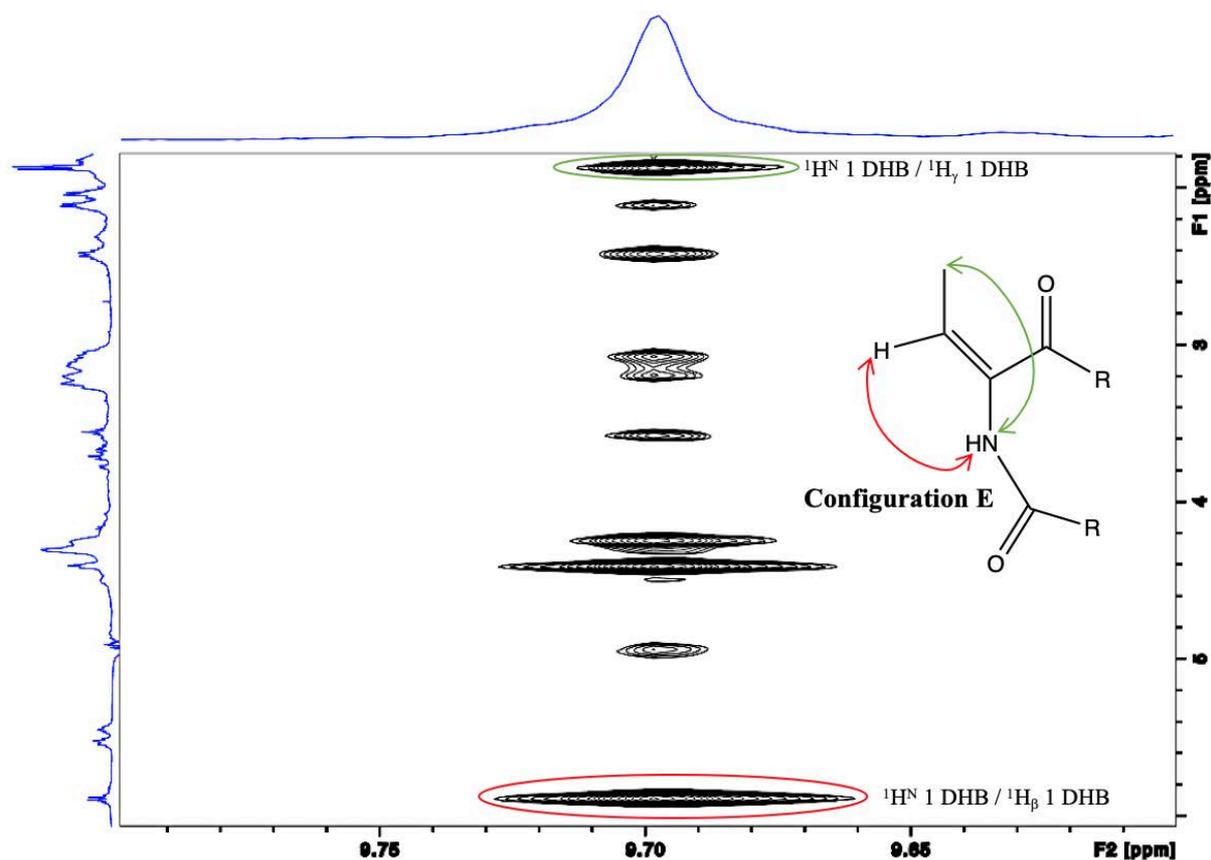


Figure 41 : Zoom sur le spectre 2D 1H - 1H Tr-NOESY de l'altérine980 en présence de micelles de LPS. Les pics de corrélation entourés par les cercles permettent de discriminer les configurations « cis » et « trans » de l'insaturation du résidu 1 DHB

La structure de l'altérine980 dans son état lié au LPS a été définie en exploitant 71 contraintes de distance obtenues par Tr-NOE. En raison de nombreuses superpositions, des intégrations ambiguës de Tr-NOE ont été utilisées pour le calcul des structures. Ainsi, parmi les 71

contraintes utilisés, 43 ont été intégrées sans ambiguïtés et 28 avec ambiguïtés. Les NOE non-ambigus concernent les ^1H diastéréotopes présentant des taches de corrélation d'intensité différentes qui ont été attribués de manière spécifique tandis que les NOE ambigus concernent les ^1H énantiotopes ou diastéréotopes présentant des pics de corrélation similaire dont l'attribution n'a pas pu être faite de manière spécifique.

Les NOE intra-résidus utilisés pour le calcul de la structure correspondent aux signaux NOE associés au résidu 7 2'OH DAB, qui est impliqué dans la cyclisation du peptide, ainsi qu'au résidu 1 DHB permettant de discriminer les configurations « cis » et « trans » de ce dernier (Figure 41). Les NOE intra-résidus concernent les NOE entre les ^1H d'un même résidu. Ces données structurales sont résumées dans le Tableau 10.

La Figure 42 correspond à la superposition des 20 structures de plus basse énergie ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å.

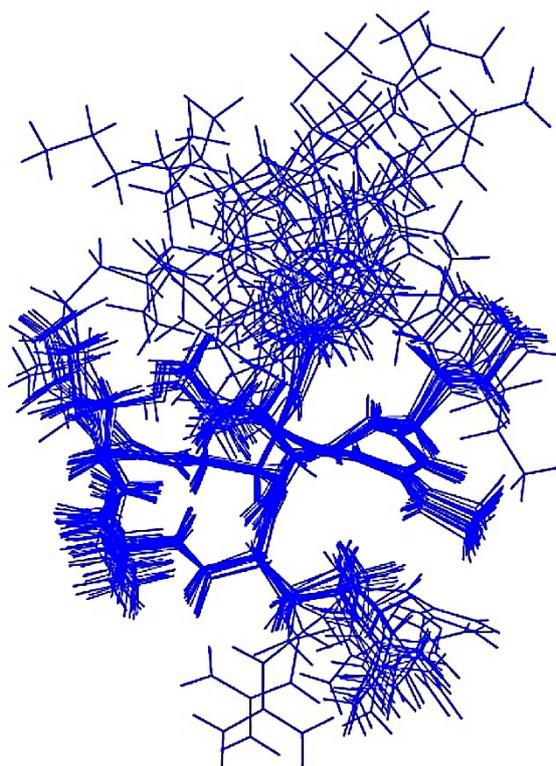


Figure 42 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie de l'altérine980 en présence de LPS

Les 20 structures de plus basse énergie de l'altérine980 présentées sur la Figure 42 ont été obtenues à partir de 100 structures calculées avec le logiciel AMBER³²⁴. La superposition a été réalisée avec le logiciel molmol³²⁸ en utilisant uniquement les atomes lourds composant le squelette du cycle heptapeptidique. Ces structures sont considérées comme étant

représentatives de la structure adoptée par l'altérine980 lorsqu'il est en interaction avec les micelles de LPS. Les configurations utilisées initialement pour la construction de la molécule sont toutes conservées et l'intégralité des liaisons peptidiques adoptent une configuration « trans » (Figure 43).

La structure que nous avons obtenue est bien définie. En effet, le RMSD déterminé uniquement à partir des atomes du squelette cyclique est de 0,135 Å. Lorsque l'ensemble des atomes lourds du cycle sont pris en compte le RMSD est de 0,7 Å. Nous pouvons observer sur la Figure 42 que l'extrémité de la chaîne latérale du résidu 4 ARG est moins bien définie que les chaînes latérales des autres résidus. Lorsque l'extrémité du résidu 4 ARG, à partir du N_ε est ignorée, la valeur du RMSD retombe à 0,508 Å. Nous pouvons également observer une orientation très aléatoire de la chaîne grasse par rapport au cycle peptidique. Cette libre orientation est due à l'absence quasi-totale de Tr-NOE entre le cycle peptidique et sa chaîne grasse.

Nous pouvons observer sur la Figure 43 que la structure cyclique de l'altérine980 est régie par un β-turn de type II impliquant une liaison hydrogène entre le carbonyle du résidu 7-OH-Dab et les protons amides des résidus 3-Leu (7.CO – 3.H^N = 2,01 Å) et 4-Arg (7.CO – 4.H^N = 1,72 Å). L'existence de ce β-turn est confortée par la présence sur le spectre Tr-NOESY d'un NOE intense entre les protons amides 3.H^N et 4.H^N ainsi que par les faibles pics de corrélations NOE entre le proton amide 1.H^N avec les protons amides 3.H^N et 4.H^N.

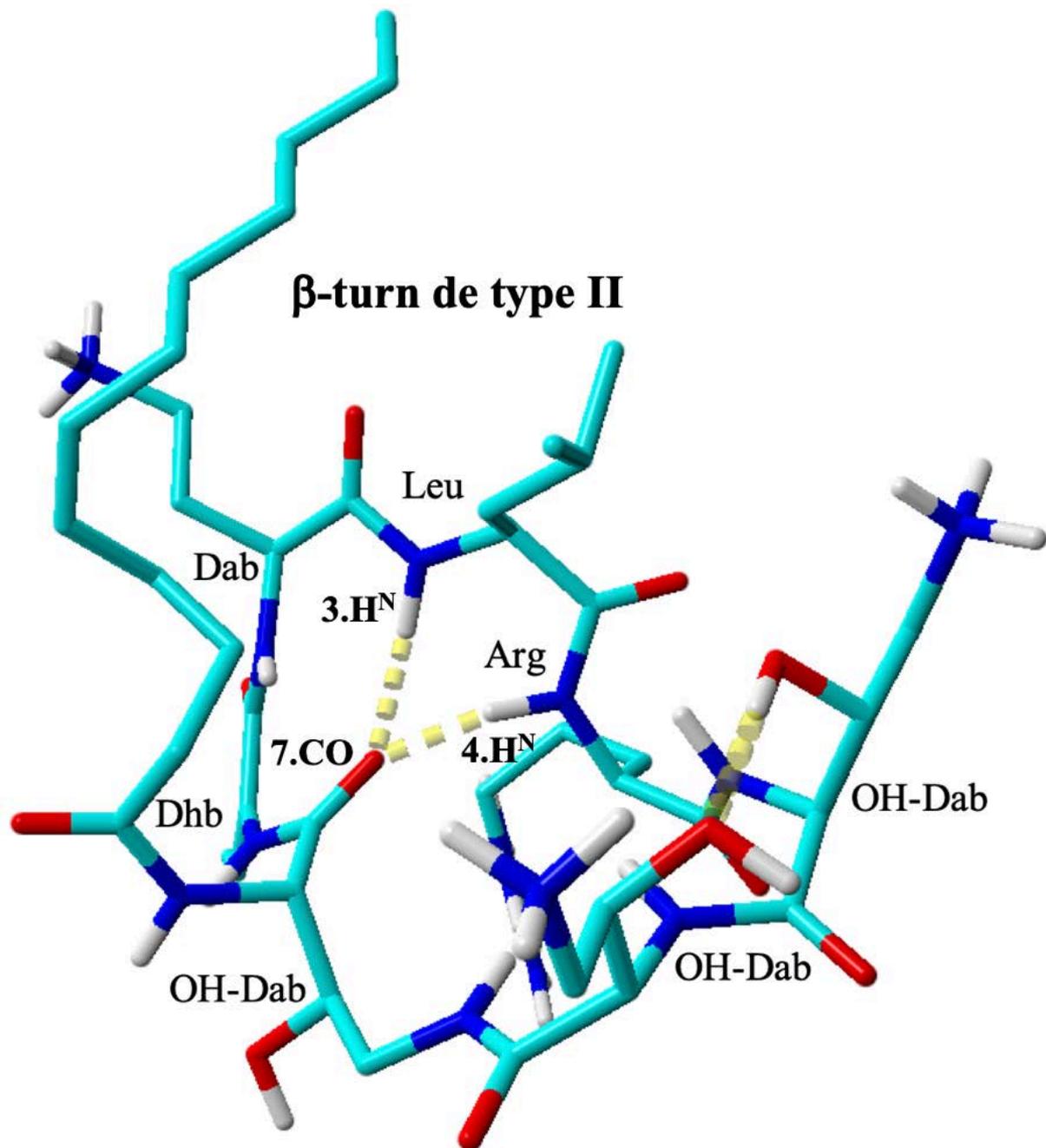


Figure 43 : Structure d'énergie la plus basse de l'altérine980 présentant les différentes liaisons hydrogène

En général, les liaisons peptidiques sont fixes comme c'est illustré sur la Figure 44 avec l'angle oméga de 180° , qui correspond à l'angle entre les deux plans définis par les atomes H-N-C et N-C=O. Ainsi, les modifications des structures peptidiques dépendent des liaisons situées de part et d'autre des liaisons peptidiques. Par conséquent, les acides aminés naturels composant les peptides sont caractérisés par la présence de deux angles dièdres notés Phi (φ) et Psi (ψ) (Figure 44).

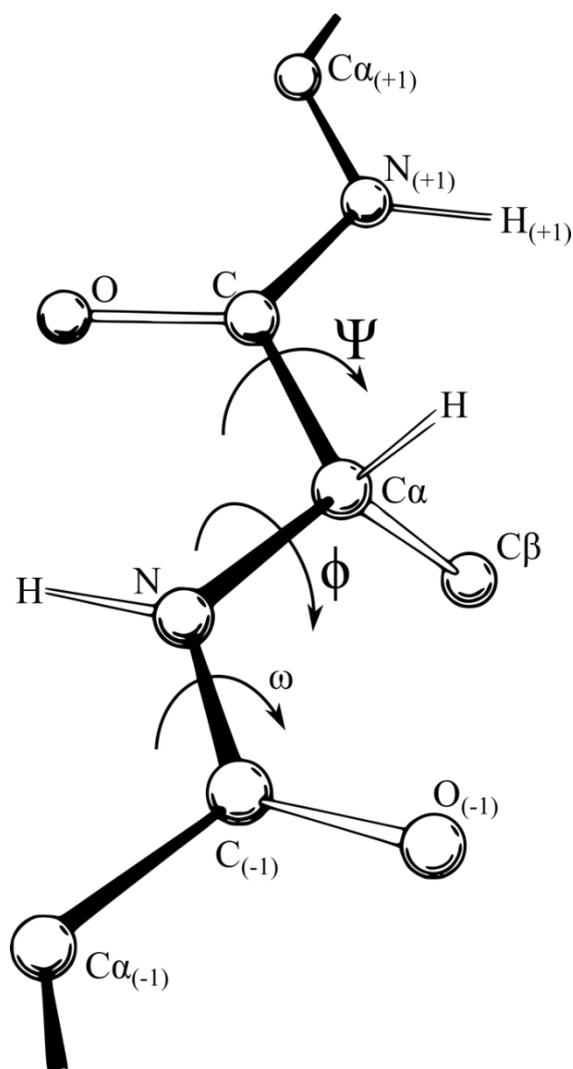


Figure 44 : Schéma illustrant les angles dièdres ω , ϕ et ψ

Les valeurs d'angles dièdres du β -turn de type II pour la structure de plus basse énergie de l'altérine980 sont présentées dans le Tableau 8 :

Angles dièdres ($^{\circ}$)	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}
β -turn de type II	-39 ± 4	-1 ± 3	-139 ± 4	20 ± 2

Tableau 8 : Angles dièdres du β -turn de type II concernant la structure de plus basse énergie de l'altérine980 déterminée en présence de micelles de LPS

La qualité des 20 structures de plus basse énergie a ensuite été vérifiée à partir du diagramme de Ramachandran³²⁹. Ce diagramme est une représentation graphique qui permet de confirmer la conformation à partir des valeurs d'angles dièdres. Pour chaque résidu de l'altérine980, nous

avons vérifié que les valeurs des angles dièdres φ (abscisse) et ψ (ordonnée) sont énergétiquement favorables.

L'intégralité des angles dièdres des 20 structures de plus basse énergie de l'altérine980 se situe dans la région autorisée du tracé de Ramachandran (Figure 45). En effet, 28,6 % des résidus se situent dans les régions les plus favorables et 71,4 % des résidus sont répartis dans les régions supplémentaires autorisées par le diagramme de Ramachandran. Néanmoins, la répartition des angles dièdres majoritairement (71,4 %) dans les régions supplémentaires autorisées s'explique par la contrainte cyclique de l'altérine980.

Les moyennes des angles dièdres Phi (φ) et Psi (ψ) de l'ensemble des résidus des 20 structures de plus basse énergie sont listées dans le Tableau 9.

Résidu	Phi (φ) (°)	Psi (ψ) (°)
1 DHB	- 39 ± 4	- 1 ± 3
2 DAB	- 139 ± 4	20 ± 2
3 LEU	- 152 ± 4	- 35 ± 3
4 ARG	63 ± 6	2 ± 21
5 2'OH DAB	- 95 ± 22	- 9 ± 15
6 2'OH DAB	- 137 ± 8	- 32 ± 16
7 2'OH DAB	- 73 ± 5	- 40 ± 4

Tableau 9 : Moyennes des angles dièdres des 20 structures de plus basse énergie

La répartition de ces moyennes est représentée sur le diagramme de Ramachandran sur la Figure 45.

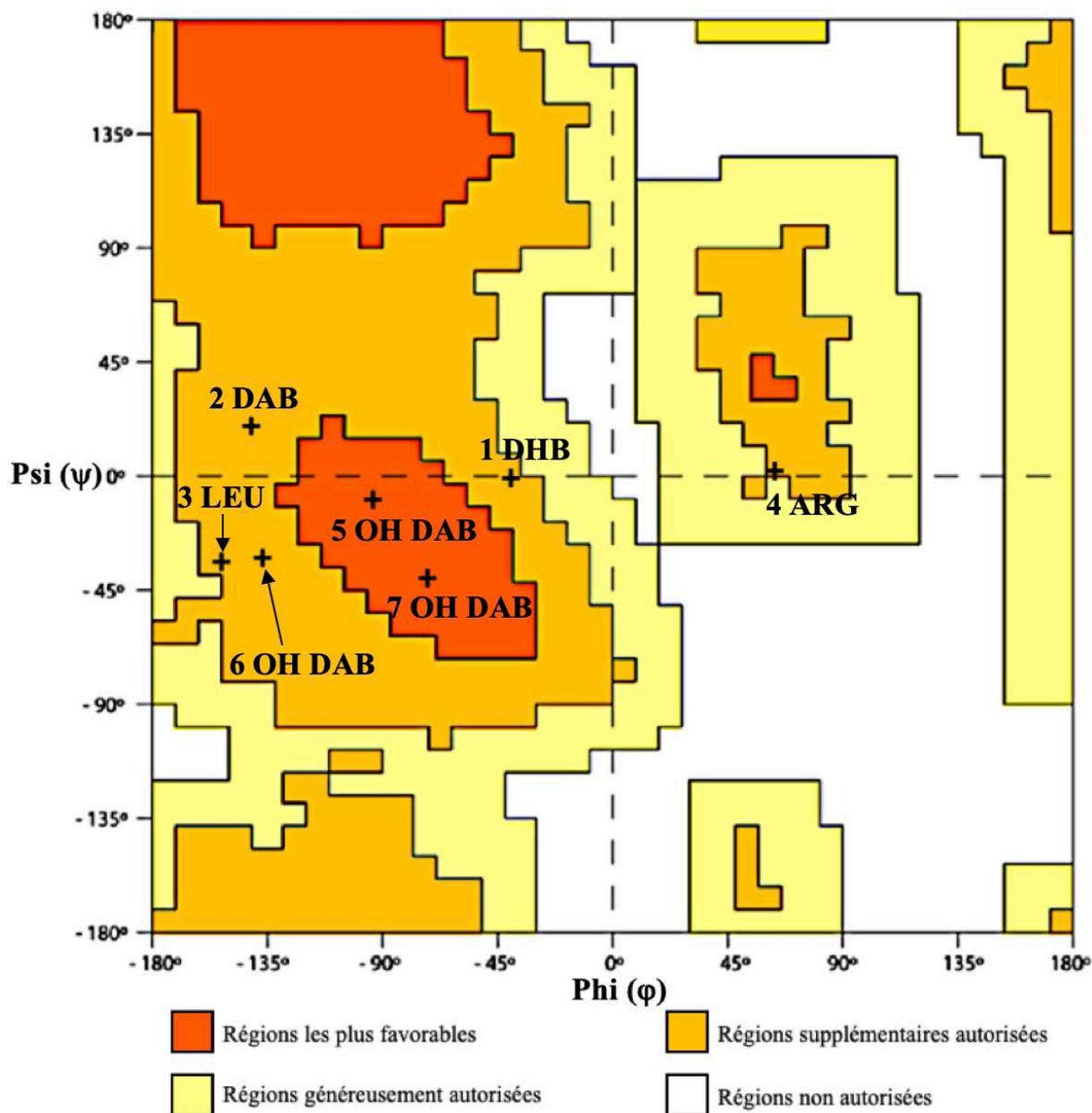


Figure 45 : Diagramme de Ramachandran de la moyenne des 20 structures de plus basse énergie de l'altérine980 en présence de micelles de LPS

Les données concernant la structure tridimensionnelle de l'altérine980 sont résumées dans le Tableau 10. Celui-ci comprend le nombre total de Tr-NOE utilisé (Tr-NOE ambigu / non ambigu et intra-résidu). Il comprend également la distribution des angles dièdres sur le diagramme de Ramachandran et les valeurs de RMSD obtenues sur le squelette heptapeptidique et l'ensemble des atomes lourds.

<u>Contraintes de distances</u>	
Total :	71
Non ambiguës :	43
Ambiguës :	28
Intra-résidu :	11
<u>Violations des contraintes</u>	
Violations de distances > 0.3 Å	0
<u>Diagramme de Ramachandran</u>	
Régions les plus favorables	28,6 %
Régions supplémentaires autorisées	71,4 %
Régions généreusement autorisées	0 %
Régions non autorisées	0 %
<u>RMSD (Å)</u>	
Atome du Squelette	0,135
Atomes lourds du peptide sans la chaîne grasse (C/O/N)	0,700

Tableau 10 : Résumé des données structurales et des statistiques de l'altérine980 en présence de micelles de LPS

4 Discussion

Dans cette partie de thèse nous nous sommes intéressés à un peptide antimicrobien, l'altérine980, produit par deux souches de bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* étroitement liées phylogénétiquement.

Nous discutons ici de la structure chimique, des résultats d'activités antibactériennes, des propriétés de liaison au LPS ainsi que de la structure tridimensionnelle de l'altérine980 et les comparons à la polymyxine B (PMB) considérée comme le « gold standard ».

La structure chimique de l'altérine980 présente de nombreuses similitudes avec celle de la PMB. En effet, l'altérine980 est un cyclolipopeptide constitué d'un cycle heptapeptidique relié par une liaison amide à une chaîne grasse. Le cycle heptapeptidique présente une charge positive fortement marqué (+4) avec une partie très polaire constituée des chaînes latérales cationiques de deux OH-Dab, d'une Arg et du résidu Dab. Cette dernière chaîne positive se situe entre deux résidus hydrophobes à savoir la Leu et le Dhb. L'altérine980 est composé d'une chaîne grasse de 12 carbones présentant une insaturation en position 5 (Figure 46).

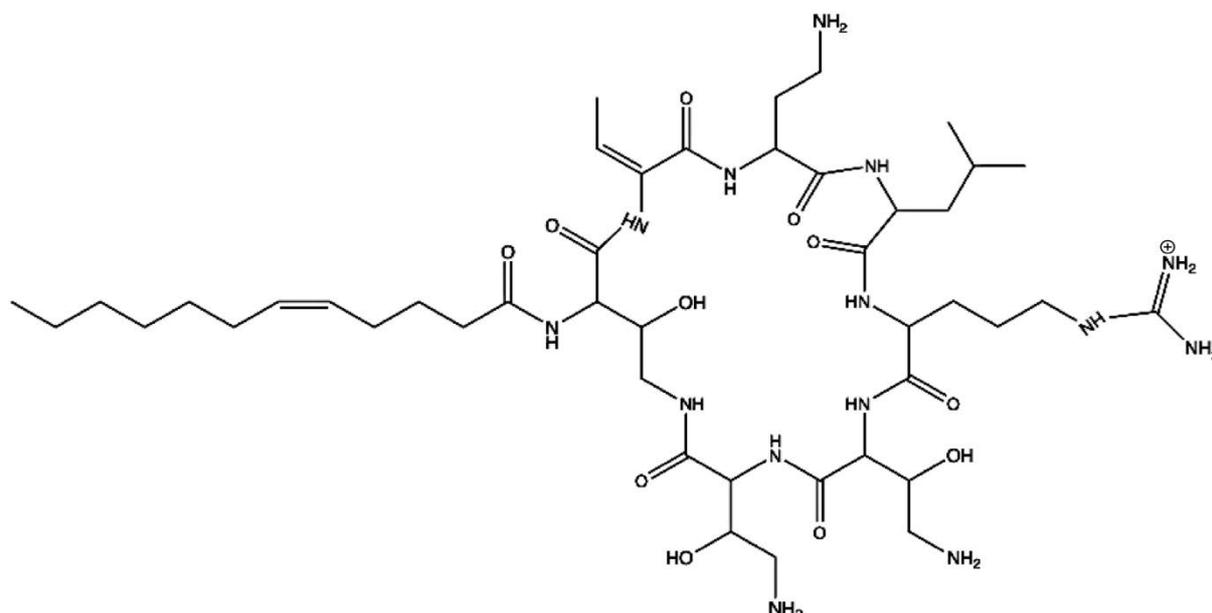


Figure 46 : Structure chimique de l'altérine980³¹⁵

La polymyxine B est un décapeptide constitué d'un cycle heptapeptidique sur lequel est greffée une chaîne latérale de trois acides aminés suivis d'une chaîne grasse liée par une liaison amide. La charge cationique de la polymyxine B est associée aux chaînes latérales de cinq résidus Dab (Figure 47).

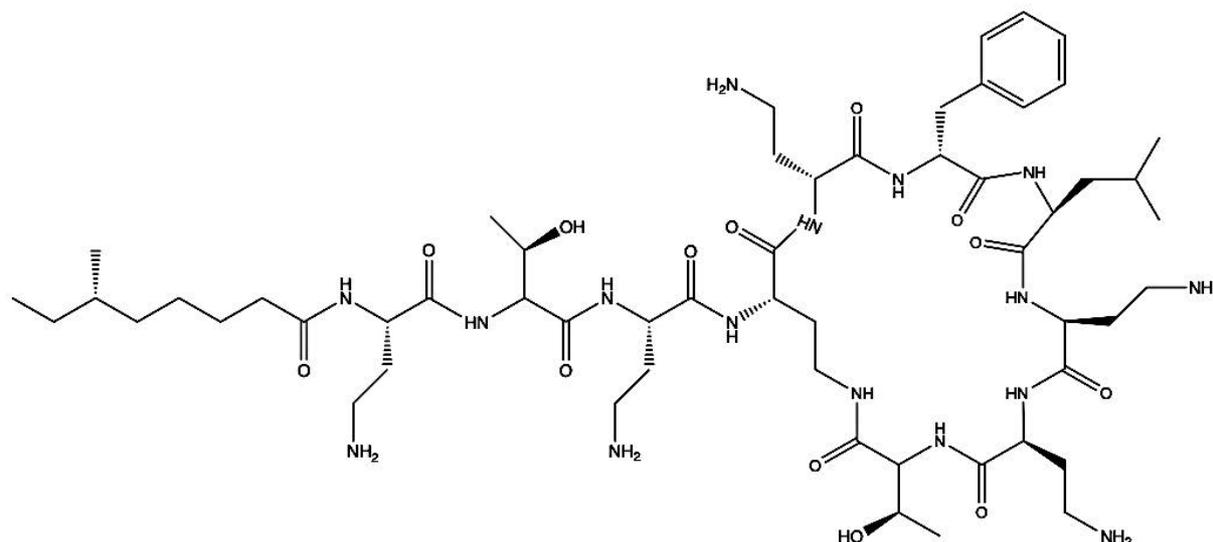


Figure 47 : Structure chimique de la PMB. D'après Avedissian, 2019⁸³

Bien que ces deux peptides présentent sur leur squelette heptapeptidique le même nombre de résidus hydrophobes et par conséquent le même nombre de résidus polaires, l'agencement de ces résidus est légèrement différent. Nous avons vu dans le cas de l'altérine980 que l'un des résidus OH-Dab se situe entre les deux résidus hydrophobes alors que dans le cas de la PMB, les deux résidus hydrophobes sont côte à côte. Sur la structure chimique de la PMB, on distingue bien le secteur polaire et le secteur hydrophobe. La répartition des charges est également différente. En effet, contrairement à l'altérine980 qui possède l'ensemble de ses charges cationiques sur le cycle heptapeptidique, la PMB présente une répartition plus homogène avec trois charges cationiques sur son cycle heptapeptidique et deux autres sur sa chaîne latérale. Avec une chaîne grasse de 8 carbones, la PMB présente une chaîne grasse plus courte que celle de l'altérine980.

Au-delà de la structure chimique, les tests d'activités antibactériennes réalisés au laboratoire de Quimper sur une large gamme de bactéries à Gram négatif ont révélé que l'altérine980 et la polymyxine B présentent un spectre d'activité qui est relativement voisin. En effet, ces deux peptides antimicrobiens sont actifs contre l'intégralité des bactéries de l'étude hormis les souches productrices de *Pseudoalteromonas* hCg-6 et hCg-42 ainsi que *V. tapeti* CECT 4600.

Les CMI déterminées sont globalement semblables excepté pour *V. harveyi* ORM4 et *V. parahaemolyticus* 13-028A/3. Concernant la souche de *V. harveyi* ORM4, une CMI beaucoup plus faible a été mesurée pour l'altérine980 par rapport à la PMB. Pour la souche de *V. parahaemolyticus* aucune activité de la PMB n'a été décelée à une concentration jusqu'à 100 μM alors que l'altérine980 permet une inhibition totale de cette souche à seulement 6,25 μM (Tableau 11).

		CMI (μM)	
		Altérine980	Polymyxine B
<i>A. caviae</i>	CIP 7616	5,8	3,1
<i>A. hydrophila</i>	CIP 7614	2,9	0,8
<i>E. coli</i>	ML35	1,5	3,1
<i>E. coli</i>	SBS363	0,4	0,2
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	23	1,6
<i>Pseudoalteromonas</i>	hCg-6	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i>	hCg-42	-	-
<i>S. enterica</i>	CIP 8297	1,4	0,8
<i>V. harveyi</i>	ORM4	1,4	25
<i>V. parahaemolyticus</i>	13-028A/3	6,25	-
<i>V. tapetis</i>	CECT 4600 ^T	-	-
<i>V. tasmaniensis</i>	LGP 32	2,9	3
<i>Y. ruckeri</i>	ATCC 29473	0,4	0,4

Tableau 11 : CMI obtenues pour l'altérine980 et la PMB contre une sélection de 11 bactéries Gram négatif

Nous avons vu précédemment dans l'introduction que les tests LAL et SPR réalisés à Quimper ont permis de mettre en évidence les propriétés de liaison des Altérines au LPS. De plus nous avons aussi vu que l'activité antibactérienne semble être corrélée avec l'aptitude du peptide à se lier au LPS. De ce fait, il est particulièrement intéressant de s'intéresser à la structure des Altérines en présence de micelles de LPS. Par conséquent, la méthode du Tr-NOESY a été utilisée afin de déterminer la structure tridimensionnelle de l'altérine980 en interaction avec des micelles de LPS. La structure déterminée dans les conditions de Tr-NOESY peut être comparée à celle de la PMB. En effet, l'altérine980 possède un comportement voisin de celui de la PMB puisque de manière similaire, aucune structure tridimensionnelle stable n'est observée dans l'eau pour ces deux peptides antimicrobiens. En revanche, en présence de micelles de LPS, nous avons pu déterminer la structure tridimensionnelle de l'altérine980 en utilisant la méthode du Tr-NOESY. Cette approche a été appliquée de nombreuses fois pour

déterminer la structure tridimensionnelle de la PMB connu pour se lier au LPS³¹⁹⁻³²². Elle a notamment été utilisée par Pristovsek et Kidric de manière à déterminer la structure de la PMB lié au LPS³²¹. En se basant sur cette structure, Velkov *et al.* ont établi un modèle moléculaire du complexe PMB – LPS (Figure 48)³³⁰. Sur ce modèle, composant polaire et apolaire sont disposés dans des directions opposés. En effet, les deux résidus hydrophobes 6-Phe et 7-Leu sont séparés des résidus polaires chargés 4-Dab, 5-Dab, 8-Dab et 9-Dab. Dans le modèle présenté, la chaîne grasse de la PMB et les deux résidus hydrophobes 6-Phe et 7-Leu (jaune) s’insèrent dans la partie lipidique du LPS tandis que les groupements NH₂ des résidus Dab (1-Dab, 5-Dab, 8-Dab et 9-Dab) sont en contact avec les deux groupements phosphates (rose) du lipide A.

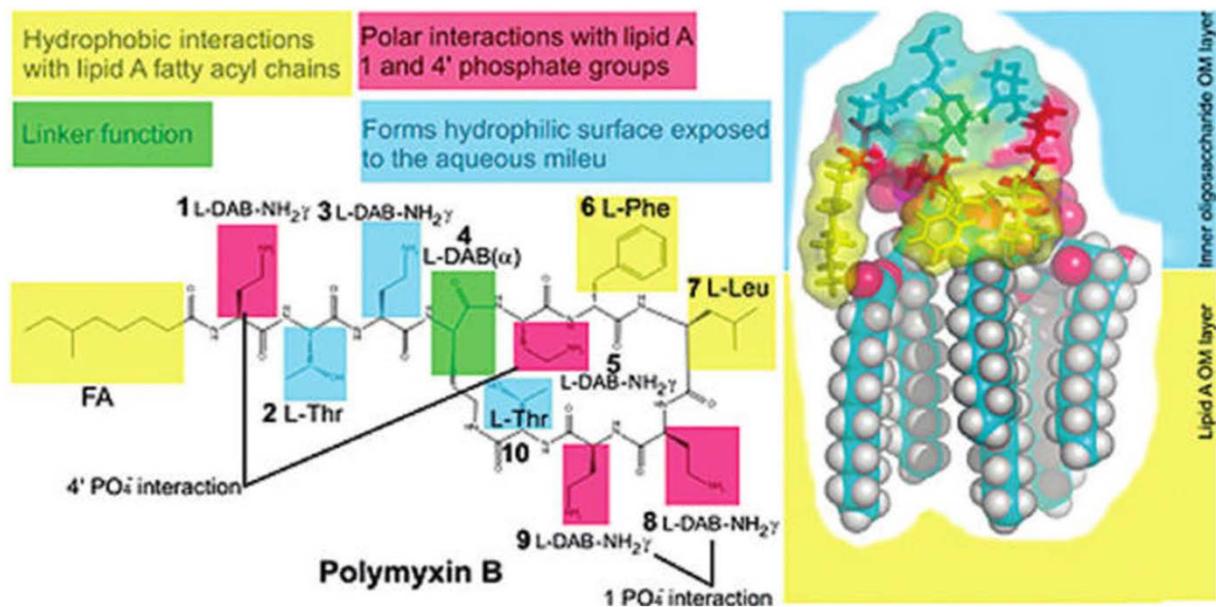


Figure 48 : Schéma illustrant les zones impliquées dans le complexe PMB – LPS. D’après Velkov, 2010³³⁰

La structure du complexe PMB – LPS déterminée par Pristovsek et Kidric est similaire à celle proposé par Mares *et al*³¹⁹. Ces derniers ont étudié par RMN l’interaction de la PMB avec le LPS d’une souche mutante de *E. Coli* incorporé dans des micelles de DPC de manière à mimer le plus efficacement possible la membrane externe d’une bactérie à Gram-négatif. Ces études soutiennent l’importance des interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes entre la PMB et le LPS.

La structure avec une haute résolution de la PMB en présence de LPS a récemment été reportée par Swarbrick *et al.*(Figure 49)³²². La détermination structurale de peptide via l’utilisation du

Tr-NOE souffrant parfois d'une faible dispersion des signaux puisque l'on observe les signaux de la forme libre en excès. Pour contourner cette limitation, ils ont utilisé un complexe de lanthanide paramagnétique (thulium) de façon à induire une modification des déplacements chimiques ^1H de la PMB. Ils ont ainsi augmenté l'éclatement spectral de la forme libre et donc mesuré un plus grand nombre de contraintes de distance ce qui les a conduits à déterminer la première structure RMN haute résolution de la PMB dans son état lié au LPS. La structure qu'ils ont déterminée forme une spirale dans laquelle les chaînes latérales hydrophobes sont orientées vers la partie lipidique du LPS tandis que les chaînes latérales cationiques Dab6 et Dab9 sont en interaction électrostatique avec les groupes phosphates du lipide A. Cette dernière observation est confirmée par la distance entre les chaînes latérales Dab6 et Dab9 qui correspond à la distance entre les groupes phosphates du LPS³²². Dans le cas de l'altérine980 en présence de micelles de LPS, la structure cyclique est régie par un β -turn de type II clairement définie.

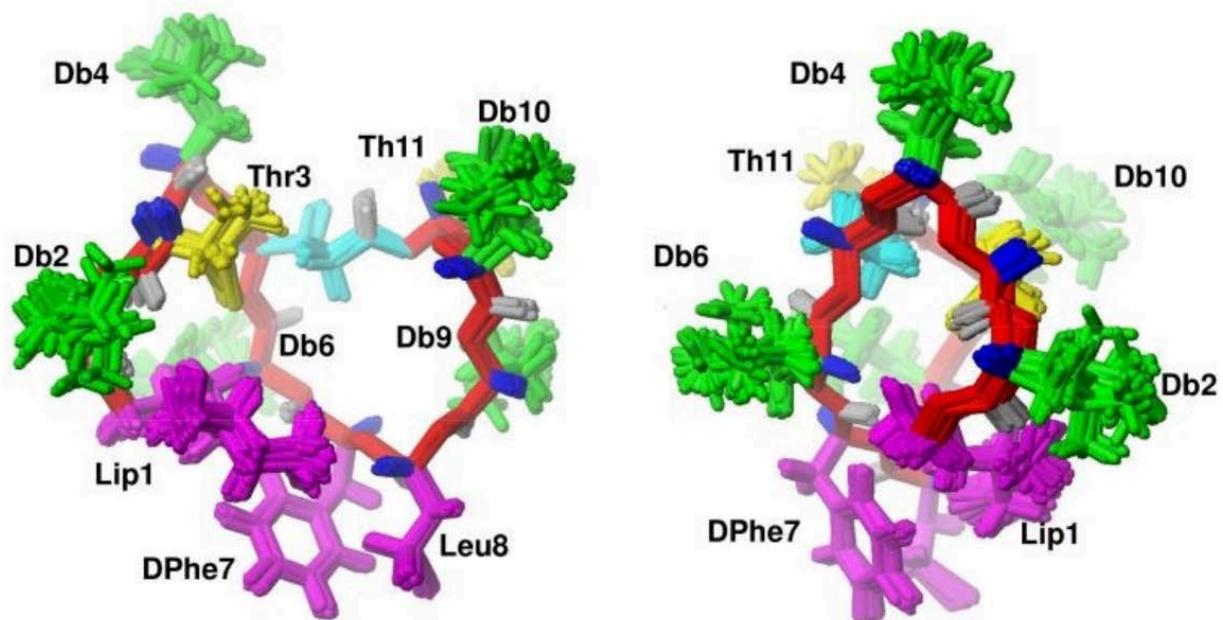


Figure 49 : Superposition des 20 structures de la PMB sous deux angles de vues pivotées de 90 degrés. Rouge : squelette de la PMB, cyan : cyclisation (résidus 3 et 11), magenta : partie hydrophobe, jaune : thréonines, vert : Dab. D'après Swarbrick, 2020³²²

La majorité des peptides antimicrobiens cationiques adoptent une structure amphipathique au contact des membranes. C'est notamment le cas de la structure cyclique de la PMB qui est courbée en forme d'enveloppe séparant les chaînes latérales des deux résidus hydrophobes Phe-6 et Leu-7 des trois résidus polaires chargés comprenant les résidus Dab 5, 8 et 9. Ainsi, la PMB présente une structure tridimensionnelle affichant un caractère amphipathique clairement défini

qui est nécessaire à son activité antimicrobienne³¹⁹⁻³²². Concernant l'altérine980, elle présente une structure tridimensionnelle avec une partie polaire chargée bien définie par la présence des chaînes latérales cationiques de deux OH-Dab (5- et 6- OH-Dab) et du résidu 4-Arg, néanmoins la partie hydrophobe est moins bien définie par la présence du résidu polaire 2-Dab qui se situe entre les deux résidus hydrophobes 1-Dhb et 3-Leu. Nous pouvons tout de même observer un secteur hydrophobe qui est principalement défini par la chaîne grasse et la chaîne latérale du résidu 3-Leu. Par conséquent, il semblerait que l'altérine980 adopte une structure tridimensionnelle présentant un caractère amphipathique qui est relativement moins prononcé que celui de la PMB. Néanmoins, la carte de surface de potentiel électrostatique n'a pas été déterminée.

Bien que le caractère amphipathique soit moins bien marqué pour l'altérine980, le mécanisme d'action semble être similaire à celui proposé pour la PMB. En effet, le mode d'action proposé pour la PMB comprend des interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes. Il est suggéré que les chaînes latérales des résidus Dab (chargé positivement) sont en contact avec les groupements phosphates des disaccharides du lipide A (chargé négativement) et que les régions hydrophobes comprenant l'extrémité de la chaîne latérale ainsi que les deux résidus hydrophobes (6-Phe et 7-Leu) de la PMB interagissent avec les chaînes grasses du lipide A³¹⁹⁻³²². Un tel mécanisme d'action peut sans aucun doute correspondre pour l'altérine980. Un calcul de docking moléculaire (non réalisé) aurait permis d'apporter de plus amples renseignements sur la liaison de l'altérine980 au LPS. Néanmoins, il a été démontré par le test LAL réalisé à quimper que l'altérine954 et l'altérine980 présentent un profil de liaison semblable à celui de la PMB. De plus, les expériences RMN que nous avons réalisées mettent en évidence une forte interaction entre l'altérine980 et les micelles de LPS. L'apparition d'un élargissement significatif des pics sur les spectres RMN 1D ¹H à de très faible concentration en LPS témoigne de cette forte interaction. De surcroît, la présence de nombreux pics croisés négatifs sur les spectres Tr-NOESY nous permet de certifier que l'altérine980 se lie au LPS. Ainsi, l'altérine980 tout comme la PMB se lie au LPS avec une forte affinité. Des affinités peptides-LPS de l'ordre du μ M, souvent été reportés dans la littérature, sont compatibles avec nos observations. Toutefois, une détermination expérimentales des affinités des altérines serait intéressante³³¹. Cependant, bien que l'interaction entre ces deux peptides et le LPS soit extrêmement élevée, celle-ci demeurent dynamique permettant donc de satisfaire la condition essentielle du Tr-NOESY. En effet, comme nous l'avons évoqué cette méthode nécessite obligatoirement un échange rapide (k_{off} grand) entre la forme libre et la forme complexée. Dans

le cas où l'échange entre la forme libre et la forme complexée n'était pas suffisamment rapide (k_{off} petit) il y aurait une diminution des signaux et l'absence de pics NOE.

Des différences d'activités antimicrobiennes relevées entre les Altérines pour une même souche bactérienne proviennent uniquement de la nature de la chaîne grasse. Ce qui nous amène à penser que le cycle peptidique confère aux Altérines l'aptitude à interagir avec le LPS par des interactions électrostatiques et que la chaîne grasse s'insérant dans la bicouche est responsable de la perméabilisation de la membrane bactérienne au moyen de fortes interactions hydrophobes. Cette chronologie des interactions est en parfait accord avec la suggestion de Bhattacharjya concernant la PMB³²⁰. Nous pouvons donc affirmer avec certitude que l'altérine980 est un peptide antimicrobien de liaison au LPS au même titre que la PMB ou encore la gramicidine S évoqué précédemment. Il apparaît donc que l'altérine980 et la PMB se lient aux molécules de LPS des bactéries à Gram négatif ce qui engendre un déplacement des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} ^{163,164}. Ils s'insèrent ensuite au sein du lipide A au moyen de leur domaine hydrophobe provoquant la perméabilisation de la membrane puis la lyse de la bactérie. Concernant les différences significatives d'activités de l'altérine980 et de la PMB sur certaines souches de vibrio telles que *V. parahaemolyticus* 13-028A/3, elles peuvent éventuellement s'expliquer par la différence de répartition des charges cationiques, de la longueur de la chaîne grasse et du degré d'amphipaticité de ces deux peptides.

La résistance des souches productrices de *Pseudoalteromonas* (hCg-6 et hCg-42) à la PMB, ainsi qu'à l'altérine980 indique que la structure du LPS présent à la surface de la membrane externe des souches productrices a probablement une structure différente. Il serait donc très intéressant de caractériser la structure du LPS de souches résistantes telles que le LPS des *Pseudoalteromonas* producteurs et de souches sensibles et ainsi de définir si les variations d'efficacité des peptides sont associées à des différences d'affinité des peptides pour le LPS ou une plus grande stabilité de la membrane externe. Ces caractérisations permettraient d'obtenir de plus amples renseignements sur l'interaction entre les Altérines et le LPS. De tels travaux seront bientôt effectués au laboratoire.

Chapitre II - Étude structurale de pseudopeptides

1 Introduction

L'utilisation des peptides antimicrobiens est limitée en raison d'une dégradation relativement rapide par les protéases réduisant fortement leurs disponibilités *in vivo*³³². L'équipe de M. Baudy Floc'h (ISCR) a donc développé la synthèse d'aza- β^3 -amino-acides correspondant à des analogues d'acides aminés naturels¹³⁻¹⁷. L'incorporation de résidu aza- β^3 permet de diminuer la reconnaissance par les protéases et donc d'améliorer la durée de vie¹². C'est pendant sa thèse que M. Laurencin avait synthétisé les premiers aza- β^3 -peptides présentant des propriétés antimicrobiennes¹⁵⁰.

1.1 L'origine des pseudopeptides étudiés

Il a été mentionné précédemment que certains peptides antimicrobiens peuvent être produits par des micro-organismes tels que des bactéries³³³. De manière générale les PAM procurent au producteur un moyen de lutte contre les autres pathogènes. Néanmoins, plusieurs bactéries produisent des PAM toxiques via des systèmes toxine-antitoxine (STA)³³⁴. Ces derniers présents sur les plasmides et les chromosomes correspondent à des systèmes de mort autoprogrammée. Ils présentent deux composants à savoir une toxine stable qui lorsqu'elle est surexprimée tue la bactérie et d'une antitoxine instable neutralisant l'action de la toxine^{335,336}. Lorsque l'antitoxine est dégradée, l'action de la toxine est favorisée provoquant l'inhibition de certains processus vitaux tels que la réplication de l'ADN. Par conséquent, la bactérie doit exprimer en permanence l'antitoxine de manière à neutraliser l'effet de la toxine. Les systèmes toxine-antitoxine sont répartis en 6 classes créés en fonction de la nature et du mode d'action de l'antitoxine. Les types I et III correspondent aux antitoxines de type ARN tandis que les quatre autres types sont associés aux antitoxines de type protéiques³³⁷. Il a été identifié chez *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), bactérie pathogène pour l'Homme des paires de TA de type I codant pour des peptides toxiques hydrophobes tel que le PepA1. Ce peptide linéaire composé de 30 résidus cause la mort de *S. aureus* mais provoque également à des concentrations équivalentes la lyse des érythrocytes humains³³⁴.

Sur la base des travaux réalisés précédemment lors d'une collaboration entre les groupes de M. Baudy Floc'h (ISCR) et de B. Felden (U1230), le PepA1 à la fois bactéricide et hémolytique

avait été modifié dans le but d'obtenir des peptides présentant une activité antimicrobienne améliorée et une cytotoxicité pour les cellules humaines fortement diminuée^{11,334}. Parmi les nombreux peptides qui avait été synthétisés, 4 pseudopeptides cycliques biomimétiques ont été retenues, mimant une fraction de la séquence peptidique de la toxine bactérienne (PepA1) (Figure 50) (Tableau 12)¹¹.

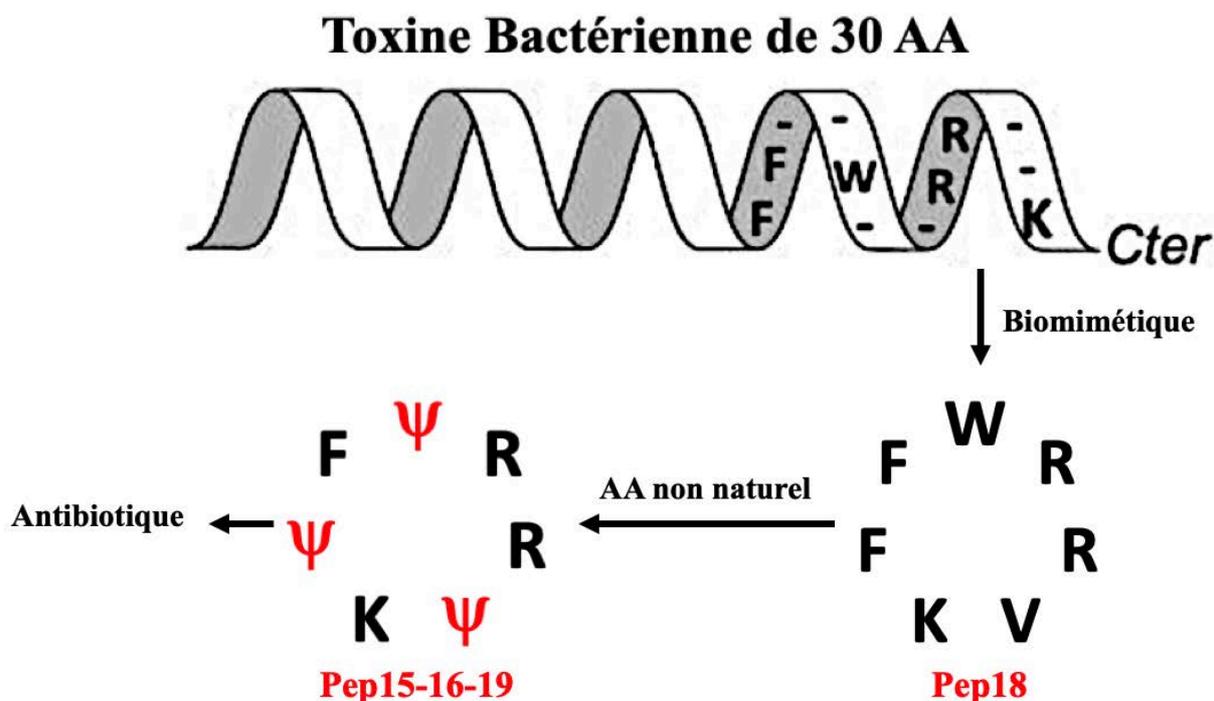


Figure 50 : Conception de 4 pseudopeptides cycliques biomimétiques à partir de la toxine bactérienne PepA1. Des résidus non naturels (ψ) ont été introduits dans la synthèse des Pep15-16-19. D'après Nicolas, 2019¹¹

Pseudopeptides	Séquences
Pep15	c(Ψ 2-Nal-F- Ψ 2-Nal-RR- Ψ Hyt-K)
Pep16	c(Ψ 2-Nal-F- Ψ 2-Nal-RR- Ψ V-K)
Pep18	c(FFWRRVK)
Pep19	c(Ψ 1-Nal-F- Ψ 1-Nal-RRVK)

Tableau 12 : Séquences des 4 pseudopeptides étudiés - (ψ) résidu aza- β^3 - (Nal) naphthylalanine - (F) phénylalanine - (R) arginine - (Hyt) hydroxylthreonine - (K) lysine - (V) valine - (W) tryptophane. D'après Nicolas, 2019¹¹

Les 4 structures chimiques sont présentées Figure 51.

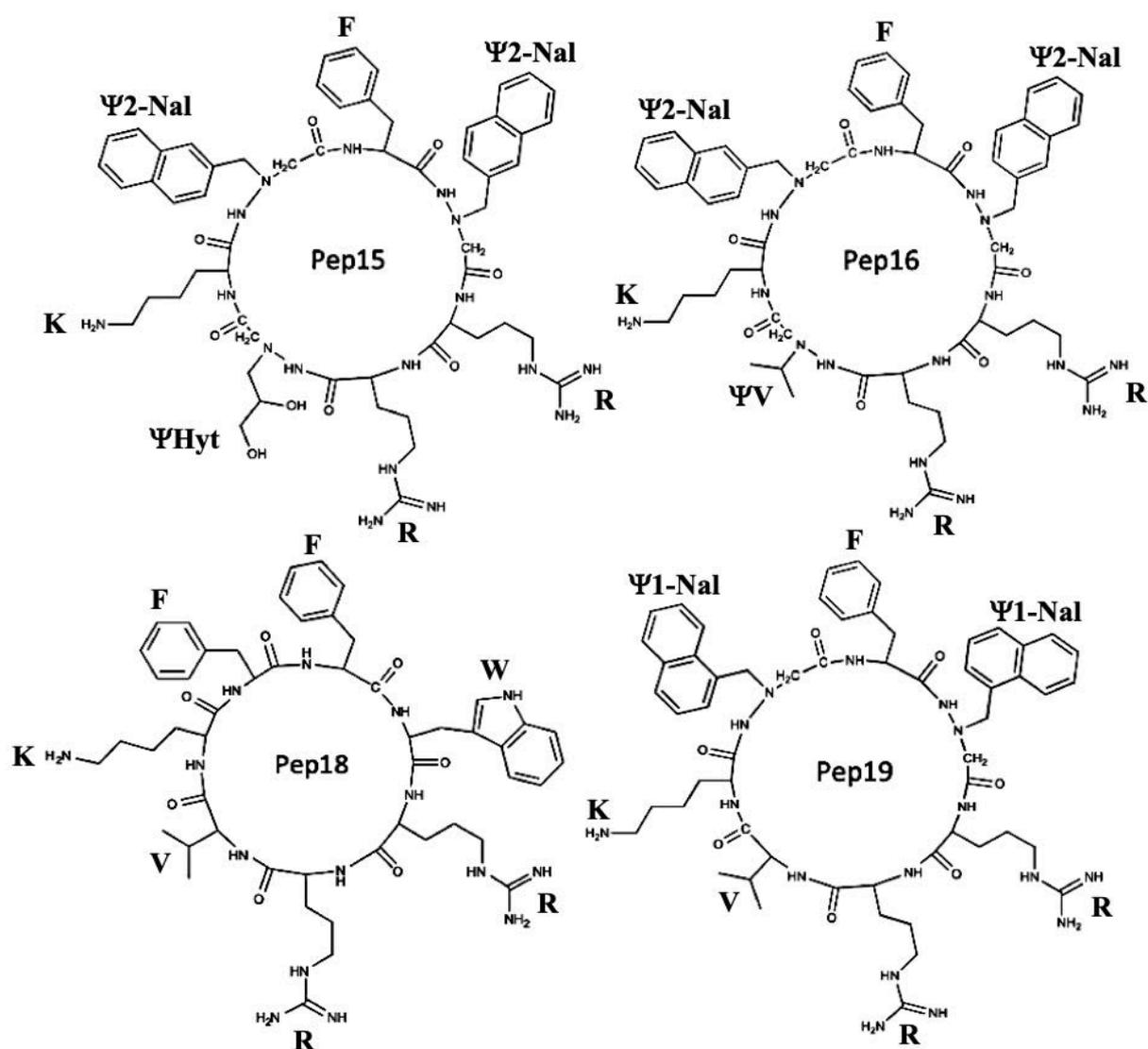


Figure 51 : Structures chimiques des 4 pseudopeptides. D'après Nicolas, 2019¹¹

Seul le Pep18 est composé entièrement d'acides aminés naturels. Les Pep15, Pep16 et Pep19 présentent soit deux soit trois résidus aza-β³ (Figure 51).

1.2 Les activités antibactériennes

B. Felden et son équipe ont testé l'activité des peptides (Pep15, Pep16, Pep18 et Pep19) contre une large gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif incluant également des souches bactériennes multiresistantes. Les tests ont révélé qu'ils étaient actifs contre l'ensemble des bactéries de l'étude. Néanmoins, les pseudopeptides Pep15, Pep16 et Pep19 contenant des résidus aza-β³ ont montré une activité antimicrobienne plus élevée que le Pep18 qui est composé exclusivement d'acides aminés protéinogènes¹¹. En effet, il a été démontré que la présence de

résidu aza- β^3 améliore l'efficacité des peptides antimicrobiens, notamment en raison d'une meilleure résistance à l'hydrolyse^{11,16,17}.

Le développement d'une résistance au Pep18 et aux 3 pseudopeptides a également été testée sur une durée de 2 semaines en utilisant des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI). La rifampicine et la fosfomycine sont deux médicaments qui ont été utilisés comme témoins de résistance. A l'issue de ces 2 semaines, la CMI de la fosfomycine été multipliée par un facteur 1000 à 2000 pour *P. aeruginosa* et *E. coli* alors que celle de la rifampicine sur *S. aureus* été multipliée par 30000. Les CMI des 4 peptides testées sur *S. aureus* sensible à la méthiciline, *S. aureus* multi-résistante (MRSA), *E. coli* et *P. aeruginosa* sont restées relativement proches des valeurs de CMI initiales¹¹.

Parmi les souches testées, seules quelques-unes ont développé de minimes résistances contre les pseudopeptides de l'étude présentant des résidus aza- β^3 (Pep15, Pep16 et Pep19). En revanche, en ce qui concerne le Pep18, les souches testées ont toutes développées des résistances à l'exception de la souche de *P. aeruginosa*. Il semblerait donc que la présence de résidus aza- β^3 induise une atténuation du développement de la résistance. Néanmoins, le développement d'une résistance aux Pep16 et Pep19 a également été contrôlé chez la souris après une infection systémique ou cutanée par une souche de *S. aureus* multi-résistantes. Les résultats indiquent qu'aucune résistance notable n'a été développée contre les deux pseudopeptides testés¹¹.

De faibles toxicités pour les Pep16 et Pep19 ont été déterminées sur des cellules humaines (érythrocytes et cellules rénales). La Figure 52 montre les pourcentages de survies des cellules humaines (érythrocytes et rénales) et des cellules bactériennes de *S. aureus* multi-résistantes en fonction de la concentration en Pep16 ou en Pep19¹¹. En effet, plus *S. aureus* prolifère plus le milieu de culture devient trouble. La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm permet d'évaluer cette turbidité en mesurant la lumière absorbée par la suspension bactérienne de *S. aureus*.

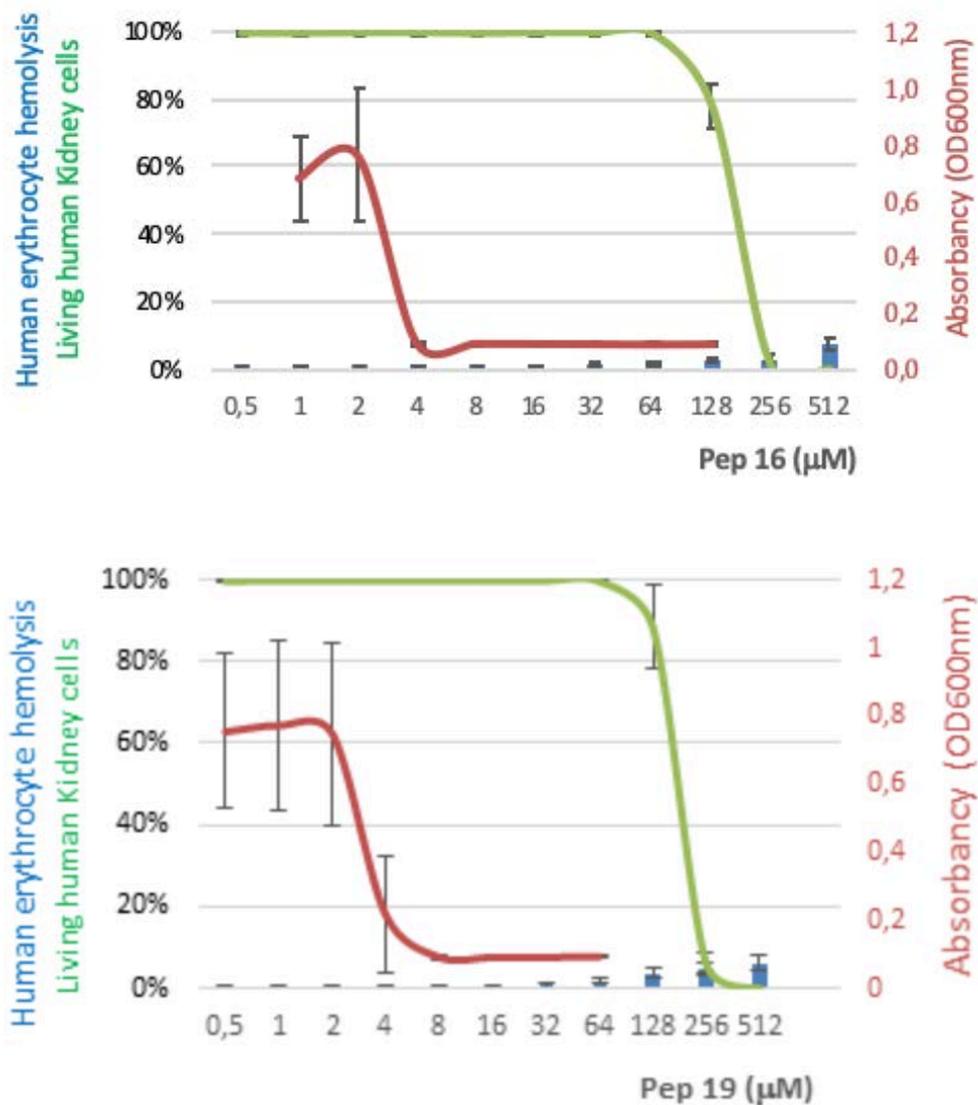


Figure 52 : Activité antimicrobienne du Pep16 et du Pep19 contre *S. aureus* (rouge) – Toxicité du Pep16 et du Pep19 sur les érythrocytes humains (bleu) et les cellules rénales humaines (vert). D'après Nicolas, 2019¹¹

La Figure 52 montre que les concentrations auxquelles ces deux pseudopeptides deviennent toxiques pour les cellules humaines sont beaucoup plus élevées que les concentrations bactéricides pour *S. aureus*.

2 Objectif

Lors de mon arrivée en thèse, les structures tridimensionnelles du Pep18 composé uniquement d'acides aminés naturels et du Pep19 présentant 2 résidus aza- β^3 avaient déjà été déterminées dans un environnement micellaire à base de détergent (SDS) (Figure 84)¹¹.

L'objectif de mon travail a été de caractériser la structure tridimensionnelle de PAM dans divers environnements plus proches de véritables membranes. La couche externe des membranes bactériennes est recouverte de glycoconjugués représentant la première barrière pour toutes les interactions avec l'extérieur de la cellule. Cette couche externe connue sous le nom de glycocalix est impliquée dans la sélection des molécules atteignant la membrane cytoplasmique³³⁸. Le feuillet externe des bactéries à Gram négatif est majoritairement composé de LPS^{121,122}. Par conséquent, pour mimer la première interaction des peptides antimicrobiens avec le feuillet externe des bactéries à Gram négatif nous avons utilisé du LPS qui forme facilement des micelles de haut poids moléculaire en solution^{10,122,203,319-322}. Après avoir franchie cette première barrière, les PAM doivent interagir avec la membrane cytoplasmique pour conduire à la mort de la bactérie. La membrane cytoplasmique des bactéries correspond à une bicouche phospholipidique anionique. Ainsi, pour mimer cette seconde interaction nous avons utilisé de petites vésicules unilamellaires (SUV) anioniques¹⁵⁴. Dans certains cas, les PAM peuvent présenter une toxicité pour les cellules humaines en raison d'une interaction hydrophobe aspécifique¹⁶⁶. Pour mimer la membrane des eucaryotes composée d'une bicouche lipidique de charge globale neutre nous avons utilisés des SUV zwitterioniques¹⁵⁴.

La finalité de ce travail est d'apporter une contribution dans la caractérisation des relations qui existent entre les PAM et les bactéries. Pour cela, je commencerai par présenter la structure chimique des peptides étudiés au cours de ma thèse, (Pep18, Pep19 et Pep16) ainsi que la méthodologie d'attribution des déplacements chimiques ^1H réalisé dans l'eau. Je présenterai les structures tridimensionnelles obtenues sous contraintes de distances RMN par application du Tr-NOESY en fonction du modèle membranaire. Je discuterai ensuite des différences entre les structures afin de proposer un mode d'action.

3 Résultats

3.1 Structure chimique du Pep18

Le peptide, Pep18, est un heptapeptide cyclique composé de quatre résidus hydrophobes et de trois résidus polaires chargés positivement lui conférant donc un fort caractère cationique (+3) (Figure 53). Comme nous l'avons précisé précédemment, il est composé uniquement d'acides aminés protéinogènes. En effet, il comporte dans sa séquence deux phénylalanines (Phe), un tryptophane (Trp), deux arginines (Arg), une valine (Val) et une lysine (Lys). Il présente une partie hydrophobe constituée des chaînes latérales des deux phénylalanines et de celle du tryptophane suivi d'un secteur relativement polaire par la succession des deux arginines chargées positivement. Le quatrième résidu hydrophobe correspondant à la 6-Val se situe entre les résidus polaires cationiques 5-Arg et 7-Lys.

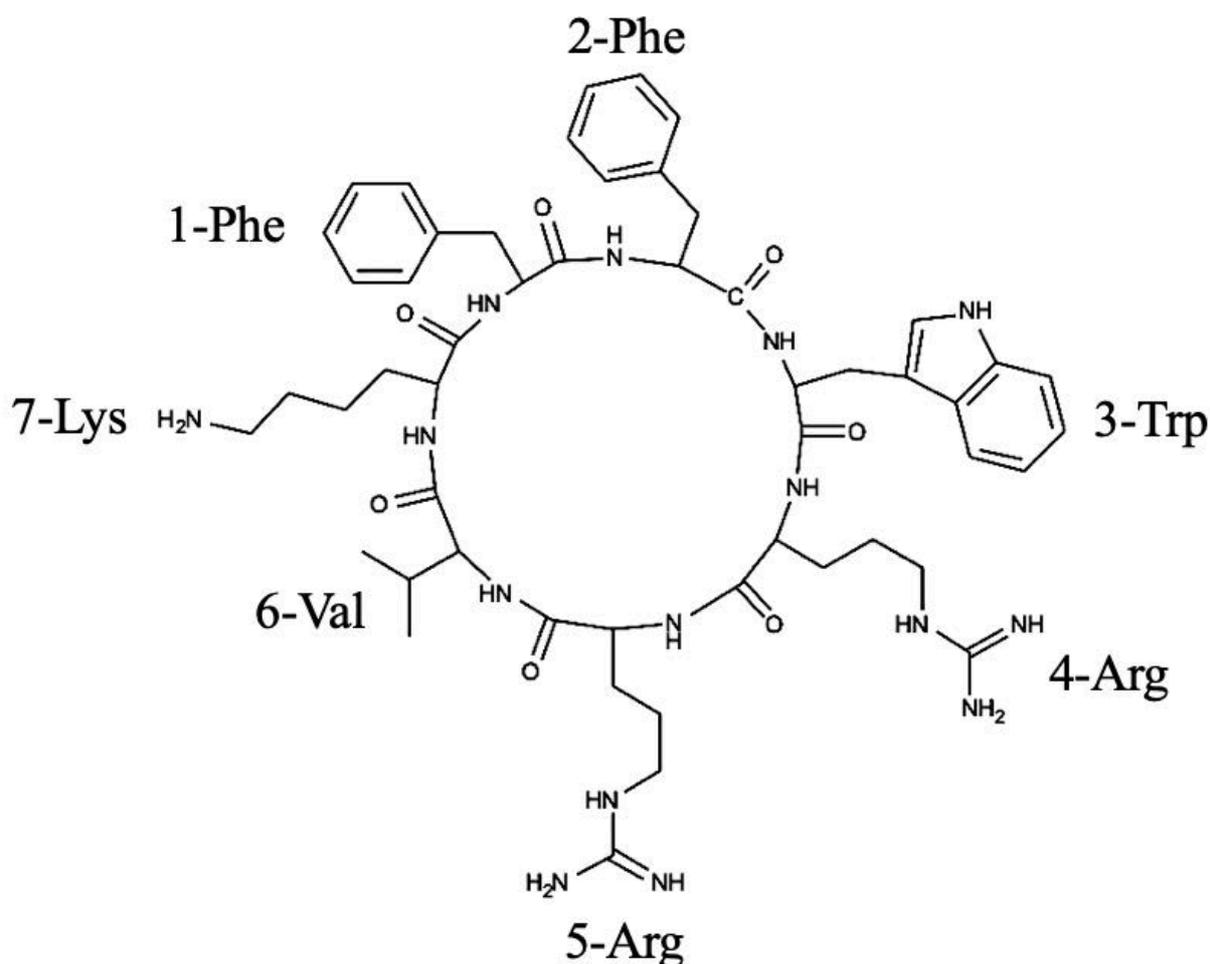


Figure 53 : Structure chimique du Pep18

3.2 Structure chimique du Pep19

Comme le Pep18, le pseudopeptide, Pep19, est un heptapeptide cyclique composé de quatre résidus hydrophobes et de trois résidus polaires chargés positivement lui conférant donc également un fort caractère cationique (+3) (Figure 54). La différence avec le Pep18 se situe au niveau des résidus 1 et 3. En effet, pour le Pep19, les résidus 1 et 3 sont des résidus non protéinogènes et correspondent à deux aza- β^3 -1-naphthylalanines. Les 5 autres acides aminés (une phénylalanine, deux arginines, une valine et une lysine) sont identiques au Pep18 et se situent aux mêmes positions dans la séquence. Par conséquent, la partie hydrophobe du Pep19 est constitué des chaînes latérales des deux résidus aza- β^3 et de celle de la phénylalanine qui est suivie du même secteur polaire que le Pep18 avec la succession des deux arginines chargées positivement.

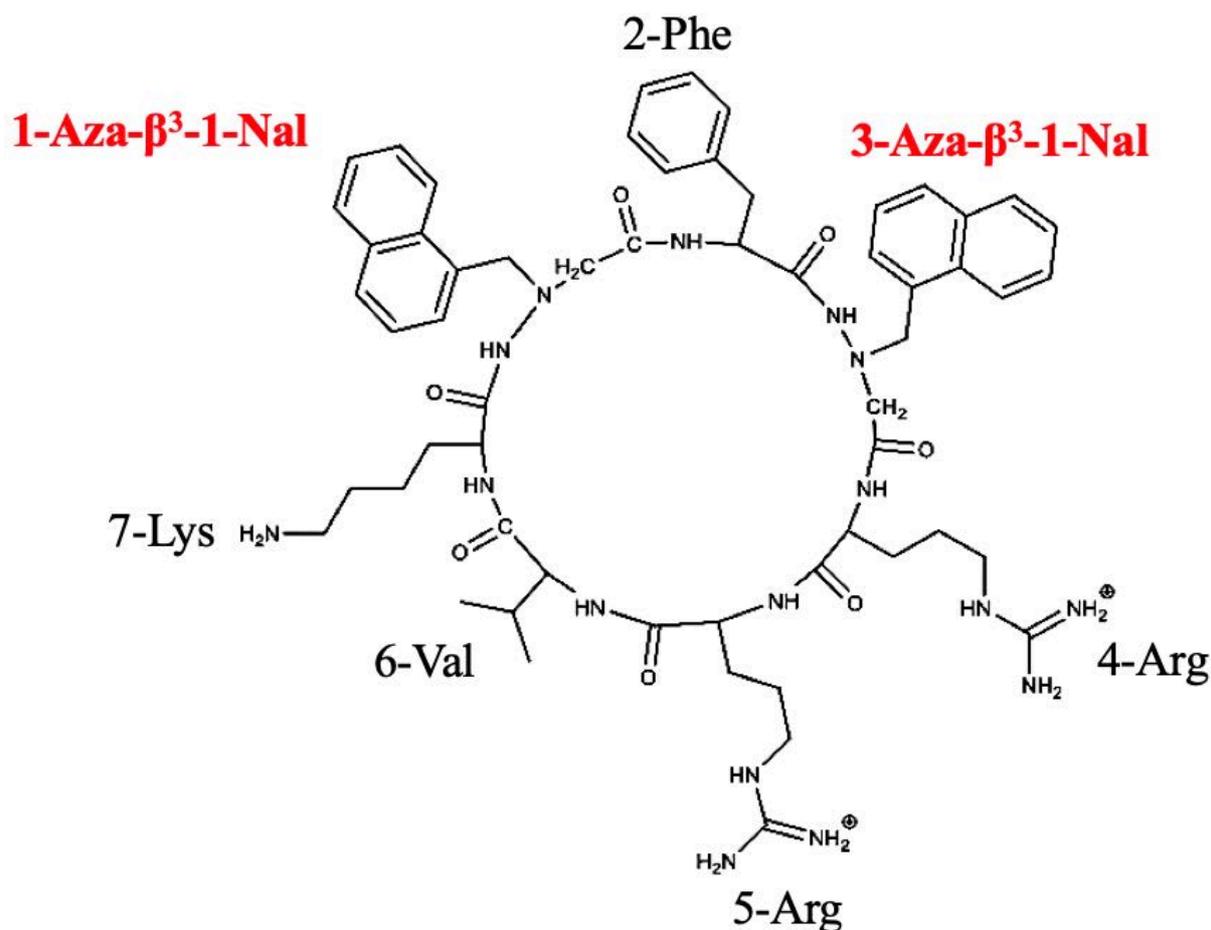


Figure 54 : Structure chimique du Pep19 avec les deux résidus aza- β^3 indiqués en rouge

3.3 Structure chimique du Pep16

Nous pouvons relever deux différences sur la structure chimique du Pep16 par rapport à celle du Pep19. Tout d'abord, l'introduction d'un troisième résidu aza- β^3 qui se situe entre l'arginine en position 5 (Arg-5) et la lysine en position 7 (Lys-7). Le résidu 6-Val des Pep18 et Pep19 devient donc un résidu 6-aza- β^3 -Val (Figure 55). Puis, contrairement au Pep19, présentant deux aza- β^3 -1-naphthylalanine en position 1 et 3, le Pep16 présente deux aza- β^3 -2-naphthylalanine aux mêmes positions dans la séquence (Figure 55).

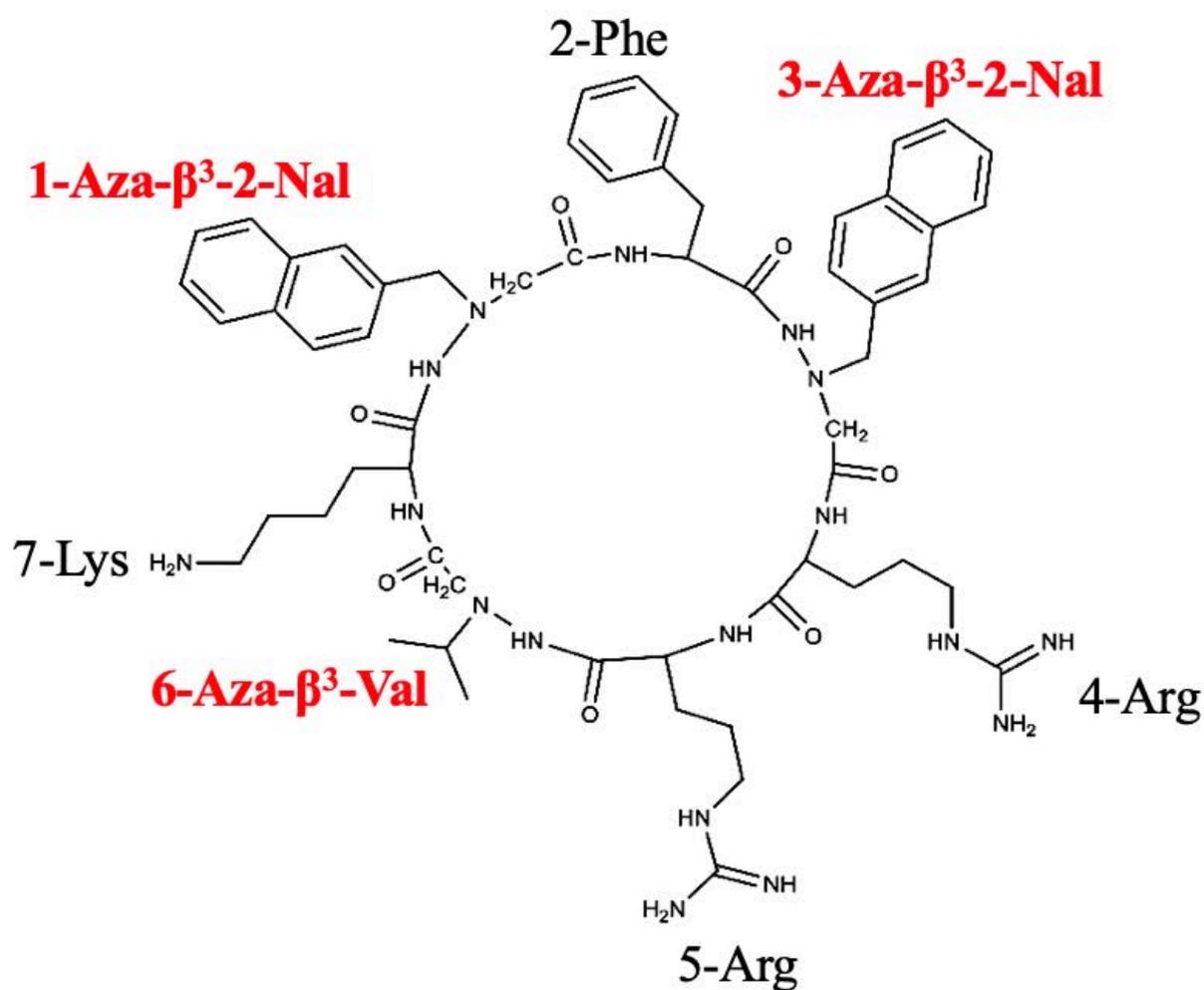


Figure 55 : Structure chimique du Pep16 avec les trois résidus aza- β^3 indiqués en rouge

3.4 Étude des peptides dans l'eau

Les Pep18, Pep19 et Pep16 possèdent tous les trois des masses moléculaires intermédiaires (de l'ordre de 1200 g/mol) et présentent donc un régime NOE nul à 500 MHz ce qui entraîne une absence totale de tâche de corrélation NOE sur les spectres 2D NOESY.

De plus, comme c'est souvent le cas avec la plupart des petits peptides antimicrobiens, aucune structure tridimensionnelle définie n'a été observée dans l'eau pour les trois peptides. En effet, très peu de NOE ont été observés sur les spectres ROESY indiquant que les peptides étudiés ne sont pas structurés dans l'eau. Comme nous l'avons évoqué précédemment dans la section « Modèles membranaires et études structurales des PAM par RMN », de nombreux petits peptides antimicrobiens sont déstructurés en solution aqueuse, et c'est seulement au contact de la membrane bactérienne ou d'un milieu mimant les membranes qu'ils acquièrent une structure tridimensionnelle bien définie.

Les structures tridimensionnelles du Pep18 et du Pep19 ont déjà été résolues en présence de micelles de détergent à base de SDS dans une étude précédente (voir section discussion pour une description plus détaillée)¹¹. Les micelles de détergents représentent le modèle membranaire historiquement le plus utilisé à des fins de caractérisation structurale en RMN du liquide^{214,215}. Néanmoins, bien que ce modèle soit encore fréquemment utilisé, l'environnement qui est créé est considéré comme étant relativement peu biomimétique des membranes²¹⁵. Par conséquent, ce modèle constitue de manière générale une étape préliminaire avant d'utiliser des modèles bien plus complexes.

C'est pourquoi les études de structures réalisées au cours de cette thèse ont été effectuées en présence de divers modèles membranaires considérés comme étant de meilleurs mimes membranaires que les micelles de détergents. Les modèles utilisés sont les suivants :

- Micelles de LPS : mime le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif
- SUV anioniques (DOPC/DOPS) : mime la membrane bactérienne
- SUV zwitterioniques (DOPC) : mime la membrane des eucaryotes

Les attributions de ces peptides ayant été effectuées en présence de micelles de SDS avant mon arrivé en thèse, j'ai dans un premier temps attribué l'ensemble des déplacements chimiques ¹H

du Pep16, du Pep18 et du Pep19 dans l'eau. J'ai donc réalisé l'attribution séquentielle en utilisant les spectres ROESY des différents peptides dans l'eau. Ces attributions seront utiles pour l'interprétation des spectres Tr-NOESY qui serviront pour la détermination des structures peptidiques. Les spectres Tr-NOESY sont basés sur la détection du peptide libre, il n'y a donc pas de variation des déplacements chimiques lorsque le peptide est en présence des milieux membranaires modèles.

3.4.1 Attribution du Pep18

Afin d'attribuer les déplacements chimiques ^1H du Pep18 nous avons enregistré une combinaison de spectres 2D homonucléaires COSY, TOCSY, ROESY et 2D hétéronucléaire ^{13}C -HSQC fréquemment utilisée pour la détermination structurale et l'attribution des déplacements chimiques ^1H . Composé uniquement d'acides aminés naturels, l'attribution des déplacements chimiques est relativement aisée dans le cas du Pep18. En effet, sur le spectre TOCSY du Pep18, nous pouvons observer un pic de corrélation entre chaque ^1H amide « $^1\text{H}_\text{N}$ » et le proton en position α « $^1\text{H}_\alpha$ » ce qui nous permet d'identifier les déplacements chimiques des $^1\text{H}_\text{N}$ et $^1\text{H}_\alpha$ des sept résidus sans trop de difficulté en se basant seulement sur le spectre TOCSY (Figure 56).

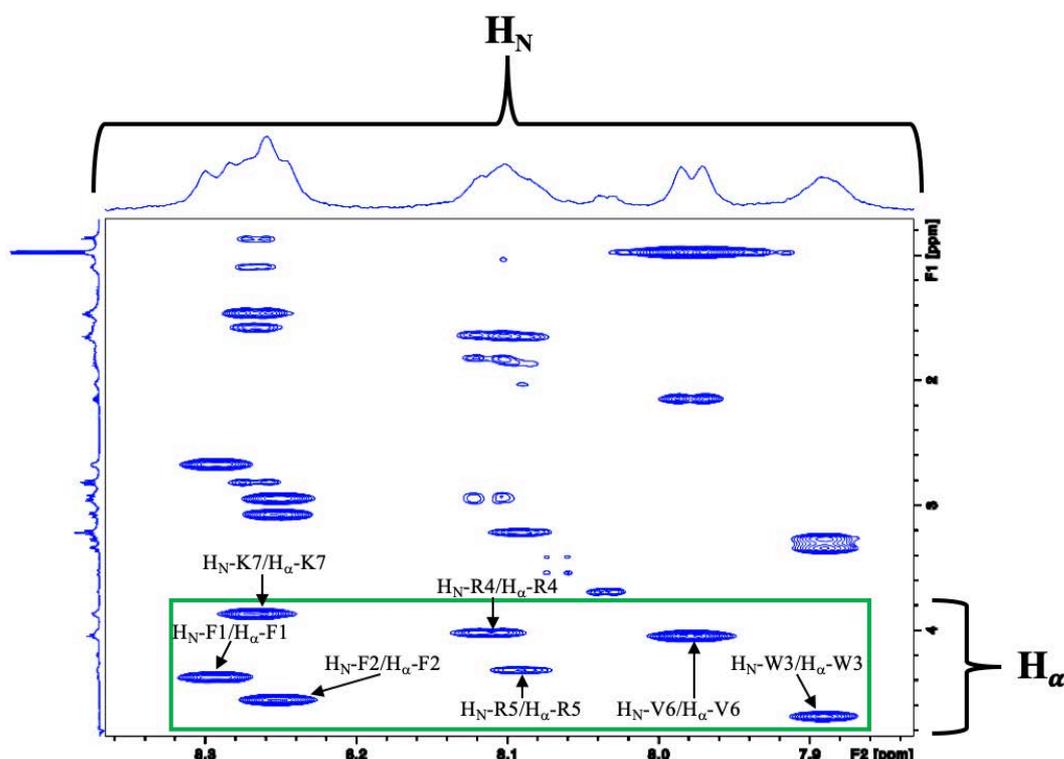


Figure 56 : Spectres RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY du Pep18 (90 % H_2O - 10 % D_2O - 298K - pH 5,00)

Après avoir identifié les déplacements chimiques correspondant aux $^1\text{H}_\text{N}$ et $^1\text{H}_\alpha$ il faut les associer à chacun des résidus du peptide puis attribuer les déplacements chimiques ^1H de l'ensemble de la molécule. Pour cela, dans le cas du Pep18, nous pouvons identifier le résidu valine (Val-6) qui correspond au résidu le plus court. En effet, celui-ci est facilement identifiable. Nous avons ensuite identifié les systèmes de spins à partir du spectre 2D TOCSY. En effet, dans cette expérience, l'aimantation est transférée le long de la chaîne latérale de l'acide aminé jusqu'à ce qu'il y ait une rupture du relais du couplage en ^3J (Figure 57). Un exemple d'attribution du système de spin du résidu Val-6 du Pep18 est montré sur le spectre présenté sur la Figure 58.

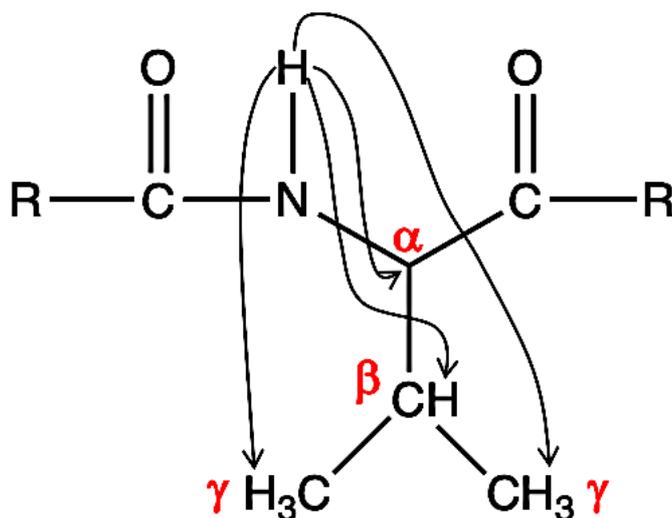


Figure 57 : Attribution du système de spin de la valine

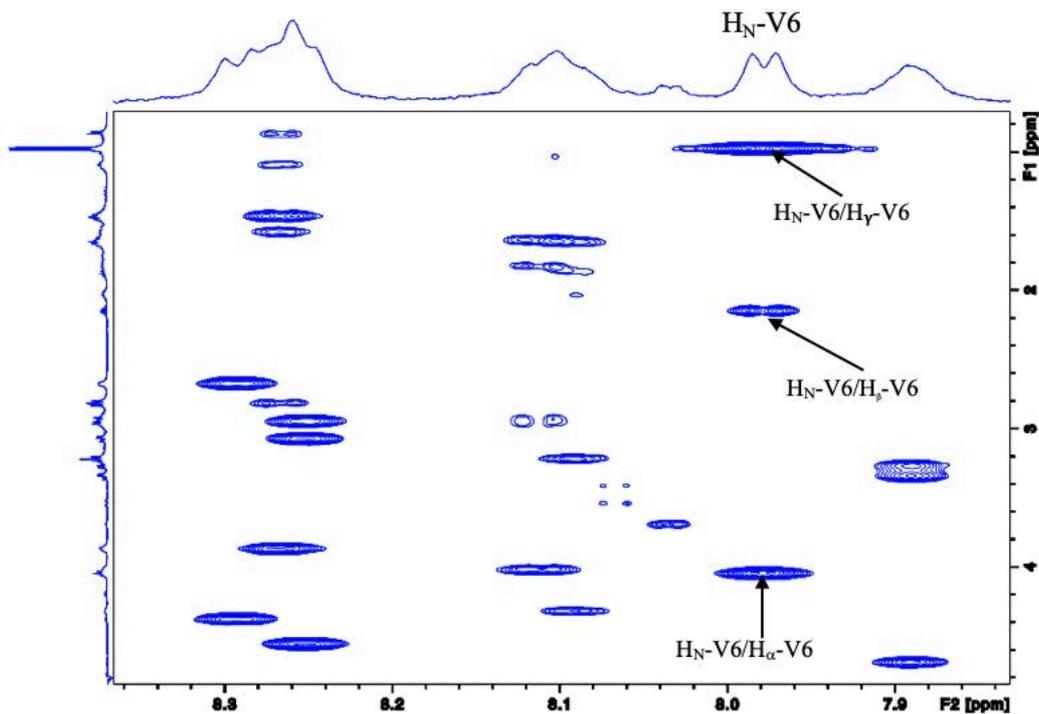


Figure 58 : Spectres RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY du Pep18 (90 % H_2O - 10 % D_2O - 298K - pH 5,00). Exemple d'attribution du système de spin du résidu Val-6 du Pep18

Une fois que le système de spin du résidu Val-6 a été identifié, nous utilisons la méthodologie d'attribution séquentielle des peptides proposée par Wuthrich³¹⁴. Celle-ci va nous permettre de déterminer l'enchaînement des acides aminés du peptide. Pour cela, nous avons utilisé la séquence 2D ROESY qui donne des informations de distance via la corrélation spin-spin directe entre le $^1\text{H}_\alpha$ du résidu (i) et le $^1\text{H}_\text{N}$ du résidu (i + 1). Une illustration d'attribution séquentielle est montrée sur la Figure 59 :

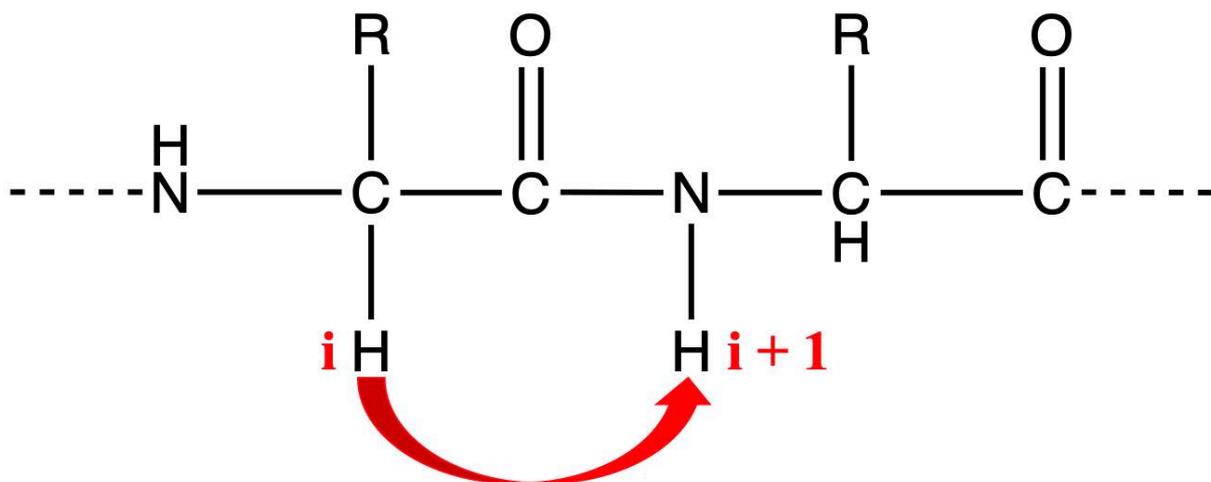


Figure 59 : Attribution séquentielle entre le $^1\text{H}_\alpha$ du résidu (i) et le $^1\text{H}_\text{N}$ du résidu (i + 1)³¹⁴

En utilisant la méthode d'attribution séquentielle³¹⁴, la superposition des spectres TOCSY et ROESY doit nous permettre d'identifier le résidu suivant (Lys-7). En effet, le proton $^1\text{H}_\alpha$ de la Val-6 (résidu i) présente nécessairement un pic de corrélation en ROESY avec le proton $^1\text{H}_\text{N}$ de la Lys-7 (résidu $i + 1$).

Nous pouvons voir sur la Figure 60 que le proton $^1\text{H}_\alpha$ de la Val-6 ($\text{H}_\alpha\text{-V6}$) présente un unique pic de corrélation en ROESY dans la gamme des déplacements chimiques pouvant être associé à celui d'un proton amide. Par conséquent, ce déplacement chimique est forcément celui du proton $^1\text{H}_\text{N}$ de la Lysine en position 7 ($\text{H}_\text{N}\text{-K7}$).

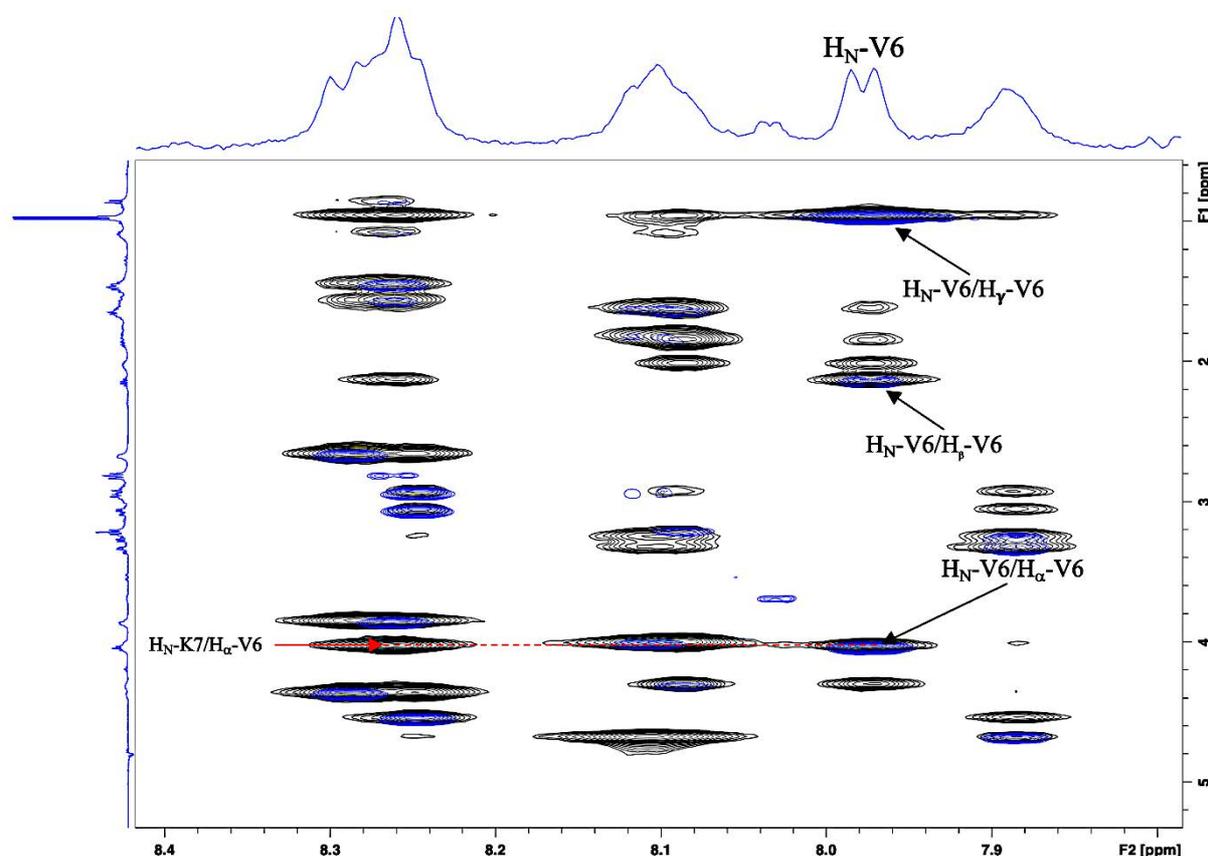


Figure 60 : Superposition des spectres RMN 2D $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ TOCSY (bleu) ROESY (Noir) du Pep18 (90 % H_2O – 10 % D_2O - 298K – pH 5,00)

A partir du pic de corrélation ROESY « $\text{H}_\alpha\text{-V6}/\text{H}_\text{N}\text{-K7}$ » (Figure 60), nous identifions sans aucun problème le déplacement chimique du proton $^1\text{H}_\alpha$ ($\text{H}_\alpha\text{-K7}$) avec le spectre TOCSY. Puis, la combinaison des spectres TOCSY et ROESY nous permet de déterminer les déplacements chimiques ^1H de toute la chaîne latérale de la lysine (Lys-7). Nous avons ainsi déterminé à ce

stade l'ensemble des déplacements chimiques ^1H de deux résidus du Pep18 correspondant à la Val-6 et la Lys-7.

Pour déterminer les déplacements chimiques ^1H des autres résidus il suffit de réitérer cette méthodologie. En effet, en partant du proton $^1\text{H}_\alpha$ de la Lys-7 on remonte sans problème au $^1\text{H}_\text{N}$ de la Phe-1 avec le spectre ROESY puis on détermine le déplacement chimique des ^1H de la chaîne latérale de la Phe-1 avec les spectres TOCSY et ROESY.

Néanmoins, pour l'attribution des déplacements chimiques de la chaîne latérale du résidu 3 correspondant au tryptophane Trp-3, il est nécessaire d'utiliser le spectre COSY. Celui-ci va permettre l'attribution directe des protons voisins. Le proton HE1 du tryptophane (Figure 61) est facilement identifiable car il est très déblindé avec un déplacement chimique à 10,22 ppm. A partir de ce proton on identifie soit avec le spectre COSY soit avec le spectre TOCSY le proton HD1 puis à partir du spectre ROESY on attribue le proton HZ2 (Figure 61). C'est ensuite avec les spectres COSY et TOCSY que l'on va pouvoir attribuer les protons manquant du tryptophane (Figure 61).

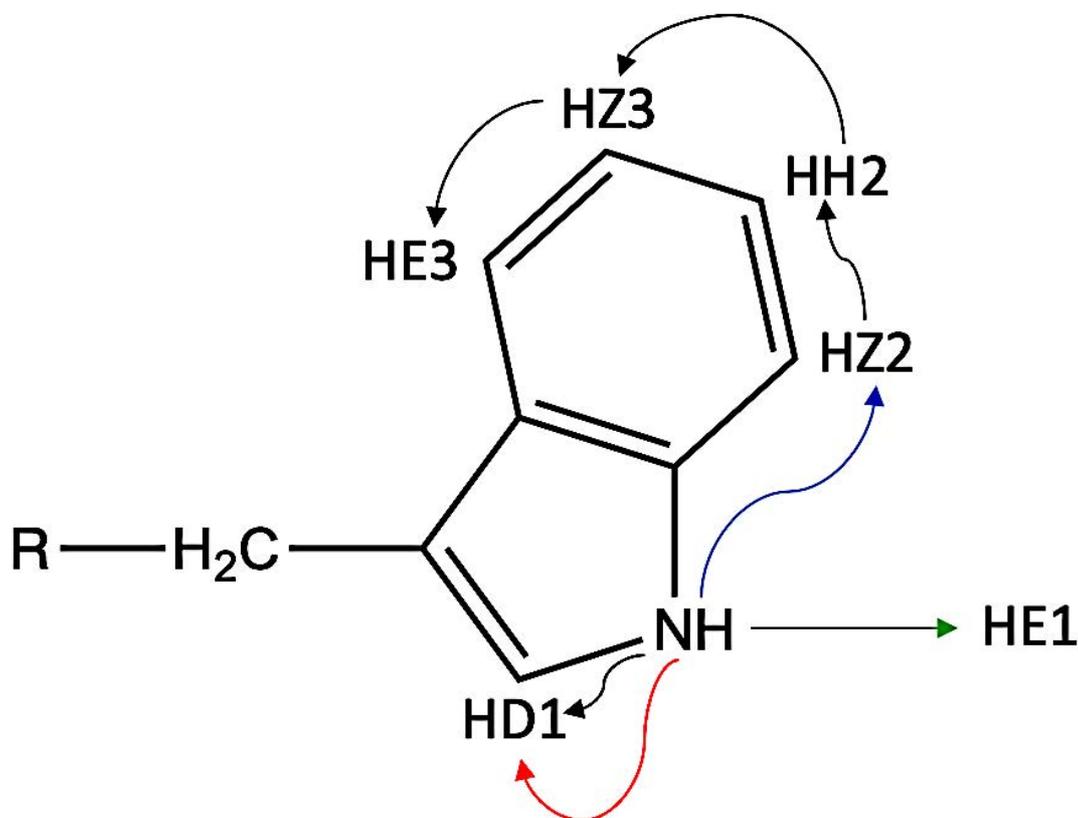


Figure 61 : Méthodologie d'attribution du tryptophane – TOCSY (rouge) – ROESY (bleu) – COSY (Noir)

Les valeurs de déplacements chimiques ^1H du Pep18 sont présentées dans le Tableau 13 :

AA	H^{N}	H_{α}	H_{β}	Autres H
F1	8,29	4,38	2,68	δCH 7,14 ; εCH 7,37 ; ζCH 7,33
F2	8,25	4,56	2,95 ; 3,07	δCH 7,23 ; εCH 7,39 ; ζCH 7,34
W3	7,89	4,69	3,27 ; 3,34	$\delta 1\text{CH}$ 7,17 ; $\varepsilon 1\text{CH}$ 10,22 ; $\varepsilon 3\text{CH}$ 7,51 ; $\eta 2\text{CH}$ 7,23 ; $\zeta 1\text{CH}$ 7,42 ; $\zeta 2\text{CH}$ 7,21
R4	8,11	4,12	1,63 ; 1,83	$\delta 1\text{CH}_2$ 2,94 ; γCH_2 1,02 ; 1,10 ; εNH 7,01
R5	8,09	4,32	1,87 ; 2,03	$\delta 1\text{CH}_2$ 3,21 ; γCH_2 1,65 ; εNH 7,22
V6	7,97	4,05	2,15	δCH_3 0,98
K7	8,27	3,87	1,47 ; 1,58	γCH_2 0,87 ; 1,09 δCH_2 1,47 ; εCH_2 2,82

Tableau 13 : Déplacements chimiques ^1H du Pep18 (90 % H_2O – 10 % D_2O - 298K – pH 5,00)

3.4.2 Attribution du Pep19

L'attribution des déplacements chimiques ^1H du Pep19 a également été réalisée par l'enregistrement d'une combinaison de spectres 2D homonucléaires COSY, TOCSY, ROESY et 2D hétéronucléaire ^{13}C -HSQC. Cependant, la présence des deux résidus aza- β^3 -1-naphtylalanine rend la méthodologie classiquement utilisée pour l'attribution bien plus complexe en raison de l'absence de proton en position α ($^1\text{H}_{\alpha}$). L'absence de $^1\text{H}_{\alpha}$ implique qu'il n'y a aucun transfert de polarisation dans les chaînes latérales de ces deux résidus aza- β^3 à partir du $^1\text{H}_{\text{N}}$ lors de l'acquisition des expériences TOCSY comme nous pouvons le voir sur la Figure 62. Par conséquent, la méthodologie que nous avons appliquée pour l'attribution des déplacements chimiques du Pep18 est légèrement différente dans le cas du Pep19.

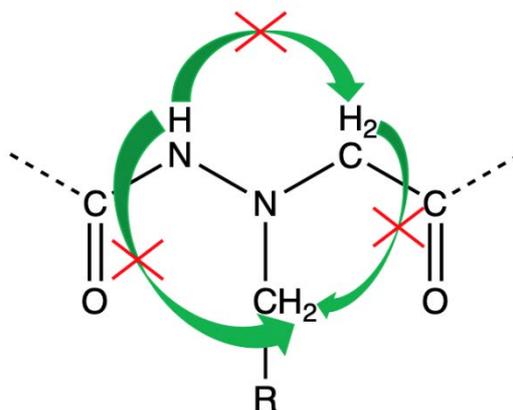


Figure 62 : Absence de transfert de polarisation en TOCSY dans les résidus aza- β^3

Néanmoins, étant donné que les déplacements chimiques des protons amides des résidus aza- β^3 sont de manière générale considérablement déblindés avec des valeurs se situant entre 9 ppm et 10 ppm, il est très aisé d'identifier ces résidus.

En général, on commence par l'attribution des acides aminés protéinogènes. Pour cela, la procédure est la même que celle utilisée pour le Pep18. En effet, le Pep19 étant composé de 5 acides aminés naturels, on observe sur le spectre TOCSY, 5 pics de corrélation entre $^1\text{H}_\text{N}$ et $^1\text{H}_\alpha$ (Figure 63). Ainsi, nous pouvons identifier les déplacements chimiques $^1\text{H}_\text{N}$ et $^1\text{H}_\alpha$ des cinq acides aminés naturels du Pep19. Le résidu Val-6 est également facilement identifiable pour le Pep19 à partir du spectre TOCSY (Figure 63).

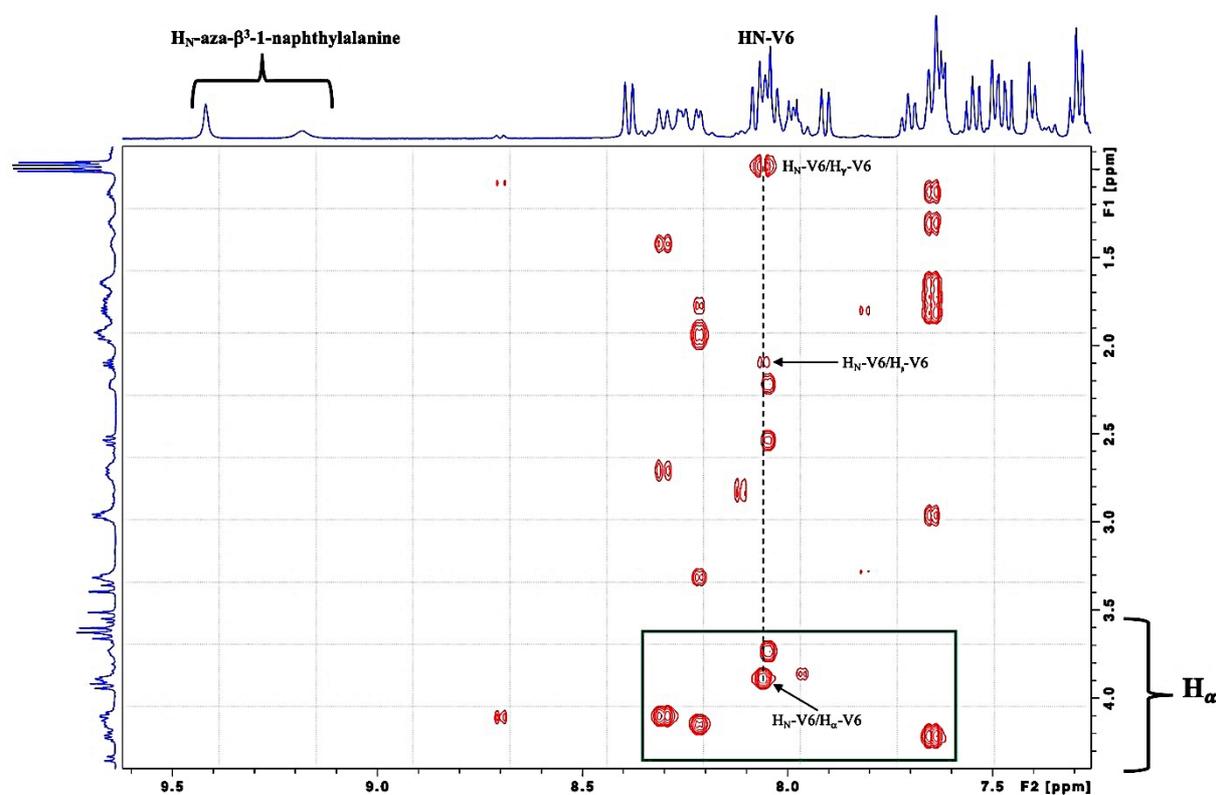


Figure 63 : Spectres RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY du Pep19 (90 % H_2O - 10 % D_2O - 308K - pH 5,00)

En superposant les spectres TOCSY et ROESY (Figure 64) nous pouvons ensuite identifier le résidu suivant (Lys-7) en utilisant la méthode d'attribution séquentielle³¹⁴ comme nous l'avons précédemment détaillé pour le Pep18. Nous déterminons de cette façon les déplacements chimiques ^1H des acides aminés Arg-4 (R4), Arg-5 (R5), Val-6 (V6) et Lys-7 (K7). On peut ensuite par déduction, déterminer le déplacement chimique du $^1\text{H}_\text{N}$ et du $^1\text{H}_\alpha$ du résidu Phe-2 (F2) et identifier l'ensemble des déplacements chimiques ^1H de sa chaîne latérale.

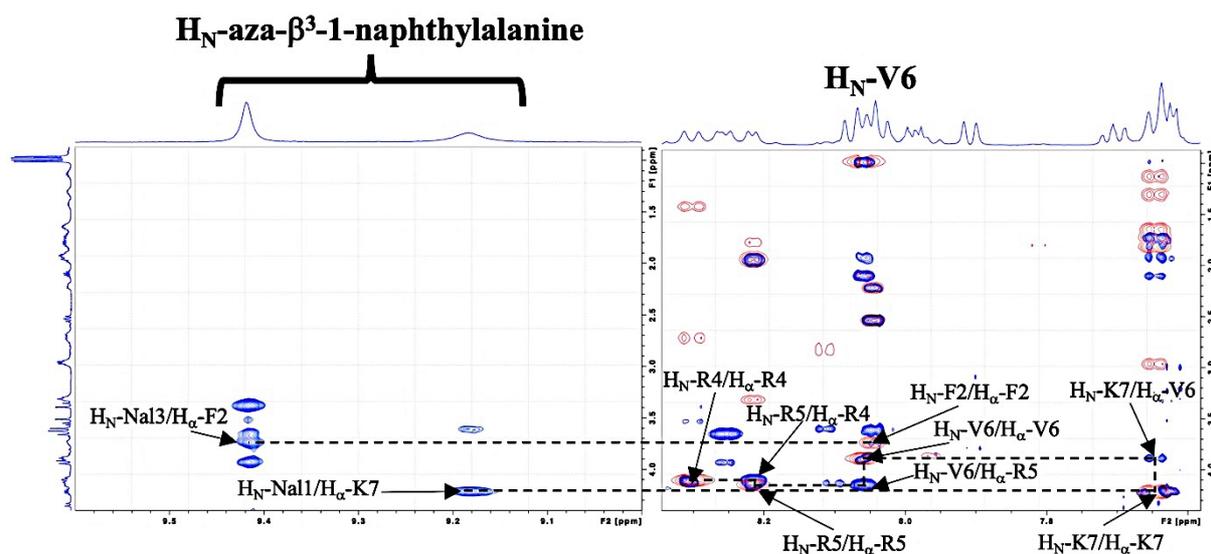


Figure 64 : Superposition des spectres RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY (rouge) ROESY (bleu) du Pep19 (90 % H_2O - 10 % D_2O - 308K - pH 5,00)

Nous pouvons ensuite attribuer convenablement les déplacements chimiques amides des résidus aza- β^3 par le biais du spectre ROESY. En effet, d'après la structure chimique du Pep19, le H_α -K7 présente forcément un pic de corrélation ROESY avec le H_N -Nal1 tandis que le H_α -F2 présente nécessairement un pic de corrélation ROESY avec le H_N -Nal3 comme nous pouvons le voir sur la Figure 64.

L'attribution de l'ensemble des ^1H des résidus aza se fait en combinant les spectres ROESY et COSY (Figure 65). Par exemple, en ROESY les protons HB présentent des pics de corrélation très intenses avec le HG2 et avec le $^1\text{H}_\text{N}$. Tandis que les HS présentent des pics de corrélation avec le $^1\text{H}_\text{N}$ mais pas avec le HG2 ce qui nous permet dans un premier temps de différencier les déplacements chimiques HB et HS. Le HD1 présente des pics de corrélation avec les HB et un pic de corrélation plutôt intense avec le $^1\text{H}_\text{N}$, ce qui permet également d'attribuer son déplacement chimique. On peut différencier le HG2 du HD1 puisque le HD1 corrèle avec le $^1\text{H}_\text{N}$ alors que le HG2 se trouve à une distance bien trop importante pour corrélérer avec le $^1\text{H}_\text{N}$. Nous pouvons ensuite attribuer les protons voisins via le spectre COSY en partant du HG2 et du HD1 comme illustré à la Figure 65.

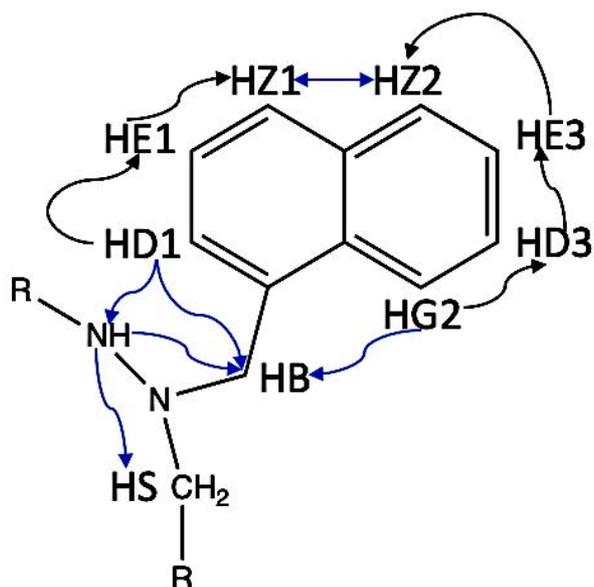


Figure 65 : Méthodologie d'attribution des aza- β -1-naphthylalanines – ROESY (bleu) – COSY (Noir) – Les protons (HS) correspondent aux deux protons du groupement méthylène présents dans les résidus aza- β

Néanmoins, le Pep19 est constitué de deux résidus aza- β^3 -1-naphthylalanines présentant une dispersion des résonances protons des chaînes latérales relativement faible ce qui engendre dans certains cas une attribution qui peut être parfois ambiguë. Les spectres hétéronucléaires, non présentés ici car obtenus avant mon arrivée au laboratoire, avaient servi à lever certaines ambiguïtés. Les valeurs de déplacements chimiques ^1H du Pep19 sont présentées dans le Tableau 14 :

AA	H^{N}	H_{α}	H_{β}	Autres H
azaNal1	9,15	/	4,51 ; 4,35	δ 1CH 7,49 ; ϵ 1CH 7,54 ; ζ 2CH 8,06 ; ϵ 3CH 7,63 ; δ 3CH 7,69 ; γ 2CH 8,38 ; HS 3,64 ; 3,57
F2	8,03	3,78	2,54 ; 2,24	δ CH 7,16 ; ϵ CH 7,28
azaNal3	9,39	/	3,95 ; 3,67	δ 1CH 7,40 ; ϵ 1CH 7,48 ; ζ 1CH 7,91 ζ 2CH 7,98 ; ϵ 3CH 7,61 ; δ 3CH 7,61 ; γ 2CH 8,25 ; HS 3,53 ; 3,39
R4	8,29	4,08	1,42	γ CH ₂ 0,47 ; 0,59 ; δ CH ₂ 2,72 ; ϵ NH 7,62
R5	8,14	4,13	1,91	γ CH ₂ 1,75 ; δ CH ₂ 3,29 ; ϵ NH 7,35
V6	7,95	3,88	2,07	γ CH ₃ 0,96
K7	7,59	4,20	1,79 ; 1,68	γ CH ₂ 1,28 ; 1,11 δ CH ₂ 1,63 ; ϵ CH ₂ 2,94

Tableau 14 : Déplacements chimiques ^1H du Pep19 (90 % H_2O – 10 % D_2O – 318K – pH 5,00)

3.5 Étude du Pep18 et du Pep19 en présence de LPS

L'ajout de micelles de LPS à la solution aqueuse de Pep18 et de Pep19 provoque un élargissement significatif des pics sur les spectres RMN ^1H à une dimension pour un ratio molaire peptide – LPS de 1 : 0,021 dans le cas du Pep18 (Figure 66) et de 1 : 0,0169 dans le cas du Pep19 (Figure 67). L'élargissement des résonances sur les spectres 1D ^1H indiquent que les peptides sont en échange rapide entre la forme liée au LPS et la forme libre à l'échelle de temps de la RMN. La titration par les micelles de LPS n'a pas entraîné de variation des déplacements chimiques des résonances ^1H des deux peptides.

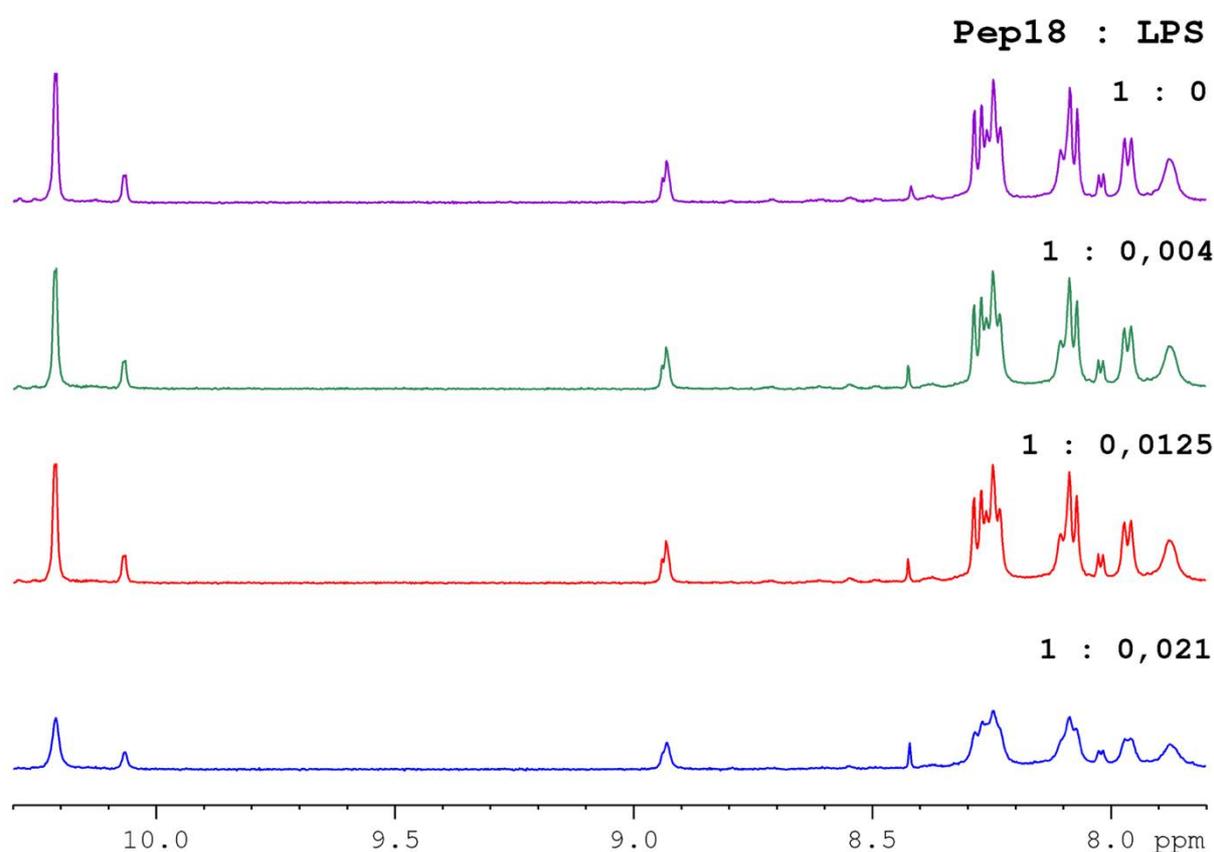


Figure 66 : Portions de spectre RMN ^1H du Pep18 en présence de concentrations croissantes en micelles de LPS (90 % H_2O – 10 % D_2O - 298K – pH 5,00). Les ratios molaires Pep18 – LPS sont indiqués sur chaque spectre - Sur la portion de spectre bleu, les concentrations molaires en Pep18 et LPS sont respectivement de 2 mM et 0,042 mM

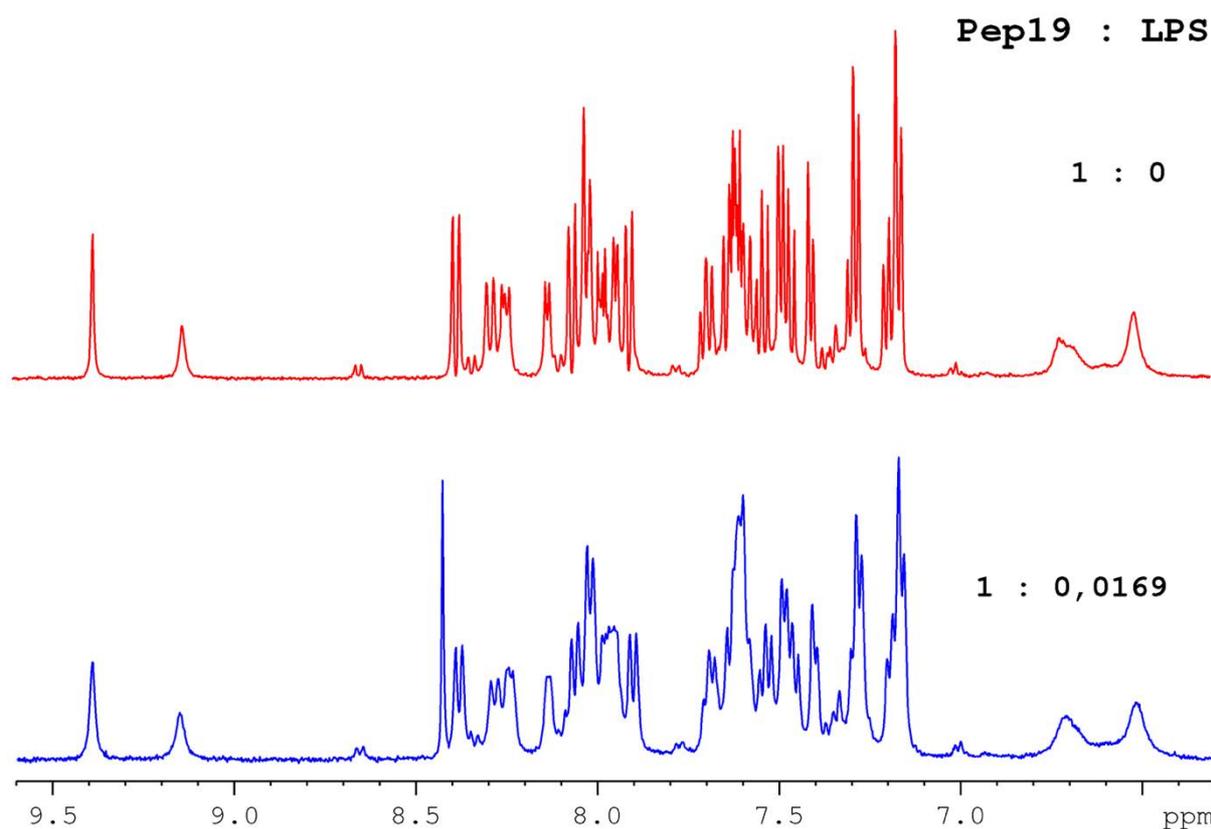


Figure 67 : Portions de spectre RMN ^1H du Pep19 en présence de micelles de LPS (90 % H_2O – 10 % D_2O - 318K – pH 5,00) - Les ratios molaires Pep19 – LPS sont indiqués sur chaque spectre - Sur la portion de spectre bleu, les concentrations molaires en Pep19 et LPS sont respectivement de 0,57 mM et 0,0096 mM

3.6 Structure tridimensionnelle

3.6.1 Utilisation de micelles de LPS

Une stagiaire avait travaillé sur la détermination de la structure du Pep18 en présence de micelles de LPS. L'étude n'a pas permis d'obtenir une structure bien définie après minimisation sous contraintes RMN. De nouvelles conditions d'acquisition, température ou pH, devrait peut-être permettre la détermination de la structure du Pep18 en présence de micelles de LPS. Nous avons choisi de laisser de côté l'étude du Pep18 afin de se concentrer sur l'étude du Pep19. De cette manière, nous avons pu approfondir l'étude du Pep19 en présence de différents modèles membranaires.

Nous avons commencé par enregistrer des spectres Tr-NOESY dans le but de caractériser la structure tridimensionnelle du Pep19 lorsqu'il est associé aux micelles de LPS. Nous avons observé un élargissement significatif des résonances ^1H pour un rapport molaire peptide – LPS

de 1 : 0,0169 (Figure 67), c'est pourquoi les spectres Tr-NOESY ont été acquis à ce ratio. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 68, lorsque des micelles de LPS ont été ajoutées, de nombreux pics croisés négatifs ont été détectés sur les spectres Tr-NOESY. Tandis que les spectres NOESY du Pep19 dans l'eau exempt de LPS ne permettent d'obtenir aucun pic de corrélation. Les spectres Tr-NOESY ont été acquis à 318K en raison d'un meilleur éclatement des pics croisés mais également de manière à observer les deux résidus aza- β^3 . En effet, à basse température l'azaNal1 n'est pas observable.

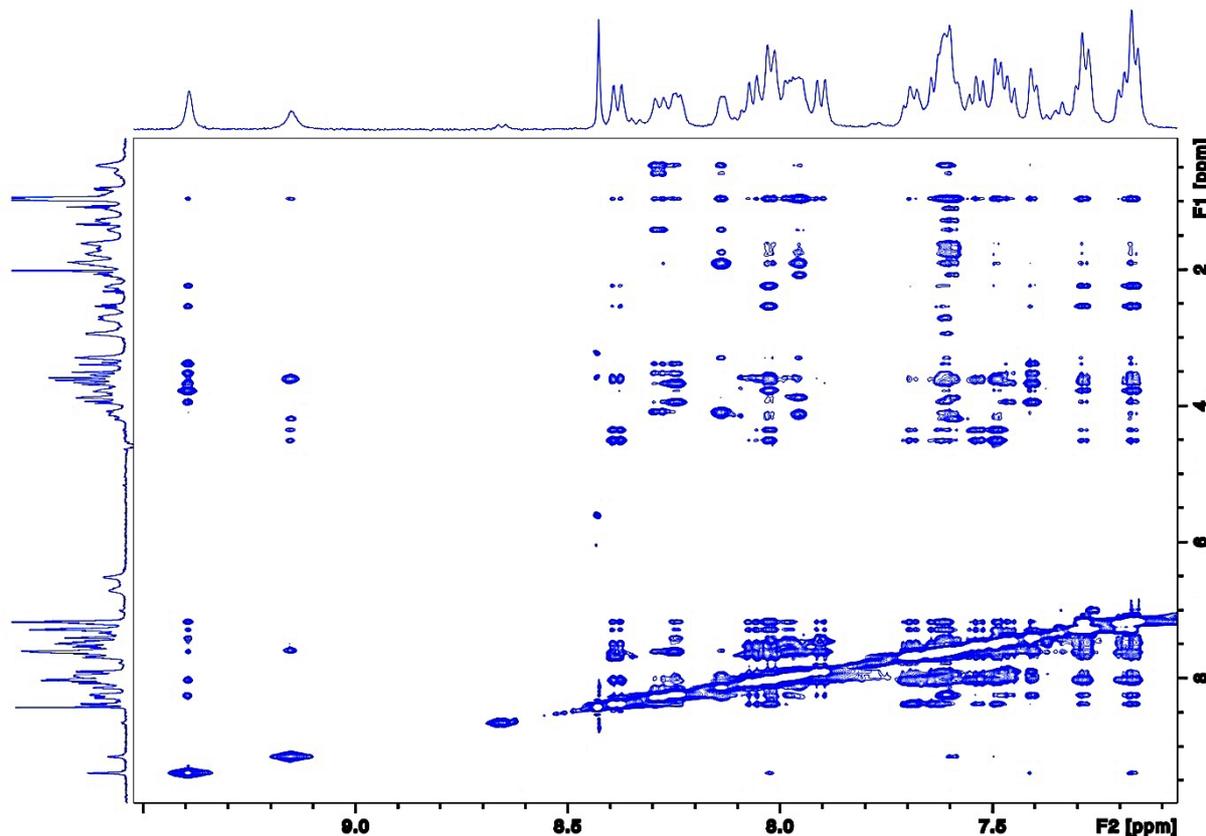


Figure 68 : Spectre RMN 2D ^1H - ^1H Tr-NOESY du Pep19 (0,57 mM) en présence de micelles de LPS (0,0096 mM) - (90 % H_2O - 10 % D_2O - 318K - pH 5,00). Ratios molaires Pep19 - LPS de 1 : 0,0169

La présence abondante de pics croisés négatifs sur le spectre Tr-NOESY (Figure 68) atteste de l'état lié du Pep19 avec les micelles de LPS. En effet, la méthode du Tr-NOESY est applicable uniquement dans le cas d'un échange rapide entre la forme libre et la forme complexée.

Étant donné que de multiples pics croisés ont été détectés sur les spectres Tr-NOESY, nous nous sommes penchés sur la détermination de la structure tridimensionnelle du Pep19 en interaction avec les micelles de LPS. Nous avons dans un premier temps évalué les contraintes de distances sur la base des intensités des pics croisés NOE.

La configuration initiale des résidus aza- β^3 n'a pas réellement d'importance. En effet, les résidus aza- β^3 sont composés d'azotes pyramidaux (sp^3) pouvant alterner entre une configuration R ou S en fonction de l'environnement, de l'encombrement stérique et des interactions^{13,14,118}. Néanmoins, nous avons vu précédemment dans l'introduction que la configuration des atomes d'azotes pyramidaux pouvait être figée dans les pseudopeptides cycliques^{15,17,120}.

Lors de la construction de la molécule, en amont de la modélisation moléculaire nous avons imposé des contraintes d'angles de 180° pour l'ensemble des liaisons peptidiques afin d'obtenir des structures minimisées avec toutes les liaisons peptidiques configurées en « trans ».

La superposition des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å est présentée sur la Figure 69. Ces spectres ont été obtenus à partir de 100 structures calculées avec le logiciel AMBER³²⁴. Ces structures sont considérées comme représentatives du Pep19 lorsqu'il est dans son état lié aux micelles de LPS. La superposition a été réalisée avec le logiciel MOLMOL³²⁸ en utilisant uniquement les atomes lourds composant le squelette du cycle heptapeptidique.

L'intégralité des NOE intra-résidus utilisés pour le calcul de la structure correspondent aux résidus aza- β^3 . L'utilisation de ces NOE permet de favoriser la fixation de l'orientation des cycles aromatiques et par la même occasion la configuration des atomes d'azotes pyramidaux. L'ensemble des données correspondant à la structure déterminée sont résumées dans le Tableau 16.

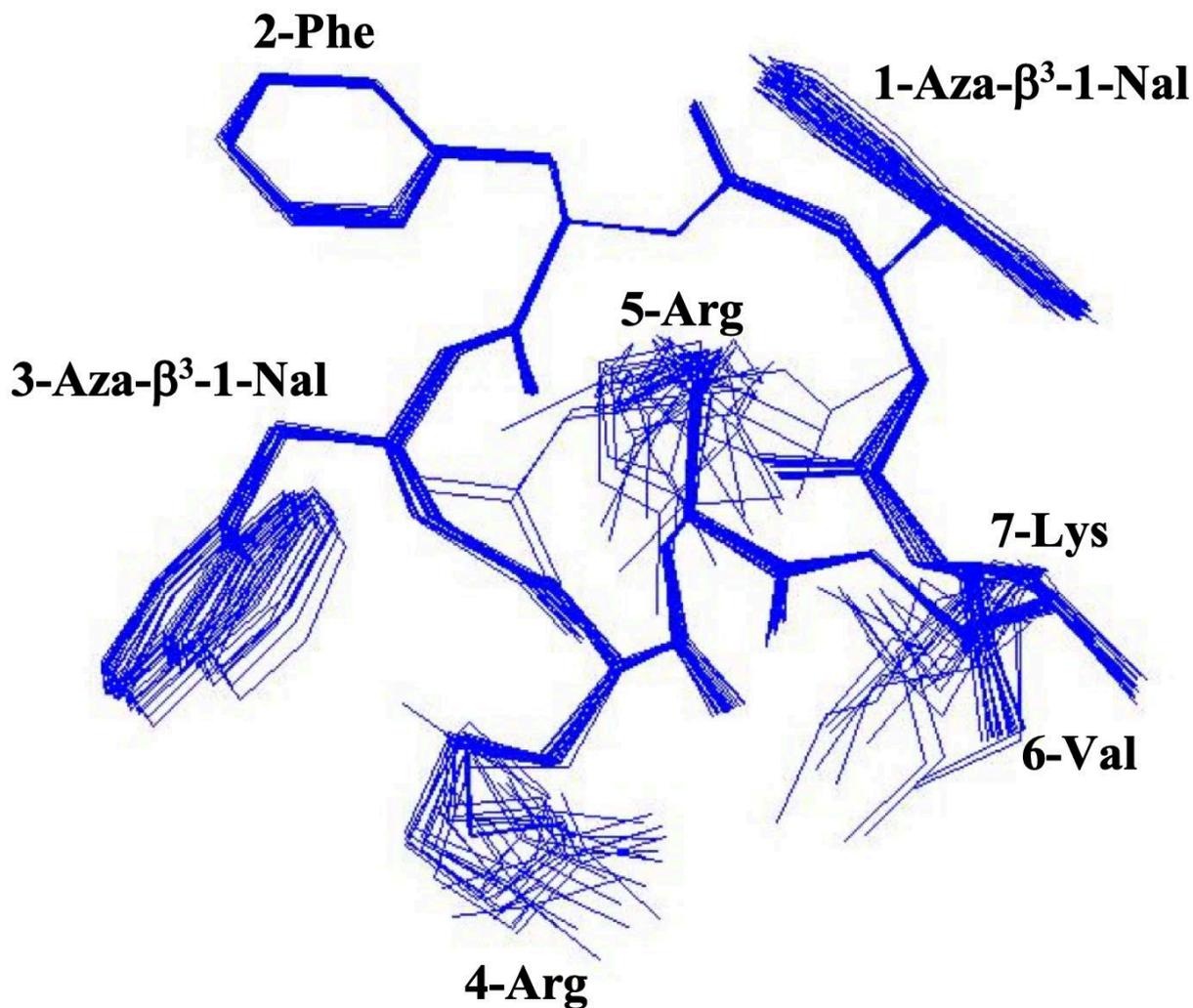


Figure 69 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 parmi les 100 structures calculées en présence de micelles de LPS. La superposition des 20 structures est réalisée à partir de MOLMOL³²⁸

Les azotes des deux résidus aza- β^3 -1-naphthylalanines adoptent une configuration R sur les 20 structures de plus basse énergie et l'intégralité des liaisons peptidiques sont dans une configuration « trans ».

La structure obtenue pour le Pep19 en présence de micelle de LPS est bien définie avec un RMSD (Root Mean Square Deviation) déterminé via les atomes du squelette cyclique de 0,086 Å. Lorsque l'ensemble des atomes lourds du cycle sont pris en compte le RMSD est de 0,544 Å. Nous observons sur la Figure 69 que les extrémités des chaînes latérales des résidus 4 ARG, 5 ARG et 7 LYS sont moins bien définies que le reste de la structure peptidique. La libre orientation de ces trois extrémités est dû à l'absence quasi-totale de Tr-NOE entre ces extrémités et le cycle heptapeptidique.

En général, les aza- β^3 -peptides adoptent des conformations qui sont stabilisées par des réseaux de liaisons hydrogènes. En effet, une liaison hydrogène s'établit entre le proton de l'azote $H_{N_{i+1}}$ et le doublet non-liant de l'oxygène du carbonyle O_{i-1} et une autre se forme entre le proton $H_{N_{i+1}}$ et le doublet non-liant de l'azote N_i ^{16,17,119}. Ces liaisons hydrogènes forment des pseudocycles bifides à huit chaînons qui sont qualifiés d'hydrazinoturns (N-N turns)¹¹⁸. Nous pouvons observer sur la Figure 70 que la structure tridimensionnelle du Pep19 est régie par un réseau interne de liaisons hydrogène conduisant à la formation de deux pseudocycles bifides à huit chaînons (N-N turns). Par conséquent, la structure tridimensionnelle du Pep19 est stabilisée par deux N-N-turns impliquant dans le cas du Nal1, une liaison hydrogène entre le proton amide du résidu Phe-2 et le doublet non-liant de l'azote pyramidale du résidu Nal1 ($2.H^N - 1.N = 2,06 \text{ \AA}$) et une autre liaison hydrogène entre le proton amide du résidu Phe-2 et le doublet non-liant de l'oxygène du carbonyle du résidu 7-Lys ($2.H^N - 7.CO = 2,81 \text{ \AA}$). Dans le cas du Nal3, le N-N-turn est défini par la liaison hydrogène qui se forme entre le proton amide du résidu Arg-4 et le doublet non-liant de l'azote pyramidale du résidu Nal3 ($4.H^N - 3.N = 2,26 \text{ \AA}$) et la liaison hydrogène qui se forme entre le proton amide du résidu Arg-4 et le doublet non-liant de l'oxygène du carbonyle du résidu 2-Phe ($4.H^N - 2.CO = 1,99 \text{ \AA}$).

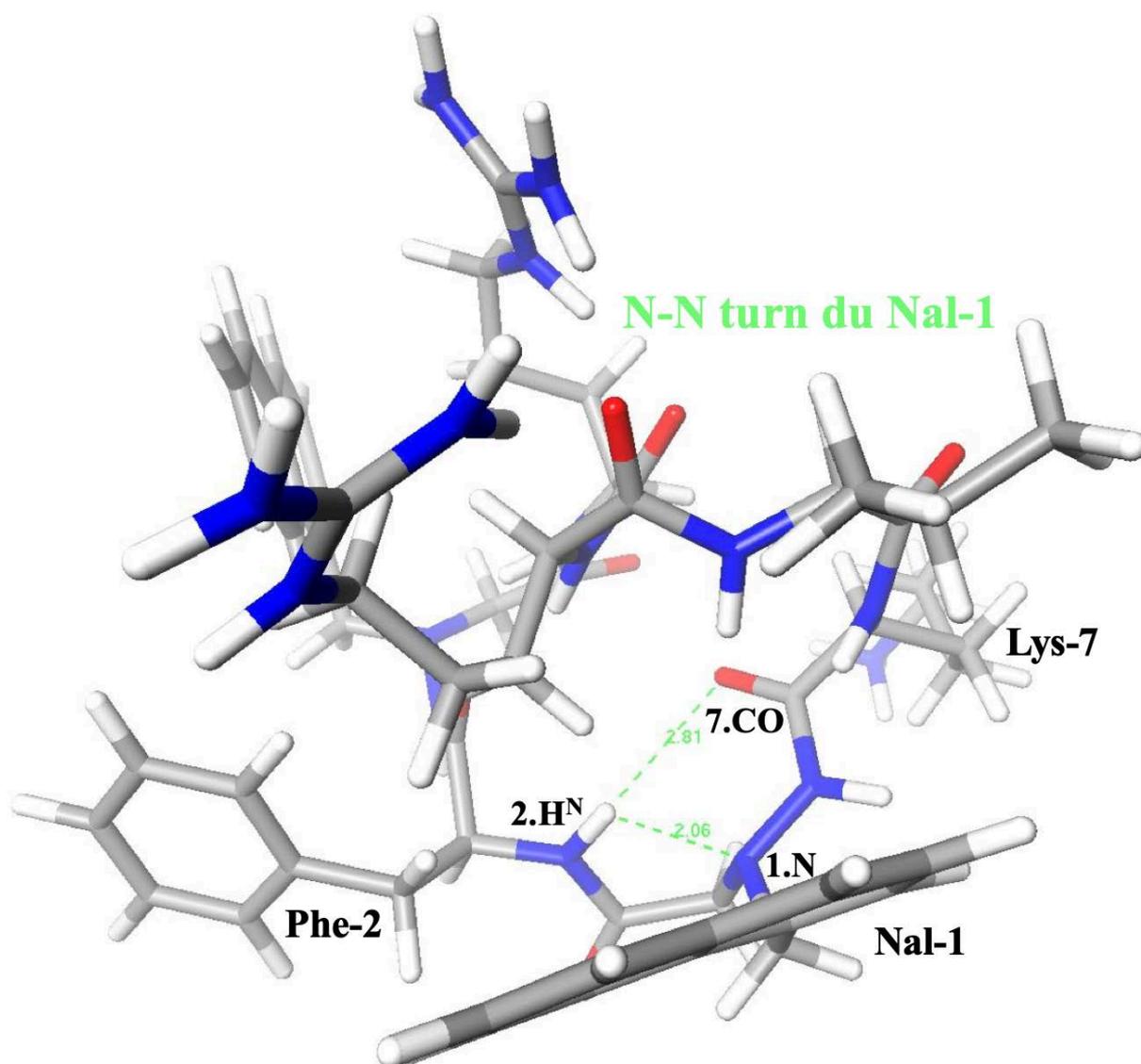


Figure 70 : Structure d'énergie la plus basse du Pep19 en présence de micelles de LPS avec représentation du réseau de liaisons hydrogène formant le pseudocycle bifide à huit chaînons (N-N-turns) du Nal-1

De manière générale, les liaisons peptidiques établies entre les groupes amides (NH) et carbonyles (CO) sont fixes. Par conséquent, les modifications des structures peptidiques proviennent des liaisons situées de part et d'autre de ces liaisons peptidiques. Ainsi, les acides aminés naturels composant les peptides sont caractérisés par la présence de deux angles dièdres noté Phi (φ) et Psi (ψ). Un angle dièdre correspond à l'angle que forment deux plans. En effet, dans le cas du résidu aza-Nal3, l'angle dièdre φ est défini par les 2 plans $C_{i-1} - NH_i - N_i$ et $NH_i - N_i - CS_i$ et l'angle dièdre ψ est défini par les 2 plans $N_i - CS_i - C_i$ et $CS_i - C_i - NH_{i+1}$ à la Figure 71. Un troisième angle dièdre caractérise les résidus aza- β^3 . Ce troisième angle correspond à l'angle thêta (θ). Il est défini à la Figure 71 par les 2 plans $NH_i - N_i - CS_i$ et $N_i - CS_i - C_i$. A partir des angles dièdres φ et ψ , un diagramme appelé diagramme de Ramachandran

peut être construit. Ce diagramme comprend les angles dièdres φ en abscisse et ψ en ordonnée (Figure 72). Néanmoins, comme nous pouvons l'observer sur le diagramme de Ramachandran présenté à la Figure 72, certaines valeurs d'angles ne sont pas autorisées.

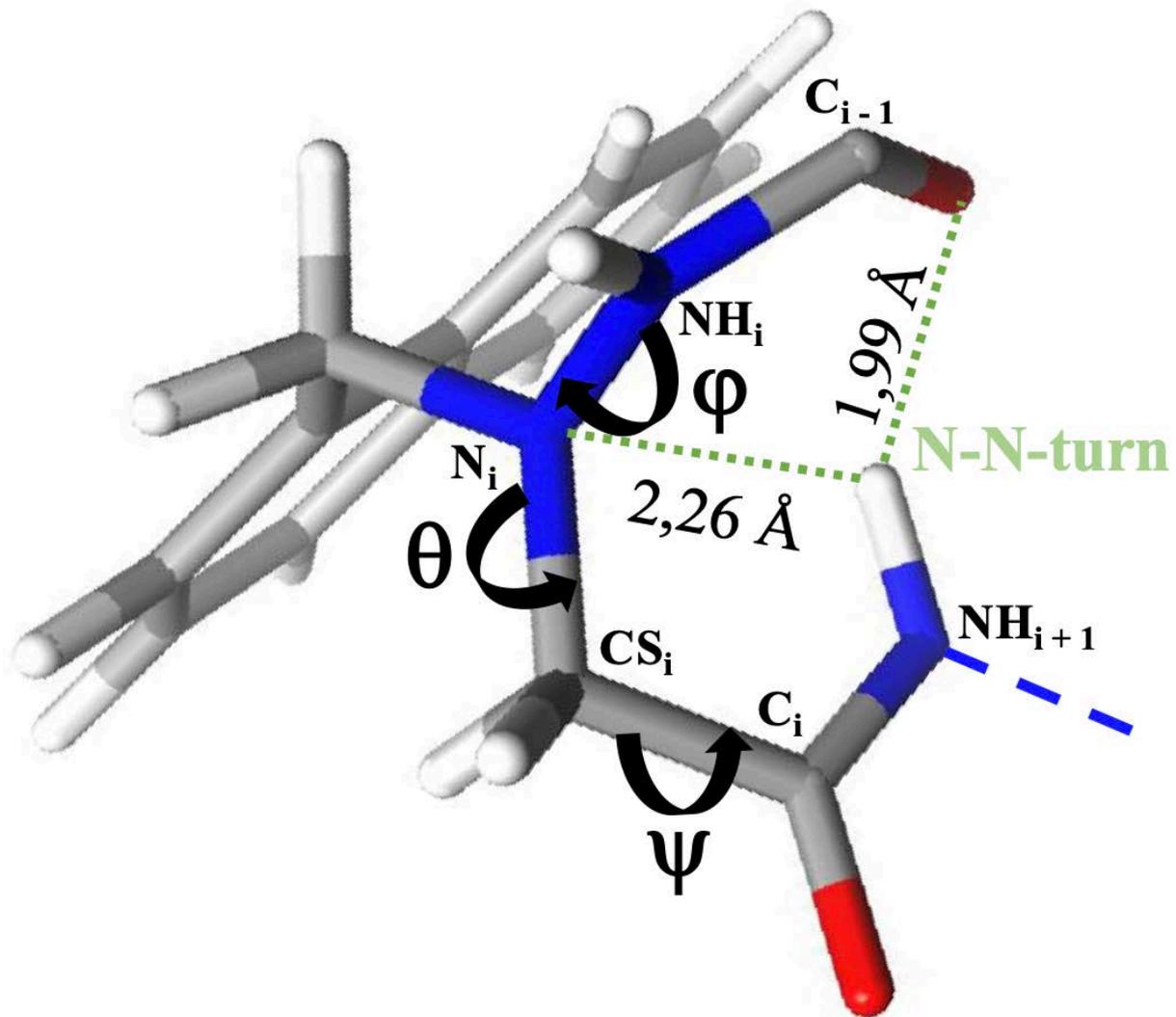


Figure 71 : Mise en évidence des angles dièdres Phi (φ), Thêta (θ) et Psi (ψ) et des liaisons hydrogènes formant le N-N-turn (pointillés vert) du résidu aza-Nal3. Les distances des deux liaisons hydrogène sont indiquées

Concernant la structure tridimensionnelle obtenue pour le Pep19 en présence de micelles de LPS, l'intégralité des angles dièdres (Tableau 15) se situent dans les régions autorisées du tracé de Ramachandran (Figure 72). En effet, 28,6 % des résidus se situent dans les régions les plus favorables, 57,1 % des résidus sont répartis dans les régions supplémentaires autorisées et 14,3 se situent dans les régions généreusement autorisées par le diagramme de Ramachandran.

Les moyennes des angles dièdres Phi (φ), Thêta (θ) et Psi (ψ) de l'ensemble des résidus des 20 structures de plus basse énergie sont listées dans le Tableau 15.

Résidu	Phi (φ)	Thêta (θ)	Psi (ψ)
1 NAL	76 ± 1	-134 ± 4	28 ± 1
2 PHE	$-132,5 \pm 2$	/	$105 \pm 3,5$
3 NAL	110 ± 1	-75 ± 2	-19 ± 2
4 ARG	-154 ± 3	/	-2 ± 5
5 ARG	$-33 \pm 2,5$	/	$-59 \pm 2,5$
6 VAL	-128 ± 2	/	$-30,5 \pm 3$
7 LYS	-148 ± 3	/	$-59 \pm 2,5$

Tableau 15 : Moyennes des angles dièdres des 20 structures de plus basse énergie

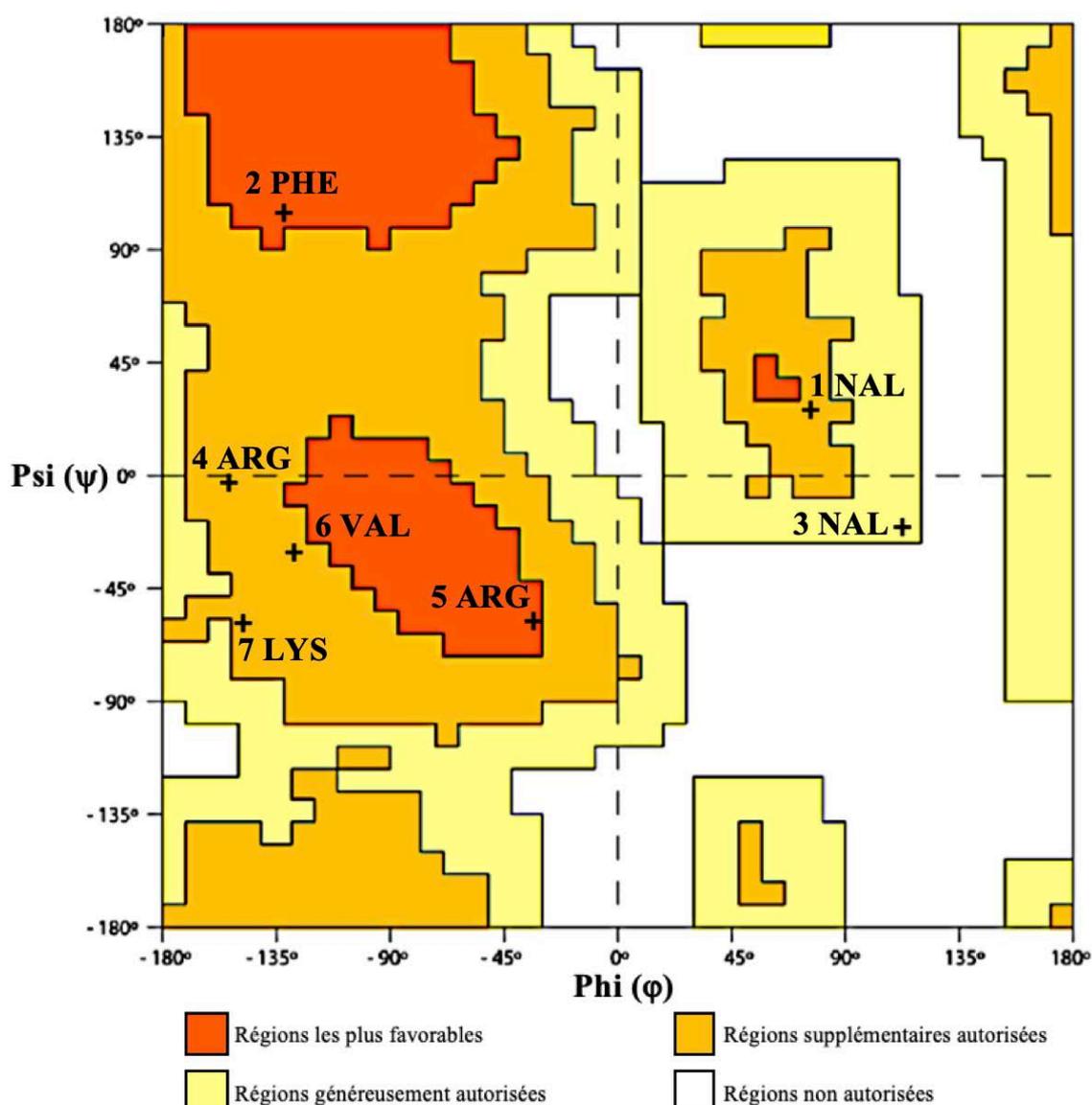


Figure 72 : Diagramme de Ramachandran de la moyenne des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 en interaction avec les micelles de LPS

Les données concernant la structure tridimensionnelle du Pep19 en présence de micelles de LPS sont résumées dans le Tableau 16. Celui-ci comprend le nombre total de pics croisés Tr-NOE utilisés (Tr-NOE non-ambigus / ambigus et intra-résidu). Il comprend également la distribution des angles dièdres sur le diagramme de Ramachandran et les valeurs de RMSD obtenues sur le squelette heptapeptidique et l'ensemble des atomes lourds.

<u>Contraintes de distances</u>	
Total :	82
Non ambiguës :	40
Ambiguës :	42
Intra-résidu :	26
<u>Violations des contraintes</u>	
Violations de distances > 0.3 Å	0
<u>Diagramme de Ramachandran</u>	
Régions les plus favorables	28,6 %
Régions supplémentaires autorisées	57,1 %
Régions généreusement autorisées	14,3 %
Régions non autorisées	0 %
<u>RMSD (Å)</u>	
Atome du Squelette	0,086
Atomes lourds du peptide (C/O/N)	0,544

Tableau 16 : Résumé des données structurales et des statistiques du Pep19 en présence de micelles de LPS

3.6.2 Utilisation de SUV anioniques DOPC/DOPS

Les procaryotes présentent une membrane cytoplasmique composée de phospholipides anioniques¹⁵⁴. Par conséquent, pour mimer cette membrane bactérienne nous avons utilisé des SUV anioniques composées de DOPC/DOPS avec 70 % de DOPC et 30 % de DOPS. Les liposomes sont considérés comme de meilleurs modèles pour mimer la membrane. En revanche, ils sont très peu utilisés en RMN du liquide car ils sont réputés pour être de trop gros objets pour obtenir des spectres de bonne qualité. Néanmoins, il est tout à fait possible d'obtenir des spectres exploitables dès lors que la molécule d'intérêt présente une dynamique d'interaction suffisamment grande avec les SUV²⁴⁵. L'ajout de SUV anioniques à la solution aqueuse de Pep19 a occasionné un élargissement significatif des pics sur les spectres RMN 1D ¹H à un ratio molaire peptide – SUV (lipide) de 1 : 0,4 (Figure 73). Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'élargissement des résonances sur les spectres 1D ¹H indiquent que le Pep19 est en échange rapide entre la forme libre et la forme complexée à l'échelle de temps de la RMN.

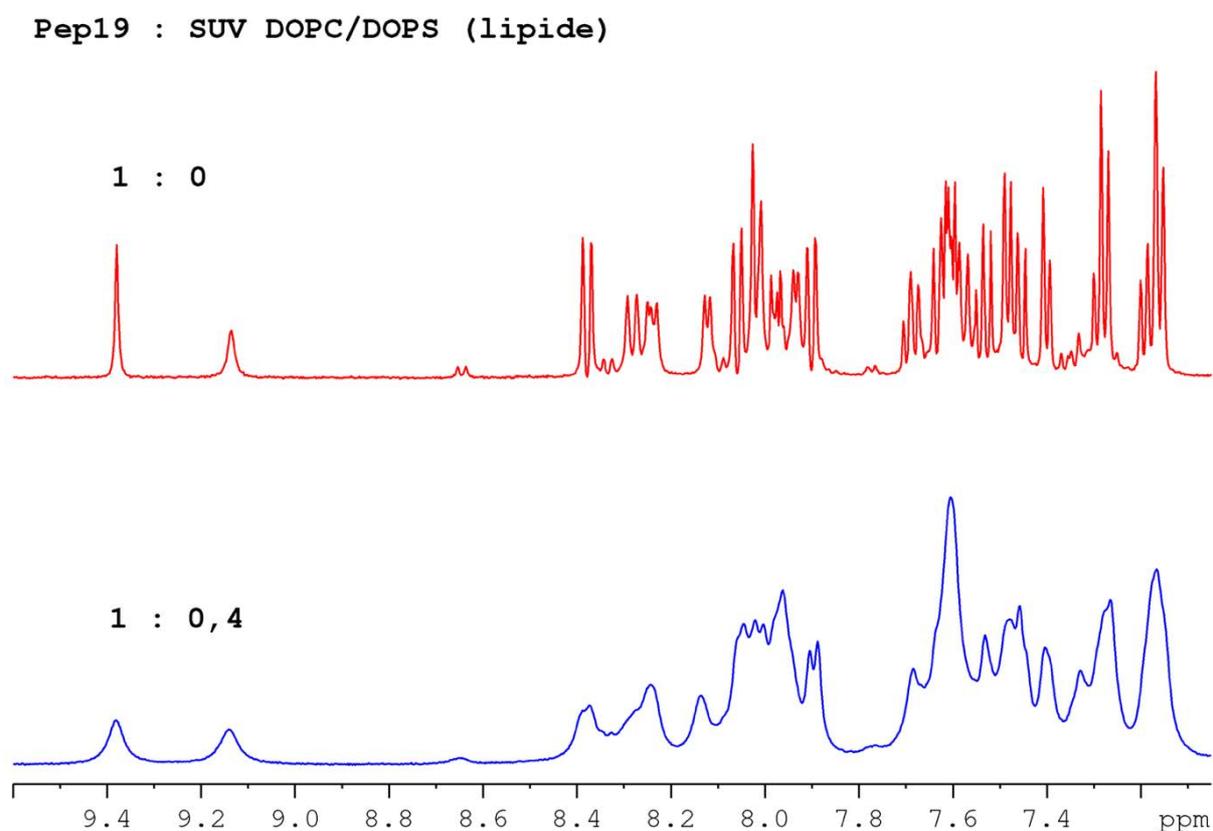


Figure 73 : Portion du spectre RMN ¹H du Pep19 (rouge) et portion du spectre RMN ¹H du Pep19 (2 mM) en présence de SUV anioniques (DOPC/DOPS : 0,8 mM) (bleu) – Ratio molaire peptide : SUV (lipide) de 1 : 0,4 - (90 % H₂O – 10 % D₂O - 318K – pH 4,5)

Dès lors que l'élargissement des résonances sur le spectre 1D ^1H était suffisamment important, nous avons pu envisager d'obtenir une structure tridimensionnelle du Pep19 en présence de SUV anioniques. Nous avons donc utilisé la même méthodologie que celle employée pour l'étude structurale en présence de micelles de LPS. Par conséquent, nous avons enregistré des spectres Tr-NOESY à un ratio molaire Pep19 : SUV (lipide) de 1 : 0,4 (Figure 74). Nous pouvons observer sur la Figure 74, que de nombreux pics croisés négatifs ont été détectés en Tr-NOESY en présence des SUV. Pour rappel, le spectre NOESY du Pep19 dans l'eau exempt de modèles membranaires aboutit à un spectre dénué de pics de corrélation.

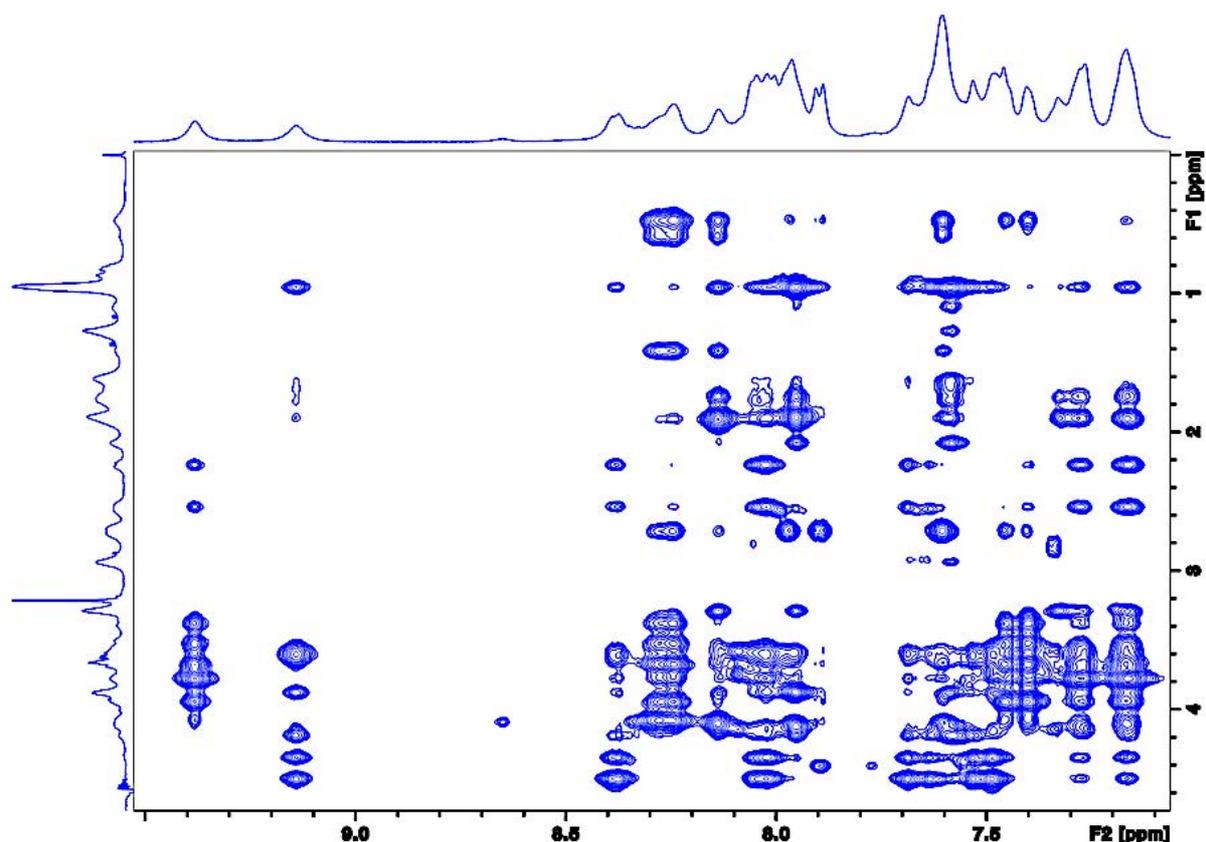


Figure 74 : Portion du spectre RMN 2D ^1H - ^1H Tr-NOESY du Pep19 en présence de SUV anioniques (DOPC/DOPS) – Ratio molaire peptide : SUV (lipide) de 1 : 0,4 - (90 % H₂O - 10 % D₂O - 318K - pH 4,5) – Les concentrations molaires en Pep19 et DOPC/DOPS sont respectivement de 2 mM et 0,8 mM

La présence des pics croisés négatifs sur le spectre Tr-NOESY confirme que le Pep19 est en interaction dynamique avec les SUV à l'échelle de temps des déplacements chimiques de la RMN.

Pour réaliser la détermination de la structure tridimensionnelle du Pep19 en présence de SUV anioniques nous avons utilisé les mêmes structures initiales que celles utilisées lors de l'étude en présence de micelles de LPS. Par conséquent, après avoir évalué les contraintes de distances

et lancé le calcul des 100 structures via le logiciel de modélisation AMBER³²⁴, nous avons retenu les 20 structures de plus basse énergie ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å (Figure 75).

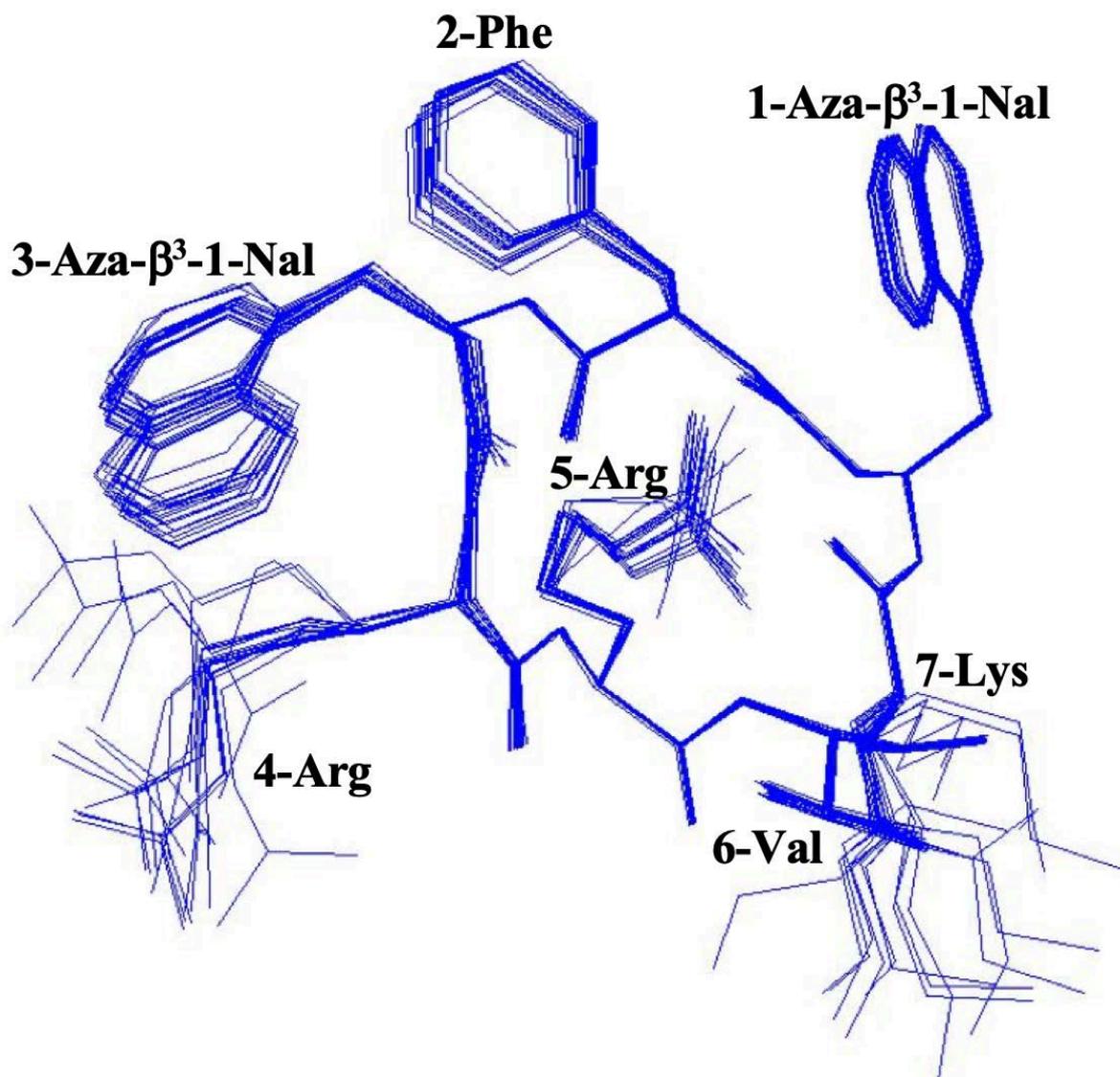


Figure 75 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS (70/30) et ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å. La superposition des 20 structures est réalisée à partir de MOLMOL³²⁸

Les 20 structures de plus basse énergie représentées à la Figure 75 sont considérées comme représentatives du Pep19 lorsqu'il s'associe aux SUV de DOPC/DOPS. Cette détermination structurale a été effectuée à partir de 108 contraintes de distances. Comme pour l'étude en présence de micelles de LPS, les NOE intra-résidus que nous avons utilisés pour le calcul de la structure correspondent aux deux résidus aza- β^3 . Les données structurales sont résumées dans le Tableau 18. Seuls les atomes lourds composant le squelette du cycle peptidique ont été utilisés pour la superposition des 20 structures à partir de MOLMOL³²⁸ (Figure 75). Dans ces

conditions un RMSD de 0,069 Å a été obtenu témoignant ainsi d'une structure bien définie. Le RMSD était de 0,718 Å avec l'ensemble des atomes lourds du cycle. Les extrémités des chaînes latérales des résidus 4 ARG et 7 LYS présentent une libre orientation en raison de l'absence de pics croisés Tr-NOE entre ces extrémités et le squelette peptidique ce qui explique que le RMSD augmente fortement. Sur les 20 structures de plus basse énergie ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å les deux résidus aza- β^3 -1-naphthylalanines ont adoptés une configuration R. Nous pouvons observer sur la Figure 76 que toutes les liaisons peptidiques sont restées dans une configuration « trans ».

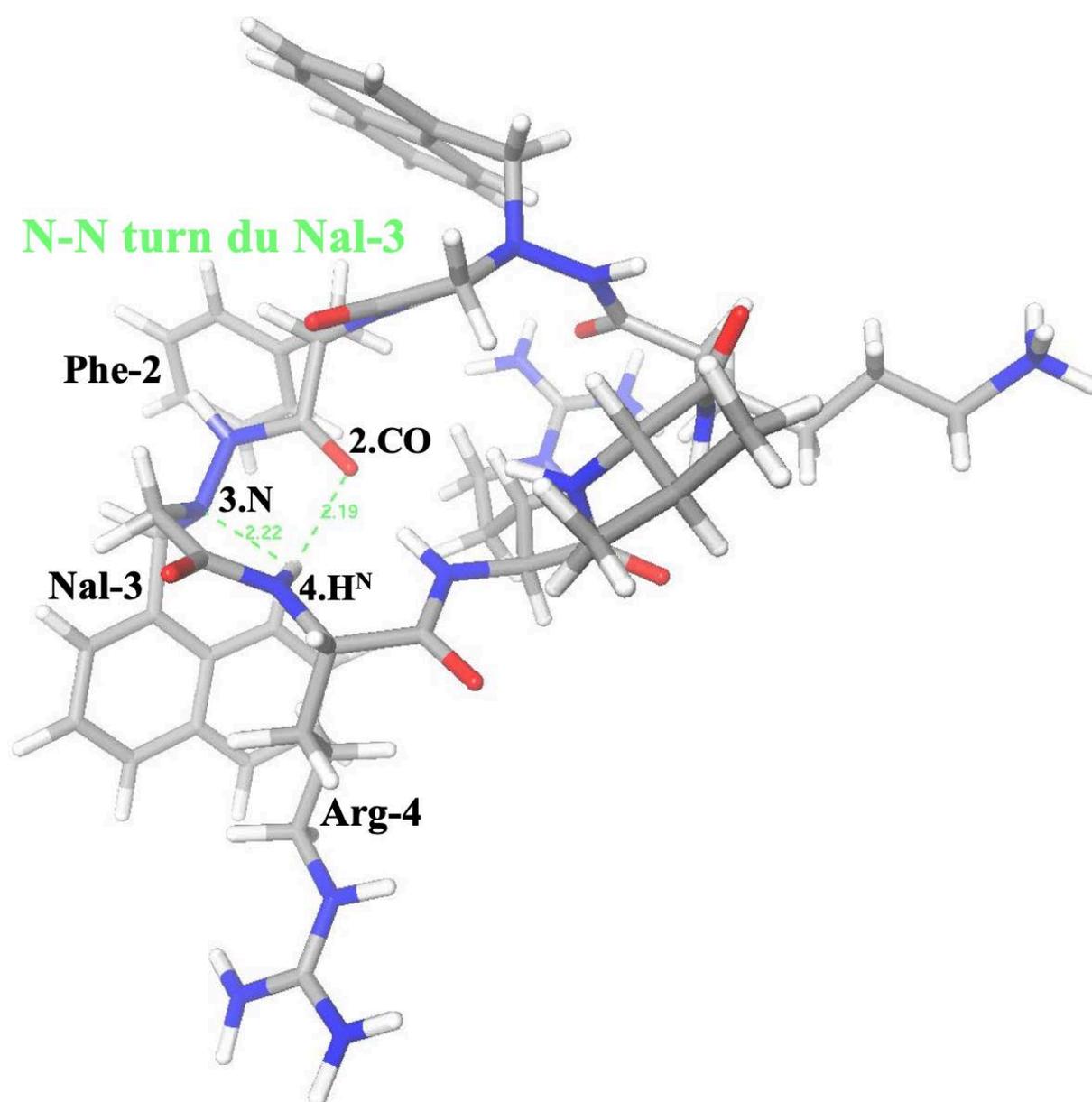


Figure 76 : Structure d'énergie la plus basse du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS (70/30) avec représentation du réseau de liaisons hydrogène formant le pseudocycle bifide à huit chaînons (N-N-turns) du Nal-3

Nous pouvons également observer sur la Figure 76 que la structure tridimensionnelle du Pep19 obtenue en présence de SUV anioniques présente le même réseau interne de liaison hydrogène formant les pseudocycles bifides à huit chaînons que nous avons identifié précédemment (N-N turns). L'hydrazinoturn impliquant le résidu Nal-3 est représenté sur la Figure 76 avec la distance des liaisons hydrogène impliqués.

Les angles dièdres déterminés sont positionnés dans les zones autorisées par le diagramme de Ramachandran (Figure 77). En effet, 42,8 % se situent dans les régions généreusement autorisées tandis que les 57,2 % restant se situent dans les régions les plus favorables et les régions supplémentaires autorisées.

Les moyennes des angles dièdres Phi (φ), Thêta (θ) et Psi (ψ) des 20 structures de plus basse énergie sont listées dans le Tableau 17 :

Résidu	Phi (φ)	Thêta (θ)	Psi (ψ)
1 NAL	114 \pm 1	- 133,5 \pm 2	17 \pm 1
2 PHE	- 61 \pm 2	/	140 \pm 4
3 NAL	97 \pm 3	- 101 \pm 3	- 2 \pm 4,5
4 ARG	- 141 \pm 4	/	- 4 \pm 7
5 ARG	- 65 \pm 2	/	- 45 \pm 2
6 VAL	64 \pm 1	/	- 14 \pm 1
7 LYS	- 69,5 \pm 1	/	57 \pm 1

Tableau 17 : Moyennes des angles dièdres des 20 structures de plus basse énergie

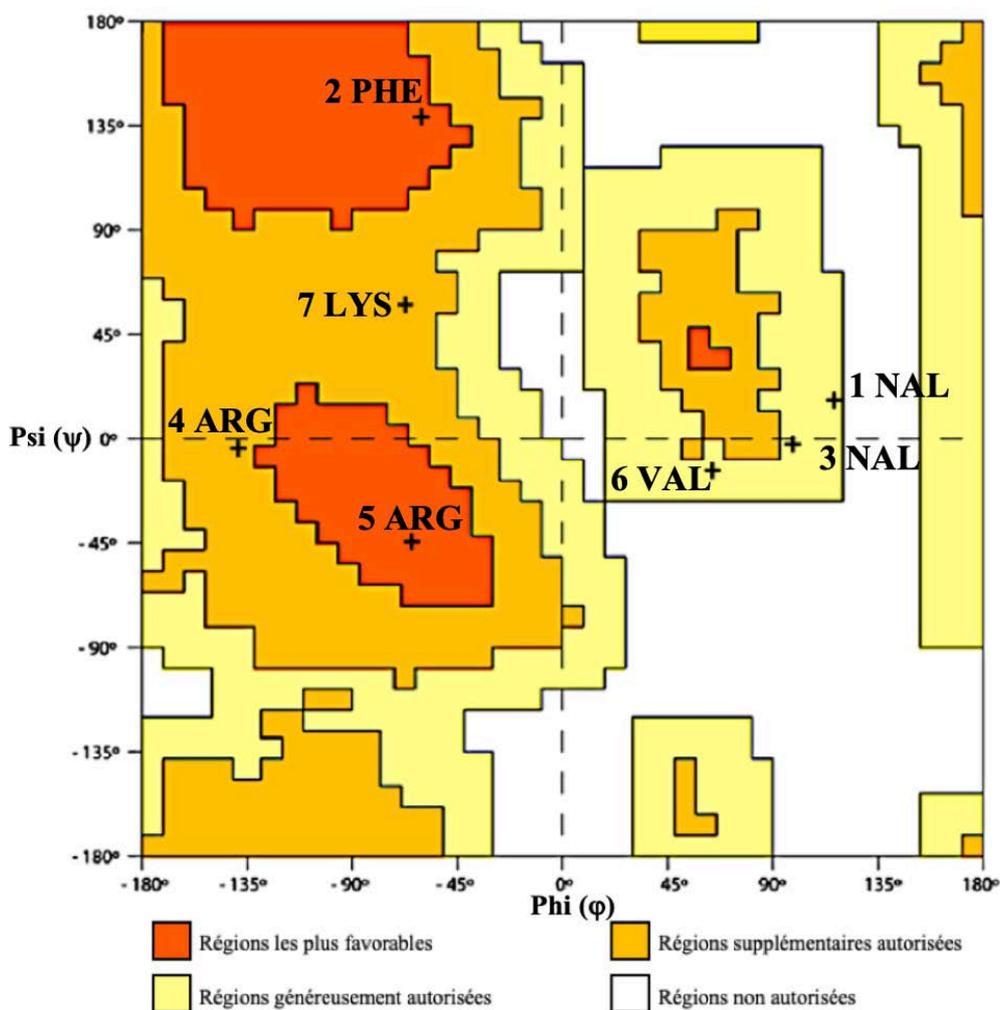


Figure 77 : Diagramme de Ramachandran de la moyenne des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS (70/30)

<u>Contraintes de distances</u>	
Total :	108
Non ambigus :	34
Ambigus :	74
Intra-résidu :	36
<u>Violations des contraintes</u>	
Violations de distances > 0.3 Å	0
<u>Diagramme de Ramachandran</u>	
Régions les plus favorables	28,6 %
Régions supplémentaires autorisées	28,6 %
Régions généreusement autorisées	42,8 %
Régions non autorisées	0 %
<u>RMSD (Å)</u>	
Atome du Squelette	0,069
Atomes lourds du peptide (C/O/N)	0,718

Tableau 18 : Résumé des données structurales et des statistiques du Pep19 en présence de SUV anioniques composées de DOPC/DOPS (70/30)

3.6.3 Utilisation de SUV zwitterioniques DOPC

Nous avons vu que les procaryotes disposent d'une membrane globalement chargée négativement. En revanche, les eucaryotes disposent d'une membrane externe essentiellement composée de phospholipides zwitterioniques, c'est pourquoi pour mimer la membrane des eucaryotes nous avons utilisé des SUV composés uniquement de DOPC¹⁵⁴. La procédure utilisée est la même que précédemment, seul le modèle membranaire change. Nous avons par conséquent ajoutés des SUV zwitterioniques à la solution aqueuse de Pep19 jusqu'à obtenir un élargissement des pics de résonances ¹H. Nous observons un élargissement relativement significatif pour un ratio Pep19 : SUV (lipide) de 1 : 3 (Figure 78). Néanmoins, nous pouvons apercevoir un début d'élargissement des résonances pour un ratio de 1 : 1. La concentration en SUV (lipide) est définie de telle sorte que l'élargissement des pics de résonances ¹H est suffisamment important. Un ratio plus petit par rapport aux SUV anioniques est observé et sera discuté plus loin.

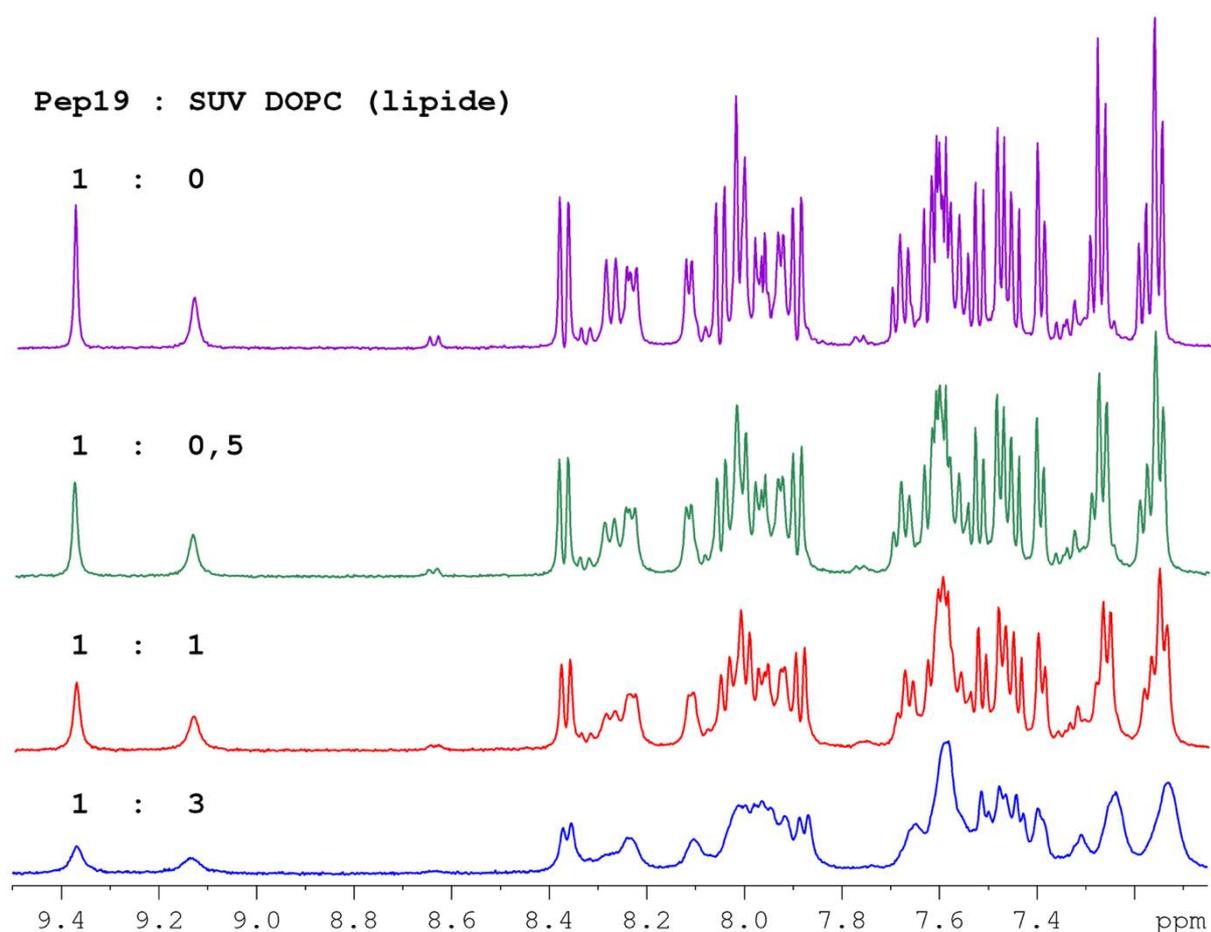


Figure 78 : Portions de spectres RMN ¹H du Pep19 en présence de concentrations croissantes en SUV zwitterioniques de DOPC (90 % H₂O - 10 % D₂O - 318K - pH 4,00). Les ratios molaires Pep19 - DOPC (lipide) sont indiqués sur chaque spectre. Sur la dernière portion de spectre (bleu), les concentrations molaires en Pep19 et DOPC (lipide) sont respectivement de 2 mM et 6 mM

De nombreux pics croisés négatifs ont été détectés en Tr-NOESY en présence des SUV de DOPC à un ratio molaire Pep19 : SUV (lipide) de 1 : 3 (Figure 79).

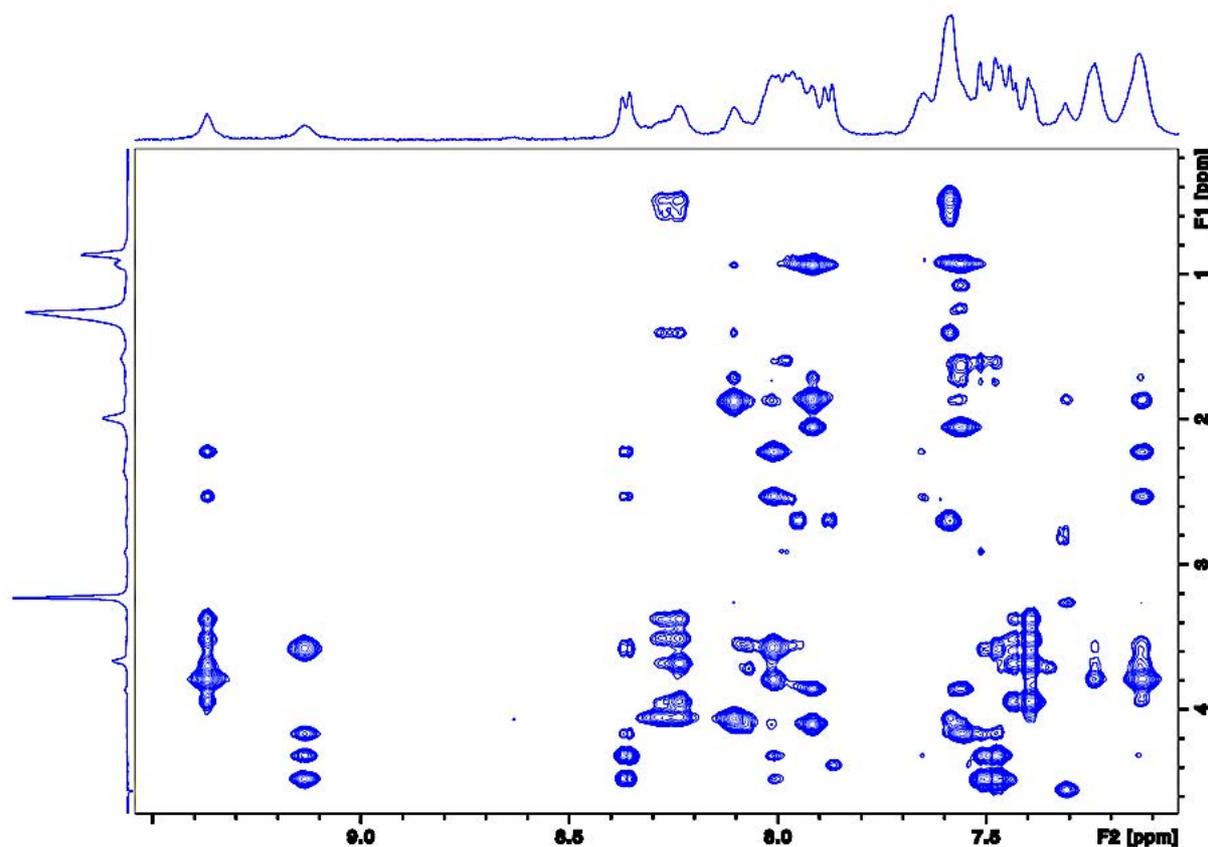


Figure 79 : Portion de spectre RMN 2D ^1H - ^1H Tr-NOESY du Pep19 (2 mM) en présence de SUV zwitterioniques (6 mM) (DOPC) – Ratio molaire peptide : SUV de 1 : 3 - (90 % H_2O – 10 % D_2O - 318K – pH 4,00) - Les concentrations molaires en Pep19 et DOPC sont respectivement de 2 mM et 6 mM

Suite à l'évaluation des contraintes de distances et le calcul des 100 structures effectué avec le logiciel de modélisation AMBER³²⁴, nous avons retenu les 14 structures de plus basse énergie ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å (Figure 80).

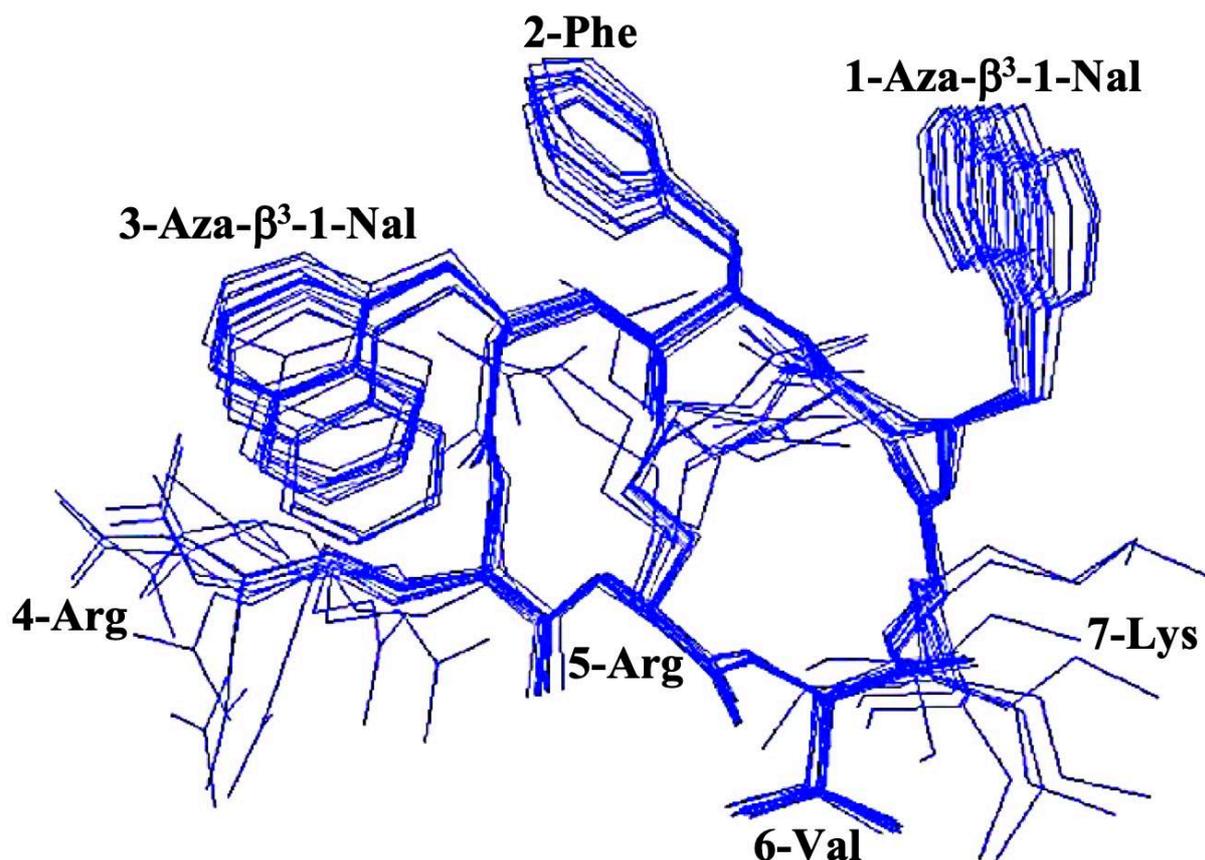


Figure 80 : Superposition des 14 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC et ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å. La superposition des 14 structures est réalisée à partir de MOLMOL³²⁸

La modélisation moléculaire a été effectuée à partir de 76 contraintes de distances. Les NOE intra-résidus retenus sont tous associés aux deux résidus aza- β^3 . Seuls les atomes lourds composant le squelette peptidique sont utilisés dans le cadre de la superposition des 14 structures (Figure 80) permettant d'obtenir un RMSD de 0,131 Å. Le RMSD s'élève à 0,916 Å lorsqu'on utilise l'ensemble des atomes lourds du peptide. Ici encore, il y a absence de pics de corrélations Tr-NOE entre les extrémités des chaînes latérales des résidus cationiques avec le squelette peptidique ce qui engendre une libre orientation de ces chaînes latérales expliquant ainsi l'augmentation du RMSD lorsque l'ensemble des atomes lourds sont pris en compte. L'ensemble des liaisons peptidiques sont en configuration « trans » (Figure 81) et les deux résidus aza- β^3 -1-naphthylalanine présentent une configuration R sur les 14 structures de plus basse énergie.

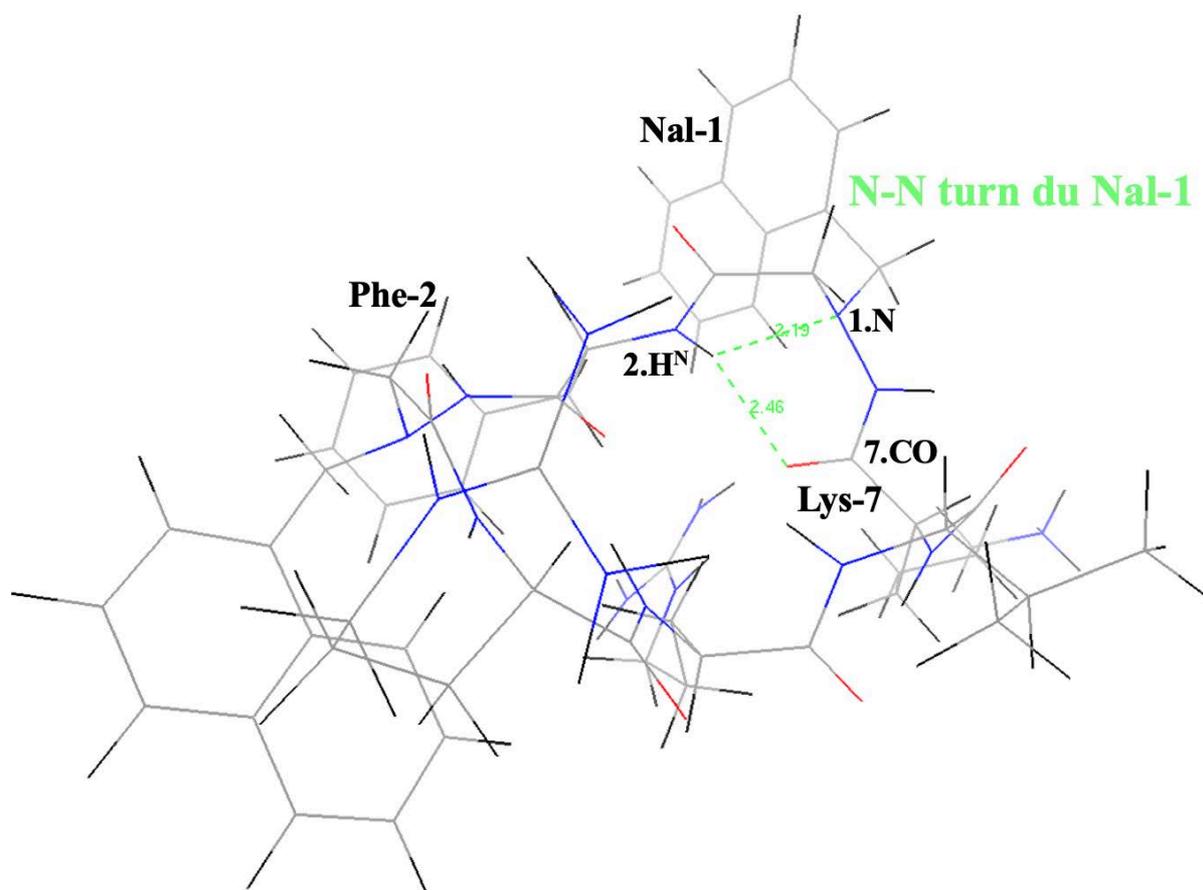


Figure 81 : Structure d'énergie la plus basse du Pep19 en interaction avec les SUV de DOPC sur laquelle est représenté le réseau de liaisons hydrogène formant le pseudocycle bifide à huit chaînons (N-N-turns) du Nal-1

Dans le cas des SUV de DOPC, le Pep19 présente le pseudocycle bifide à huit chaînons du Nal-1 que nous avons identifié dans la partie « Utilisation de micelles de LPS ». Celui-ci est mis en évidence sur la Figure 81 avec la distance des liaisons hydrogène impliquées. Le pseudocycle bifide à huit chaînons du Nal-3 est moins bien défini. En comparaison avec les autres systèmes membranaires on s'aperçoit que l'intensité des signaux NOE transférés est globalement plus faible. Ainsi, la carte 2D Tr-NOESY en présence de DOPC est moins riches en NOE et avec des intensités plus faibles qu'en présence de SUV anioniques (DOPC/DOPS) comme nous pouvons l'observer sur les spectres Figure 74 : DOPC/DOPS et Figure 79 : DOPC. Par conséquent, un nombre plus petit de contraintes de distance ont été utilisées pour la modélisation moléculaire en présence de SUV de DOPC. Cette baisse peut être associée à la plus faible affinité du peptide pour des SUV zwitterioniques. Il est vraisemblable que ça ne favorise pas une bonne définition des structures par manque d'information de contraintes.

Les angles dièdres (Tableau 19) Phi (φ) et Psi (ψ) sont dans les zones autorisées par le diagramme de Ramachandran à l'exception des angles φ et ψ du résidu 1-Nal à la limite de la zone autorisée (Figure 82). La présence de ce point dans les régions non autorisées par le diagramme de Ramachandran pourrait aussi s'expliquer par la plus faible affinité du Pep19 pour les SUV de DOPC.

Résidu	Phi (φ)	Thêta (θ)	Psi (ψ)
1 NAL	124 ± 3	-113 ± 9	$11 \pm 4,5$
2 PHE	-67 ± 3	/	162 ± 2
3 NAL	83 ± 2	-109 ± 4	4 ± 9
4 ARG	-146 ± 5	/	-1 ± 9
5 ARG	-74 ± 4	/	-30 ± 4
6 VAL	66 ± 1	/	-27 ± 3
7 LYS	-71 ± 1	/	61 ± 2

Tableau 19 : Moyennes des angles dièdres des 14 structures de plus basse énergie

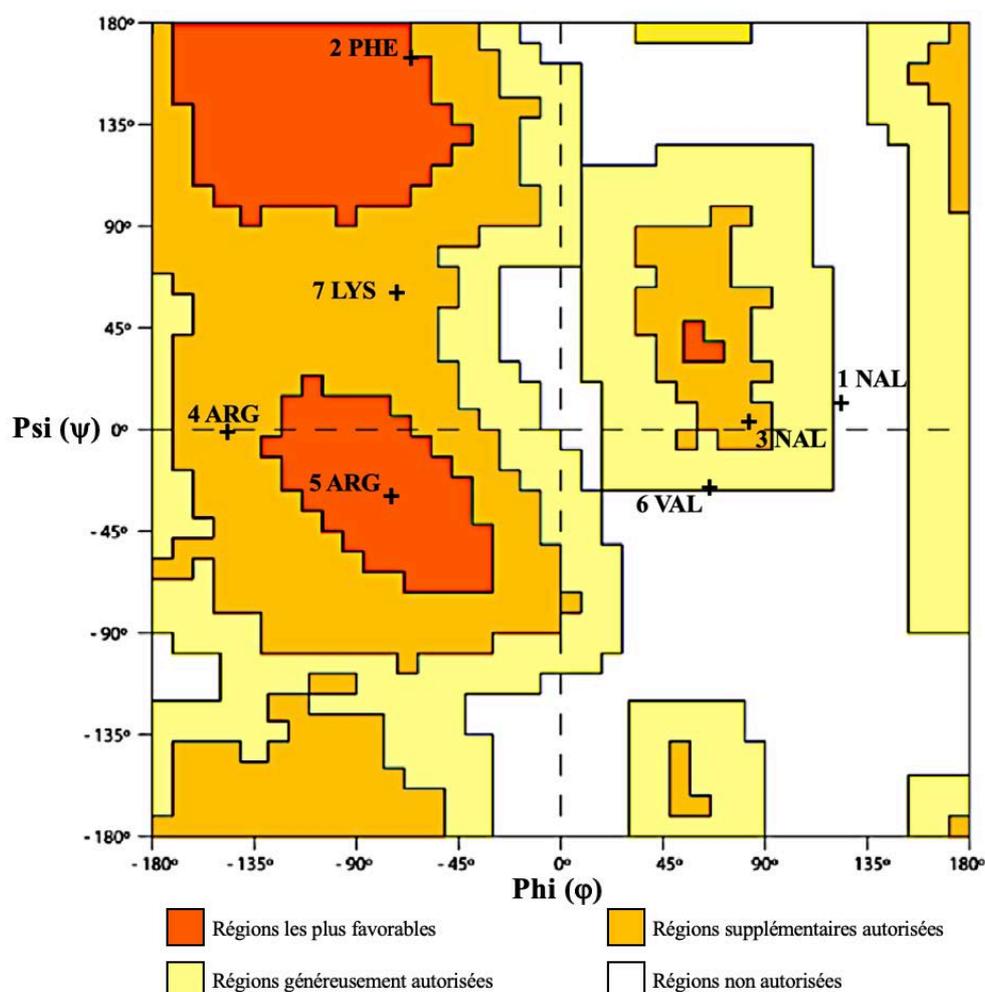


Figure 82 : Diagramme de Ramachandran de la moyenne des 14 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC

<u>Contraintes de distances</u>	
Total :	76
Non ambiguës :	30
Ambiguës :	46
Intra-résidu :	28
<u>Violations des contraintes</u>	
Violations de distances > 0.3 Å	0
<u>Diagramme de Ramachandran</u>	
Régions les plus favorables	28,57 %
Régions supplémentaires autorisées	42,85 %
Régions généreusement autorisées	14,29 %
Régions non autorisées	14,29 %
<u>RMSD (Å)</u>	
Atome du Squelette	0,131
Atomes lourds du peptide (C/O/N)	0,916

Tableau 20 : Résumé des données structurales et des statistiques du Pep19 en présence de SUV zwitterioniques composées de DOPC

3.7 Extension de la méthodologie au Pep16

La méthodologie employée précédemment allant de l'attribution des déplacements chimiques ^1H à la détermination de la structure tridimensionnelle sous contraintes de distances RMN a été utilisée dans le cas du Pep16, c'est pourquoi nous ne la détaillerons pas ici. Bien évidemment, l'attribution des pseudopeptides dans lesquels sont introduit des résidus aza- β^3 devient encore plus complexe lorsque le nombre de résidu aza- β^3 augmente.

Cependant, bien que le Pep16 présente un résidu aza- β^3 supplémentaire par rapport au Pep19, la méthodologie que nous avons employée précédemment dans la partie « attribution » nous a permis d'assigner les déplacements chimiques ^1H du Pep16. L'attribution a été effectuée en présence de différents milieux membranaires à savoir les micelles de détergents à base de SDS (Tableau 21), de DPC (Tableau 22) et de LPS (Tableau 23).

AA	H ^N	H _{α}	H _{β}	Autres H
azaNal1	9,17	/	3,56 ; 3,93	γ 1CH 7,62 ; ϵ 1CH 7,25 ; ζ 1CH 7,71 ; ζ 2CH 7,80 ; ϵ 3CH 7,53 ; δ 3CH 7,45 ; γ 2CH 7,86 ; HS 3,47 ; 3,56
F2	8,61	4,60	2,55 ; 2,89	δ CH 6,52 ; ϵ CH 6,65 ; ζ CH 6,65
azaNal3	9,56	/	4,24 ; 4,31	γ 1CH 8,08 ; ϵ 1CH 7,69 ; ζ 1CH 7,87 ; ζ 2CH 7,78 ; ϵ 3CH 7,44 ; δ 3CH 7,38 ; γ 2CH 7,94 ; HS 3,72 ; 3,84
R4	9,07	4,21	1,78 ; 1,84	γ CH ₂ 1,54 ; δ CH ₂ 2,59 ; 2,72 ; ϵ NH 6,99
R5	8,36	4,26	1,79	γ CH ₂ 1,64 ; δ CH ₂ 3,18 ; ϵ NH 7,13
azaV6	8,81	/	3,02	γ CH ₃ 0,96 ; HS 3,32 ; 3,46
K7	8,17	3,79	1,08	γ CH ₂ 0,74 ; δ CH ₂ 1,20 ; ϵ CH ₂ 2,42 ; 2,51 ζ NH ₂ 7,24

Tableau 21 : Déplacements chimiques ^1H du Pep16 (3,22 mM) en présence de micelles de SDS (97,22 mM) à 303 K - pH 5,7

AA	H ^N	H _α	H _β	Autres H
azaNal1	9,56	/	3,86	γ1CH 7,54 ; ε1CH 7,33 ; ζ1CH 7,73 ; ζ2CH 7,90 ; ε3CH 7,57 ; HS 3,47 ; 3,34
F2	8,69	4,65	2,77 ; 3,18	δCH 6,53
azaNal3	10,32	/	4,28	γ1CH 8,10 ; ε1CH 7,78 ; ζ1CH 7,91 ; ζ2CH 7,86 ; ε3CH 7,49 ; δ3CH 7,44 ; γ2CH 7,94 ; HS 3,71
R4	9,23	4,02	1,63	γCH ₂ 1,53
R5	8,40	4,29	1,71	γCH ₂ 1,61 ; δCH ₂ 3,15
azaV6	9,17	/	3,04	γCH ₃ 0,96 ; HS 3,27 ; 3,49
K7	8,13	3,77	1,02 ; 1,18	γCH ₂ 0,80 ; δCH ₂ 1,30 ; εCH ₂ 2,56 ζNH ₂ 7,66

Tableau 22 : Déplacements chimiques ¹H du Pep16 (2,25 mM) en présence de micelles de DPC (85,21 mM) à 298 K - pH 5,7

AA	H ^N	H _α	H _β	Autres H
azaNal1	9,34	/		γ1CH 7,62 ; ε1CH 7,29
F2	8,69	4,54	2,89 ; 2,65	δCH 6,66 ; εCH 6,86 ; ζCH 6,86
azaNal3	9,87	/	4,24 ; 4,06	γ1CH 7,96 ; ε1CH 7,62 ; ζ1CH 7,83 ; γ2CH 7,94 ; HS 3,76 ; 3,64
R4	9,00	4,11	1,78	γCH ₂ 1,59 ; δCH ₂ 3,06
R5	8,37	4,30	1,84 ; 1,73	γCH ₂ 1,59 ; δCH ₂ 3,2
azaV6	9,14	/	3,08	γCH ₃ 0,99 ; HS 3,47 ; 3,38
K7	8,11	3,80	1,16	

Tableau 23 : Déplacements chimiques ¹H du Pep16 (2,13 mM) en présence de micelles de LPS (0,0196 mM) à 283 K - pH 5

Bien que nous ayons obtenus des spectres de très bonnes qualités (Figure 83) nous n'avons pas réussi à déterminer une structure tridimensionnelle du Pep16 qui converge. Différents solvants organiques (trifluoroéthanol : TFE, Méthanol : MeOH et diméthylsulfoxyde : DMSO) ont également été utilisé néanmoins aucune structure tridimensionnelle n'a pu être déterminée. Le Pep16 est composé de trois résidu aza-β³ dont les chaînes latérales sont portées par des atomes d'azote pyramidaux avec une configuration variable, aussi il est possible qu'il n'existe pas une structure unique en solution. Une interconversion est possible entre les différentes structures associées à la présence des trois hydrazinoturns. Les NOE observés seraient alors une moyenne des distances entre les protons selon les différentes structures, et ceci expliquerait l'absence de

convergence lors des modélisations. Des études en température pourraient être envisagées pour essayer de ralentir les interconversions ou favoriser une structure.

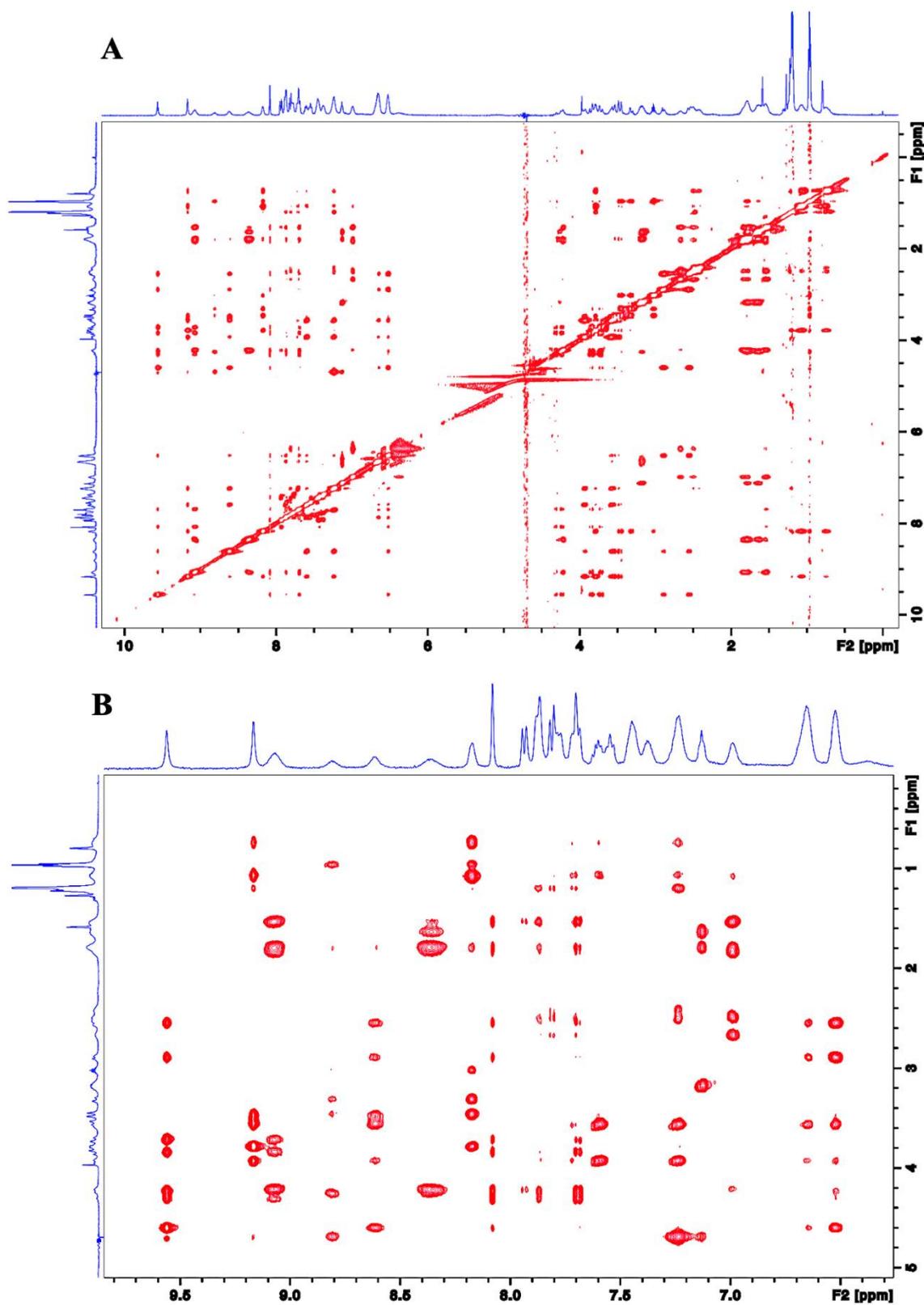


Figure 83 : Spectre RMN 2D ^1H - ^1H NOESY du Pep16 en présence de micelles de SDS (97 mM) (A) et zoom d'une portion du spectre RMN 2D ^1H - ^1H NOESY (B)

4 Discussion

Avant mon arrivé en thèse, les structures tridimensionnelles du Pep18 modérément actif et du Pep19 fortement actif avaient déjà été déterminées dans un environnement micellaire à base de détergent (SDS) (Figure 84)¹¹. Dans la littérature, les micelles de détergent (SDS ou DPC) ont été largement utilisées, cependant il est très souvent reporté que les micelles de détergents sont relativement peu biomimétiques des véritables membranes²¹⁵. L'un de mes objectifs au cours de cette thèse était d'apporter une contribution dans la caractérisation des relations existantes entre les composés antimicrobiens et les bactéries en étudiant la structure peptidique en présence de divers modèles membranaires biomimétiques. Nous discutons dans cette partie des structures tridimensionnelles du Pep18 et Pep19 en présence de micelles de SDS ainsi que de l'affinité du Pep19 pour les membranes anioniques. Je vais également discuter des structures tridimensionnelles du Pep19 déterminées dans 4 environnements membranaires en liaison avec le mécanisme d'action du Pep19.

Les micelles de détergents constituent le modèle qui est généralement utilisé en première intention dans la détermination structurale en RMN du liquide. Les superpositions des 20 structures de plus basse énergie qui ont été obtenues pour le Pep19 et le Pep18 par modélisation moléculaire en utilisant des contraintes de distances RMN sont représentées à la Figure 84¹¹.

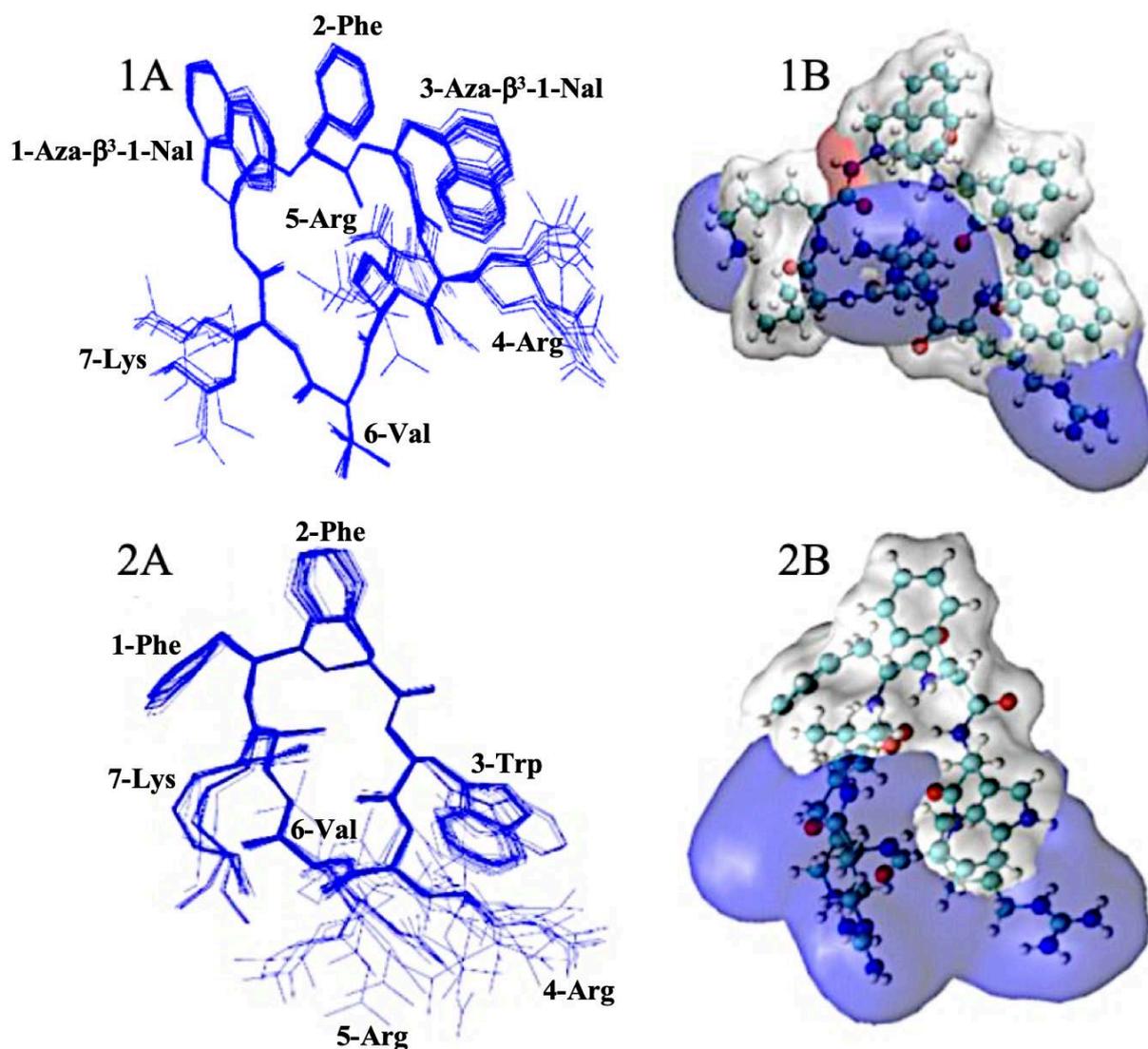


Figure 84 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie du Pep19 (1A) et du Pep18 (2A) obtenues en présence de micelles de SDS. Représentation des cartes de surfaces de potentiel électrostatique (1B = Pep19 et 2B = Pep18). D'après Nicolas, 2019¹¹

Dans la description des structures des peptides, nous avons mis en évidence que le Pep19 et le Pep18 ne diffèrent qu'au niveau des résidus 1 et 3. Néanmoins, bien que ces deux peptides ne présentent que deux résidus distincts dans leurs séquences, nous constatons sur les structures tridimensionnelles en micelles de SDS présentées à la Figure 84 des différences majeures. En effet, lorsque l'on regarde la superposition des 20 structures de plus basse énergie (Figure 84 - 1A = Pep19 et 2A = Pep18) nous pouvons remarquer que les 3 cycles aromatiques du Pep19 forment des interactions d'empilement π (ou empilement π - π). De plus le domaine hydrophobe du Pep19 est bien étendu contrairement au Pep18. Lorsque l'on regarde les cartes de surfaces de potentiel électrostatique (Figure 84 - 1B = Pep19 et 2B = Pep18), nous pouvons observer que le Pep18 présente un caractère amphipathique bien prononcé avec ces trois charges

cationiques regroupées. En revanche, pour le Pep19, on remarque que les trois charges cationiques sont dispersées en forme de trépied¹¹.

Il semblerait que les différences observées sur les structures tridimensionnelles de ces deux peptides soient pertinentes avec les modes d'actions décrit pour la majorité des PAM¹⁵¹⁻¹⁵³. En effet, les différences observées sur les cartes de surfaces de potentiel électrostatique de ces deux peptides montrent des différences au niveau de la répartition des charges qui guide l'attraction avec la membrane et des différences au niveau des domaines hydrophobes essentiels pour l'insertion des PAM dans la membrane entraînant sa perméabilisation. Ces différences expliqueraient que le Pep18 soit modérément actif alors que son analogue, le Pep19 soit très actif.

Dans cette partie de thèse nous nous sommes intéressés à la caractérisation structurale et au mode d'action du Pep19 en présence de divers modèles membranaires considérés comme étant plus mimétiques des véritables membranes que les micelles de détergent²¹⁵. En effet, nous avons étudié et déterminé la structure tridimensionnelle du Pep19 en présence de :

- Micelles de LPS
- Petites vésicules unilamellaires (SUV) anioniques
- SUV zwitterioniques

La couche externe des membranes bactériennes est recouverte de glycoconjugués. Cette couche, appelée le glycocalix, constitue la première barrière pour toutes les interactions extérieures de la cellule que ce soit pour les antibiotiques conventionnels ou les peptides antimicrobiens. En effet, le glycocalix sélectionne les molécules pouvant atteindre les membranes cytoplasmiques³³⁸. Dans le cadre des bactéries à Gram négatif, des micelles de LPS ont été utilisées pour mimer le feuillet externe de la membrane externe qui en est recouvert à 90 %¹²². Après avoir franchi cette première barrière, les molécules doivent interagir avec la membrane cytoplasmique constituée d'une bicouche phospholipidique globalement chargée négativement¹⁵⁴. Afin de mimer cette membrane cytoplasmique nous avons donc utilisé des petites vésicules unilamellaires (SUV) anioniques constituées de DOPC et de DOPS. Dans le cadre des bactéries à Gram positif, elles sont dépourvues de membrane externe et ne présentent pas de LPS, néanmoins elles sont composées d'une enveloppe cellulaire chargée négativement¹⁵⁴. Par conséquent, l'utilisation des SUV anioniques apporte des informations

sur la spécificité d'action des PAM et sur l'interaction avec la membrane cytoplasmique. Ainsi, l'étude du Pep19 en présence de ces divers modèles membranaires devrait permettre de mieux comprendre les relations existantes entre son activité antimicrobienne et les bactéries (Gram négatif et Gram positif).

Certains PAM présentent une cytotoxicité élevée en raison d'une interaction aspécifique des acides aminés hydrophobes avec la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. Composés essentiellement de phospholipides zwitterioniques comme la phosphatidylcholine, la sphingomyéline ou la phosphatidyléthanolamine, les membranes des cellules eucaryotes présentent une charge globale neutre¹⁶⁶. De ce fait pour mimer la membrane des cellules eucaryotes nous avons utilisé des SUV zwitterioniques composé uniquement de DOPC.

L'ajout de SUV anioniques de DOPC/DOPS sur la solution aqueuse de Pep19 a provoqué un élargissement des résonances ¹H semblable à l'élargissement obtenu suite à l'ajout des SUV zwitterioniques de DOPC à un ratio molaire Pep19 : SUV (lipide) de DOPC/DOPS plus important comme nous pouvons le voir sur la Figure 85. En effet, nous pouvons observer qu'un élargissement relativement important des résonances ¹H du Pep19 est provoqué pour un ratio peptide : SUV (lipide) DOPC/DOPS de 1 : 0,4. En revanche, dans le cas des SUV de DOPC, pour observer un élargissement comparable à celui observé dans le cas des SUV de DOPC/DOPS, il était nécessaire d'ajouter une quantité bien plus importante de SUV de DOPC (Figure 85). En effet, nous pouvons observer un élargissement comparable à celui obtenu pour les SUV anioniques pour un ratio molaire Pep19 : SUV (lipide) de DOPC de 1 : 3 soit une concentration en lipide 7,5 fois plus importante (Figure 85). Les petites vésicules unilamellaires (SUV) ont été obtenues par sonication d'une solution de MLV puis contrôlée par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). Relativement homogènes, les SUV obtenues mesurées environ 100 nm.

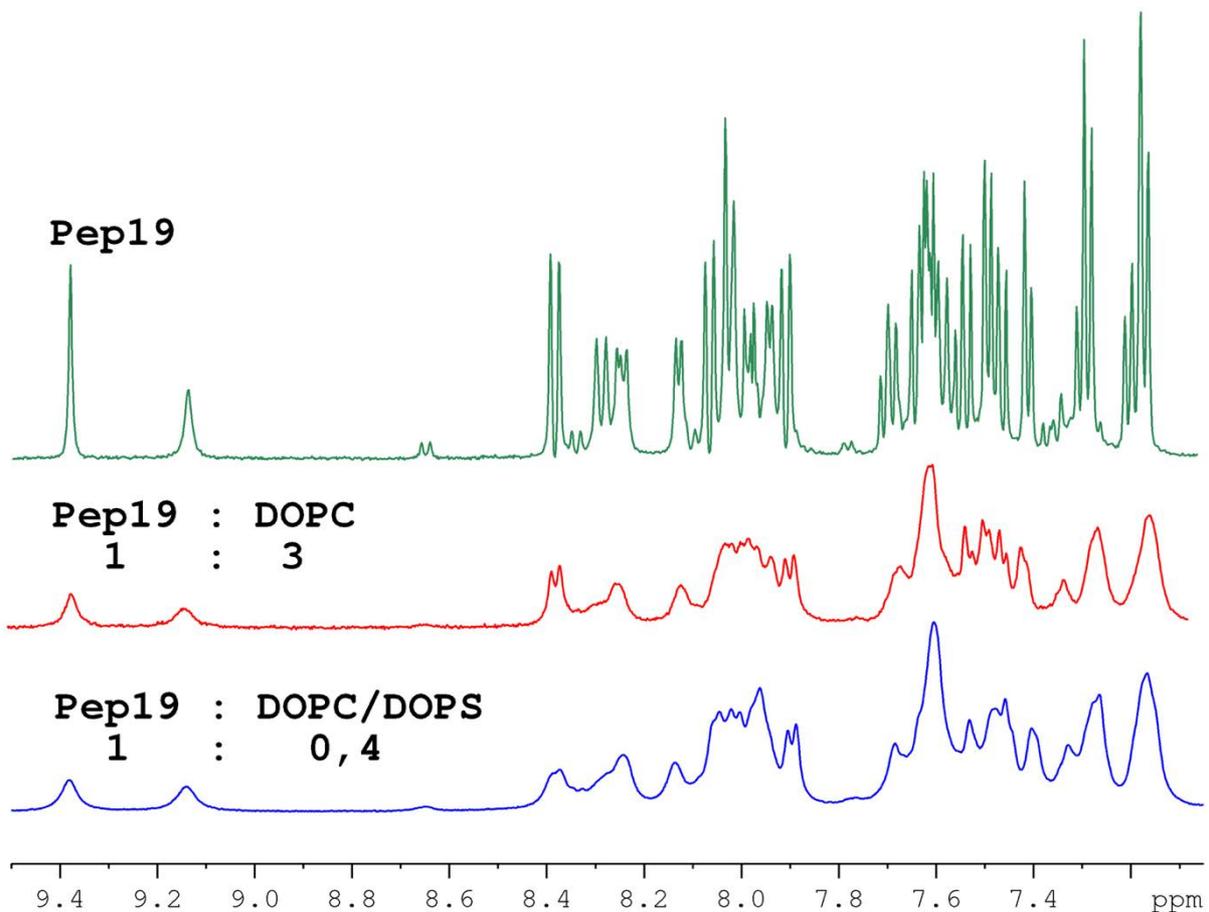


Figure 85 : Portion de spectres RMN ^1H du Pep19 (vert) en présence de SUV zwitterioniques de DOPC (rouge) et en présence de SUV anioniques de DOPC/DOPS (bleu) (90 % H_2O – 10 % D_2O - 318K). Les ratios molaires sont indiqués sur chaque spectre.

Ainsi, le Pep19 présente une affinité beaucoup plus forte pour les SUV de DOPC/DOPS chargées négativement. Nous avons vu que les SUV anioniques sont des mimes de la membrane bactérienne et que les SUV zwitterioniques sont des mimes de la membrane des cellules eucaryotes. L'affinité du Pep19 plus importante en présence de charges négatives sur les SUV de DOPC/DOPS est en accord avec la forte activité antimicrobienne du Pep19. Tandis que l'interaction plus faible pour les SUV de DOPC est en accord avec sa faible toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces résultats d'affinités sont donc parfaitement cohérents avec la forte activité antimicrobienne et la faible cytotoxicité déterminées par les tests d'activité du Pep19 sur les multiples souches bactériennes regroupant à la fois des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif¹¹. Ainsi, ces résultats d'affinités confirment que la présence des charges négatives à la surface des membranes bactériennes est un élément permettant de les différencier des membranes de cellule eucaryote.

Néanmoins, malgré cette différence d'affinité importante entre le Pep19 et les SUV de DOPC/DOPS et de DOPC, les structures tridimensionnelles sont quasiment identiques comme nous pouvons l'observer sur la Figure 86 :

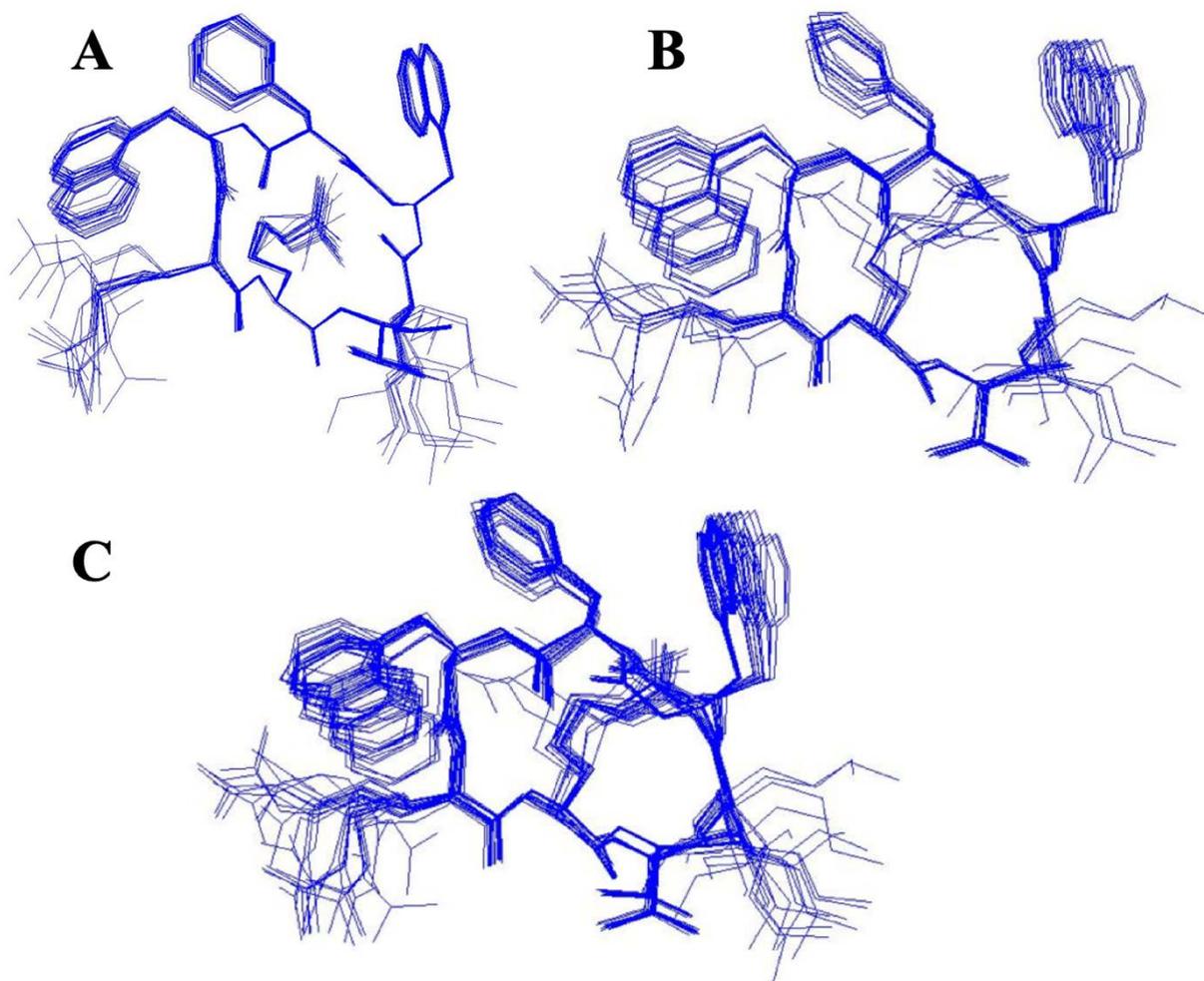


Figure 86 : Superposition des structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS (A : 20 structures) de DOPC (B : 14 structures) et superposition des 28 structures de plus basse énergie du Pep19 : 14 structures en présence de DOPC/DOPS et 14 structures en présence de DOPC (C)

Avec un RMSD de 0,199 Å obtenu pour la superposition des 28 structures de plus basse énergie (Figure 86 : C) regroupant les 14 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS et les 14 structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC, il apparaît que les structures tridimensionnelles qu'adopte le Pep19 sont semblables. Les structures déterminées en présence des deux types de SUV montrent de nombreuses similitudes avec celle qui avait été déterminée en présence de micelles de SDS¹¹ (Figure 87). Cette observation montre que les milieux hydrophobes induits par les chaînes grasses soit des phospholipides soit du détergent ne provoquent pas de changement majeur dans la structure du

Pep19. En effet, nous pouvons observer une orientation des aromatiques et des chaînes latérales cationiques relativement semblable pour ces trois structures.

Néanmoins, en fonction des modèles membranaires utilisés dans le cadre d'une détermination structurale de PAM, des structures tridimensionnelles relativement différentes peuvent être obtenues^{122,217,218}. C'est notamment le cas du Pep19 en présence de micelles de LPS pour lequel nous avons obtenu une différence significative au niveau de l'orientation du résidu Nall aboutissant à un « packing » des aromatiques différent comme nous pouvons le voir sur la Figure 87. Il est également possible d'observer une dispersion des chaînes latérales cationiques bien moins prononcée (Figure 87 - D).

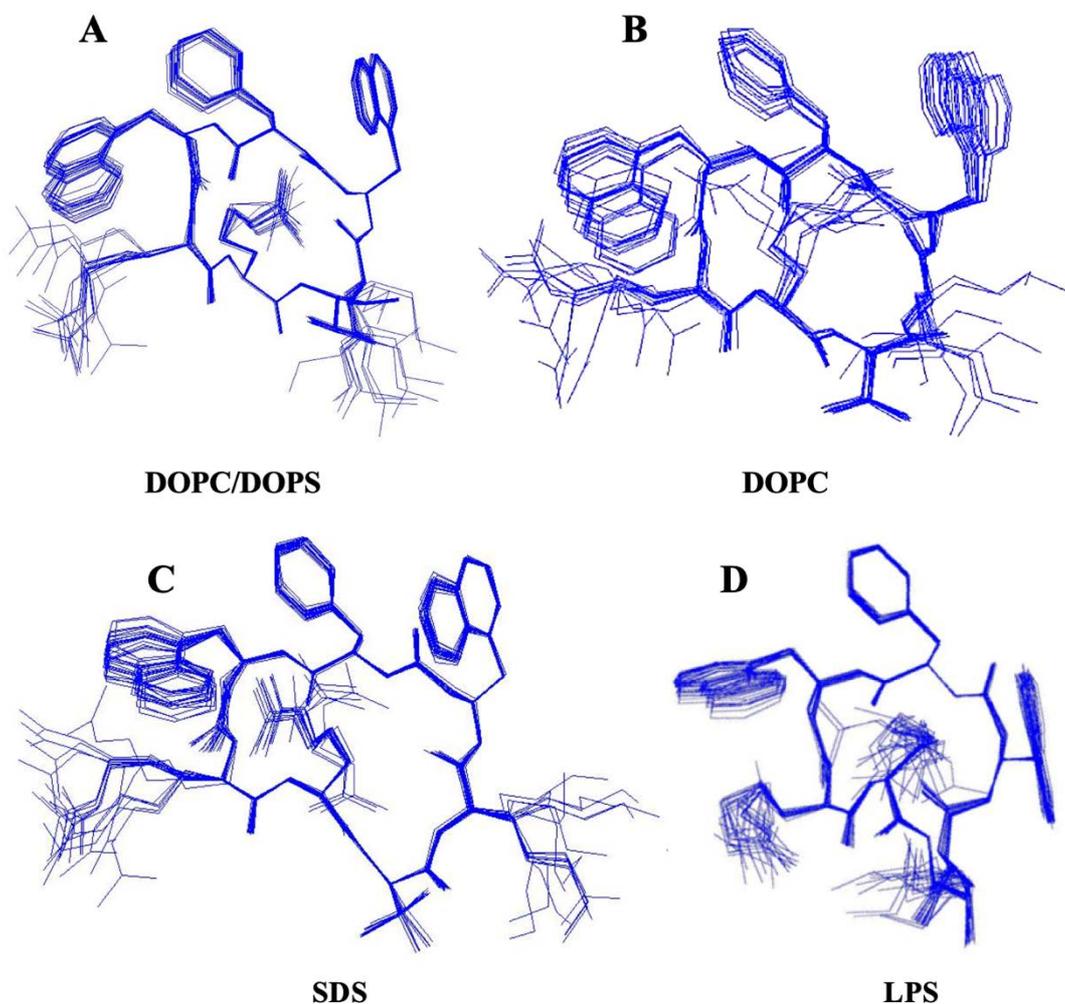


Figure 87 : Superposition des structures de plus basse énergie du Pep19 en présence de SUV de DOPC/DOPS (A : 20 structures) de DOPC (B : 14 structures) de micelles de SDS (C : 20 structures) et de LPS (D : 20 structures)

Bien que la structure tridimensionnelle du Pep19 en présence de micelles de LPS soit différente de celles obtenues en présence de micelles de SDS et de SUV nous avons observé le même réseau interne de liaison hydrogène formant les deux pseudocycles bifides à huit chaînons qualifié d'hydrazinoturns (N-N turns)¹¹⁸.

Nous avons vu que pour déterminer la structure tridimensionnelle de molécules non structurés en solution aqueuse, ce sont les micelles de détergent qui sont les plus utilisées^{214,215}. En effet, c'est encore le modèle que l'on va le plus retrouver dans la littérature pour la détermination de structure tridimensionnelle. Néanmoins, l'utilisation de ces micelles de détergent que ce soit à base de SDS²⁰⁹ pour mimer la membrane bactérienne ou bien de DPC²¹⁰ pour mimer la membrane des cellules eucaryotes ne permet pas toujours de mimer rigoureusement la membrane.

L'utilisation de micelles de LPS, majoritairement présent sur le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif permet de mimer la première interaction du peptide avec la bactérie cible. En effet, le LPS, correspondant à la première zone d'interaction, agit comme un filtre permettant de protéger la bactérie contre les agents antimicrobiens tels que les PAM¹⁰. Les structures tridimensionnelles de certains PAM ont été déterminées par RMN en présence de micelles de LPS tel que la PMB³¹⁹⁻³²², la tachyplésine I¹²², la temporine 1¹⁰.

Nous avons également utilisé comme modèle membranaire des liposomes. Ces objets sont considérés comme étant le modèle mimant le mieux les véritables membranes¹⁰. Ce modèle de membrane a amplement été utilisé dans plusieurs études employant des techniques de dichroïsme circulaire, de fluorescence ou de diffusion dynamique de la lumière³³⁹. L'utilisation de liposome en RMN est limitée pour étudier l'interaction de molécule antimicrobienne avec la membrane. Le laboratoire a déjà démontré la possibilité de travailler en condition de la RMN du liquide avec des SUV à la condition que la dynamique d'association-dissociation entre la molécule étudiée et les SUV soit assez rapide²⁶⁻²⁸. En effet, le tumbling des SUV n'est pas suffisant pour permettre une bonne détection des signaux par RMN du proton³⁴⁰. Néanmoins, en saturant totalement le peptide par des SUV et pourvu que la dynamique d'interaction soit suffisante, on peut obtenir des conditions de détection compatible avec la RMN liquide. La structure de la neurotensine a pu être résolue dans ces conditions³⁴¹. Ces conditions correspondent de fait à une dynamique d'interaction compatible avec des expériences de Tr-NOE. Au cours de ma thèse, pour parvenir à la détermination structurale tridimensionnelle du

Pep19 nous nous sommes basés sur l'échange rapide entre l'état libre du Pep19 et son état lié aux SUV en utilisant la méthode du Tr-NOE. La méthode du Tr-NOESY a été largement utilisée pour des déterminations structurales de PAM notamment avec des micelles de LPS^{10,122,319-322} mais jamais avec des SUV.

Le mécanisme d'action du Pep19 semble être très similaire à celui observé pour de nombreux PAM dans lequel intervient une première interaction électrostatique sélective entre les groupes phosphates composant les bicouches lipidiques des membranes et les acides aminés chargés positivement des peptides¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Cette première interaction est suivie d'une interaction hydrophobe entre les résidus hydrophobes des PAM et les chaînes lipophiles des phospholipides de la membrane comme il est suggéré dans les modèles qui sont les plus fréquemment rencontrés à savoir le modèle des pores en douves de tonneaux¹⁵⁴, le modèle en tapis¹⁹⁰, ou encore le modèle des pores toroïdaux¹⁵⁴. Ce mode d'interaction impliquant dans un premier temps une attraction électrostatique puis dans un second temps une interaction hydrophobe est en accord avec les résultats obtenus pour le Pep19.

Nous avons mis en évidence l'affinité du Pep19 pour les membranes chargées négativement avec l'utilisation des SUV anioniques et zwitterioniques expliquant ainsi sa forte activité antimicrobienne contre les bactéries (Gram négatif et Gram positif) et sa faible cytotoxicité¹¹. Cette affinité plus élevée du Pep19 pour les SUV anioniques est cohérente avec le fait que les PAM agissent préférentiellement sur les cellules procaryotes en raison d'une différence de composition en phospholipides des membranes des eucaryotes et procaryotes^{154,155}. Il apparaît clairement que cette affinité d'interaction du Pep19 pour les SUV anioniques est provoquée par l'attraction électrostatique. Nous avons également mis en évidence sa liaison et sa forte interaction avec le LPS. En effet, nous avons observé un élargissement des résonances ¹H sur les spectres 1D ¹H qui est constaté à une très faible concentration en LPS ainsi que la présence abondante de pics croisés Tr-NOE témoignant ainsi de la forte interaction et de la liaison du Pep19 au LPS. Ces observations sont en parfait accord avec celles observées pour d'autres peptides connus comme étant des PAM pouvant se lier au LPS comme par exemple la PMB³¹⁹⁻³²², la tachyplésine I¹²² ou la temporine 1¹⁰. Bien que l'interaction du Pep19 avec le LPS soit forte, elle reste dynamique et satisfait la condition du Tr-NOESY.

Nous avons observé de fortes similitudes entre les structures tridimensionnelles du Pep19 au niveau du « packing » des aromatiques et de la disposition des chaînes latérales cationiques en

présence des SUV anioniques et zwitterioniques mais également en présence de micelles de SDS. Étant donné que les SUV anioniques sont assimilables aux membranes des procaryotes et que les SUV zwitterioniques sont assimilables aux membranes des eucaryotes, ces fortes similitudes entre les structures déterminées impliqueraient que la présence des charges négatives des membranes bactériennes permettrait essentiellement une attraction électrostatique du Pep19. De ce fait, il semblerait que ce soit la présence de ces charges négatives qui permet au Pep19 de discriminer les membranes de cellules eucaryotes et procaryotes. Néanmoins, nous avons vu que la structure tridimensionnelle du Pep19 obtenu en présence de micelles de LPS présente des différences au niveau de la répartition des chaînes latérales cationiques et du résidu hydrophobe Nal1. Ces différences suggèrent que les acides aminés chargés positivement s'orientent de manière à interagir avec les groupes phosphates du lipide A tandis que les acides aminés hydrophobes s'orientent de manière à interagir avec les chaînes grasses du lipide A. Ces observations sont en accord avec ce qui a déjà été rapporté pour d'autre PAM^{122,322}. Par conséquent, la différence d'orientation du résidu hydrophobe Nal1 en présence de LPS est provoquée par des interactions hydrophobes différentes de celles observées en présence de SUV ou de micelles de SDS. La longueur ainsi que l'orientation des chaînes grasses du lipide A peuvent apporter une explication quant à ces différences d'interactions.

Pour conclure, la forte similitude des structures du Pep19 en présence des SUV anioniques et zwitterioniques implique que les charges à la surface des membranes bactériennes auraient seulement un rôle de filtre. La différence de structure obtenue en présence de micelles de LPS nous incitera à continuer ce travail avec des LPS de bactéries résistantes. Il serait intéressant de montrer le rôle possible des modifications du LPS dans l'interaction avec le Pep19 et de pouvoir relier d'éventuelles différences avec les variations des activités antimicrobiennes.

Chapitre III - Étude de l'interaction de galactofuranolipides avec la souche parasitaire de *Leishmania tarentolae*

Ce chapitre à fait l'objet d'une publication :

Jeane Vaugenot, **Abderrafek El Harras**, Olivier Tasseau, Rémi Marchal, Laurent Legentil, Boris Le Guennic, Thierry Benvegno, Vincent Ferrières. 6-Deoxy-6-fluoro galactofuranosides : regioselective glycosylation, unexpected reactivity, and anti-leishmanial activity. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18 (7), 1462–1475. <https://doi.org/10.1039/C9OB02596K>.

1 Introduction

1.1 Origine du terme *Leishmania*

En 1900, Sir William Leishman, officier du corps médical de l'armée britannique, fait la découverte du parasite *Leishmania* dans les frottis de la rate d'un soldat décédé de fièvre à Dum-Dum en Inde. C'est en son hommage que la dénomination *Leishmania* fut assignée. En 1903, dans une biopsie de rate, un médecin indien du nom de Charles Donovan identifia le même parasite. C'est suite à leur découverte respective et en leur honneur que le parasite fut nommé *Leishmania donovani*³⁴².

1.2 Morphologie

Le parasite *Leishmania* est un protozoaire flagellé présentant durant son cycle de vie deux stades bien distincts :

- ⇒ Les amastigotes, dépourvus de flagelle sont non mobiles.
- ⇒ Les promastigotes, possédant un flagelle, présentent une certaine mobilité.

Le parasite est retrouvé sous sa forme amastigote dans les macrophages de mammifères. Cette forme est ovoïde et mesurent entre 2 μm et 5 μm de diamètre (Figure 88). Le stade promastigote est extracellulaire et présente une forme plus ou moins fuselée mesurant entre 10 μm et 25 μm de longueur prolongée par un flagelle pouvant atteindre jusqu'à 20 μm de longueur (Figure 88). *Leishmania* est retrouvé sous cette forme dans l'intestin du phlébotome ainsi que dans les milieux de culture.

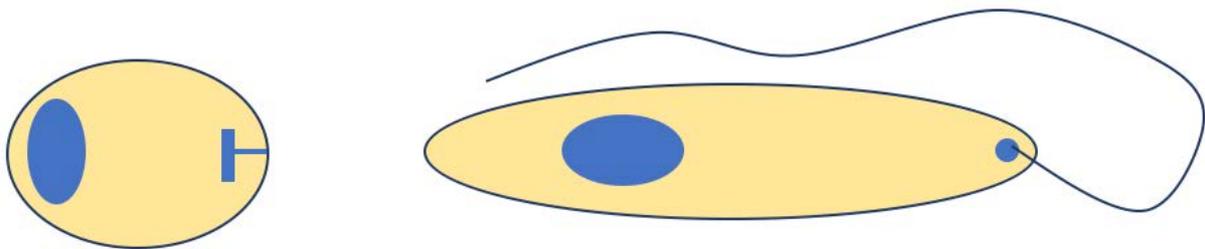


Figure 88: Morphologie des amastigotes et promastigotes de *Leishmania*

1.3 Les différentes formes cliniques de leishmanioses

Il existe plusieurs espèces de parasites et les formes cliniques de la leishmaniose dépendent de la nature de l'espèce infectieuse. La leishmaniose est connue sous trois formes cliniques différentes, à savoir la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée et la leishmaniose cutanéomuqueuse.

1.3.1 La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale, maladie tropicale nommée Kala-azar, « fièvre noire » en Indien est la forme la plus sévère de la leishmaniose. Elle est classée par l'OMS comme l'une des principales maladies parasitaires qui présente un potentiel élevé d'épidémie et de mortalité³⁴³. Provoquant une fièvre irrégulière, une perte de poids conséquente, une pancytopenie ainsi qu'une amplification du volume du foie et de la rate (hépatosplénomégalie), elle est fatale en l'absence de traitement. La leishmaniose viscérale est provoquée par les souches de *L. donovani* et *L. infantum*^{342,344}.

1.3.2 La leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée représente la forme clinique la plus courante de la pathologie. Autrefois, elle était désignée sous le nom de plaie orientale, clou de Jéricho, clou d'Alep ou clou de Delhi suivant la région. Elle est provoquée par plusieurs souches différentes telles que *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* ainsi que *L. braziliensis*. Dans cette forme clinique de leishmaniose, le parasite se développe aux alentours de la piqûre du phlébotome, engendrant principalement des ulcères sur les multiples sections du corps exposées comme par exemple les bras, les jambes ainsi que le visage. Ces ulcères finissent par se dissiper spontanément avec le temps, cependant ils laissent place à des cicatrices incommodes³⁴².

1.3.3 La leishmaniose cutanéomuqueuse

La leishmaniose cutanéomuqueuse représente une variante de la leishmaniose cutanée, c'est d'ailleurs la souche de *L. braziliensis* qui est responsable de cette forme de la pathologie. Elle

provoque de sérieuses lésions entraînant des dommages partiels ou intégraux des muqueuses de la bouche, du nez, de la gorge et des tissus à proximité³⁴².

1.4 Répartition géographique de la leishmaniose

La majorité des cas de leishmaniose cutanée se manifeste en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Colombie, en Iran, au Pakistan, au Pérou, en Arabie saoudite et en Syrie (Figure 89)³⁴⁵. Concernant la leishmaniose cutanéomuqueuse, environ 90% des cas se situent en Bolivie, au Brésil et au Pérou³⁴³.

La leishmaniose viscérale est récurrente en Afrique de l'Est (Éthiopie, Kenya, Soudan du Sud et Soudan) et provoque une morbidité et une mortalité considérables. En 2017, 94% des nouveaux cas déclarés à l'OMS se sont produits dans les sept pays suivants: Brésil, Éthiopie, Inde, Kenya, Somalie, Soudan du Sud et Soudan (Figure 89)³⁴⁵.

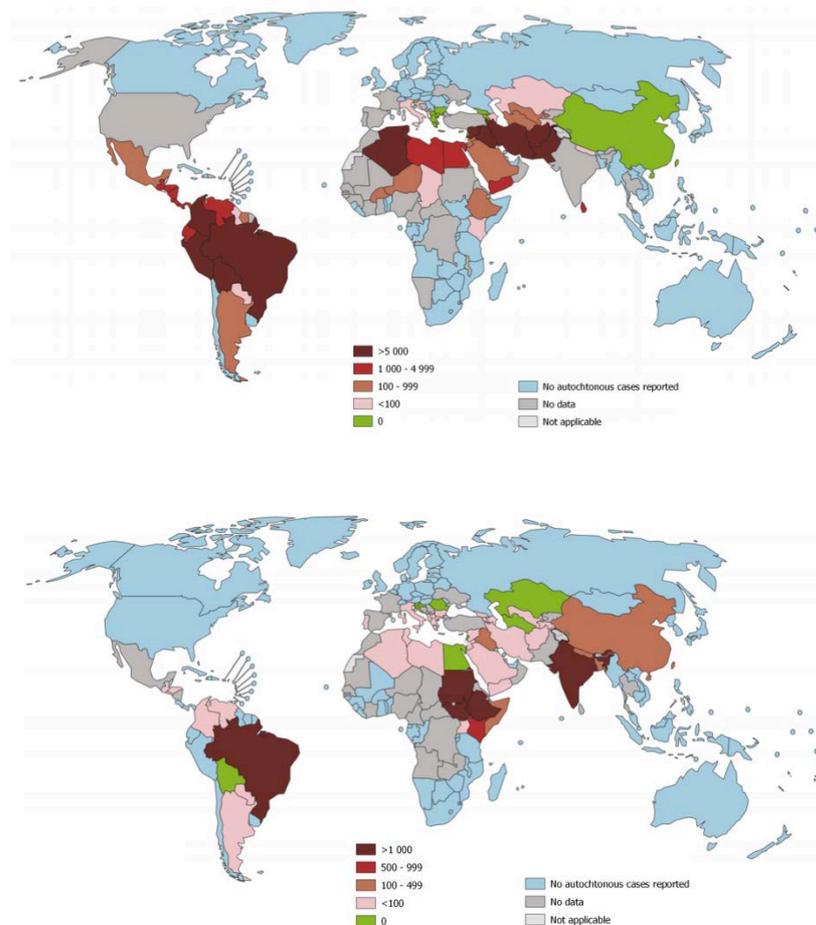


Figure 89 : Répartition géographique des nouveaux cas de leishmaniose cutanée (haut) et de leishmaniose viscérale (bas) dans le monde en 2018. D'après WHO³⁴⁵

1.5 Vecteur principal de transmission de la leishmaniose

Les parasites de la famille *Leishmania* sont transmis par la piqûre d'un insecte de seulement 2 à 3 mm de long nommé le phlébotome (Figure 90). Les femelles sont les seules à pouvoir transmettre les parasites pendant un repas sanguin et constituent donc les vecteurs principaux de la leishmaniose. A ce jour, 30 espèces de phlébotomes sont connues comme étant susceptibles de transmettre la leishmaniose³⁴⁵.



Figure 90 : Phlébotome femelle après un repas sanguin. D'après WHO³⁴⁵

1.6 Cycle de vie de *Leishmania*

Les parasites *Leishmania* sont des eucaryotes unicellulaires possédant un cycle de vie dimorphique (Figure 91). Ce cycle nécessite deux hôtes, le phlébotome et un mammifère pouvant être infecté tel que l'Homme, les rongeurs mais également les canidés³⁴⁶.

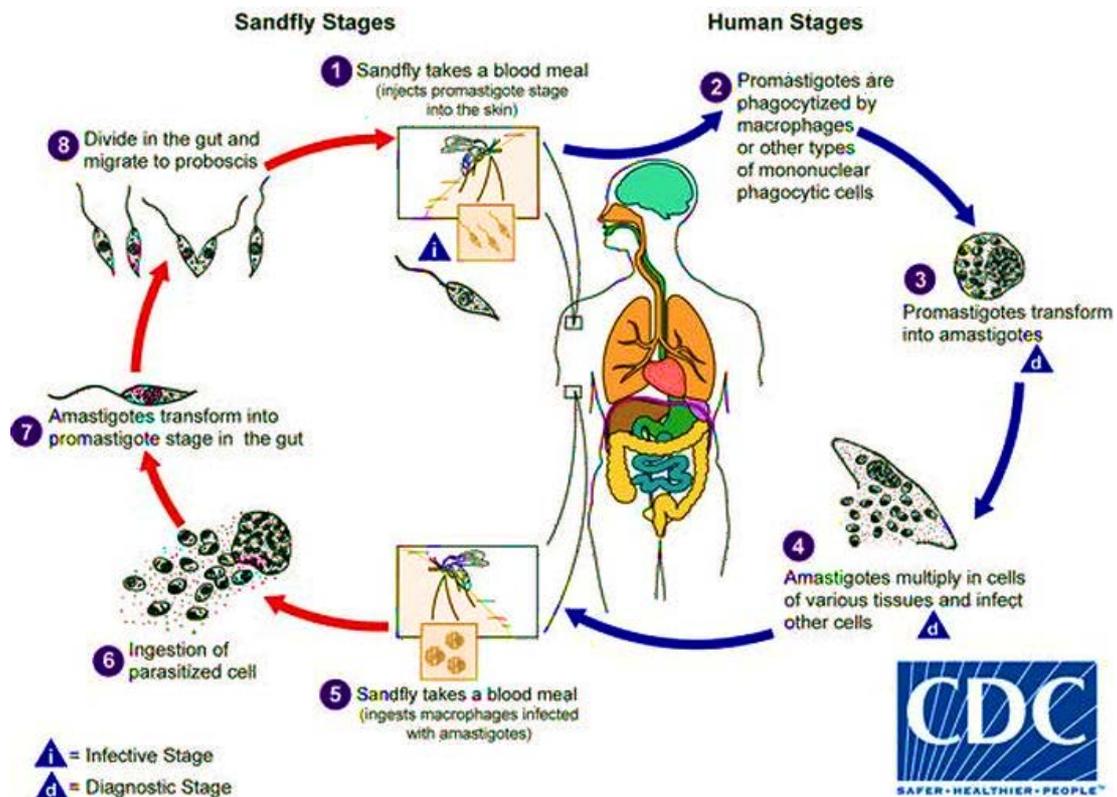


Figure 91 : Cycle de vie de *Leishmania*. D'après CDC³⁴⁷

Pendant l'ingestion d'un repas sanguin chez un hôte mammifère, la femelle phlébotome infectée va régurgiter des promastigotes (Figure 91, étape 1). Les promastigotes libérés dans l'hôte mammifère vont commencer par infecter essentiellement les macrophages. Ils vont ensuite être phagocytés (Figure 91, étape 2). Les promastigotes se métamorphosent ensuite en amastigotes (Figure 91, étape 3). Ces derniers prolifèrent par scissiparité dans les phagolysosomes des macrophages jusqu'à ce que les cellules finissent par rompre (Figure 91, étape 4).

Suite à la lyse des macrophages, les parasites relâchés dans le milieu extracellulaire infectent d'autres macrophages engendrant une perpétuation du processus. Le cycle est terminé quand une autre femelle phlébotome ingère, lors d'un repas sanguin chez un hôte, des macrophages infectés par le parasite de *Leishmania* (Figure 91, étape 5). Après une période de 12 à 18 heures dans l'intestin du phlébotome, les amastigotes se métamorphosent en promastigotes procycliques (Figure 91, étapes 6/7). Ils vont alors se multiplier très rapidement mais ne sont pas virulents. Après une période de 7 jours, les parasites passent à un stade métacycliques et migrent vers le proboscis du phlébotome (Figure 91, étape 8). Devenus pathogènes pour les

mammifères, ils sont régurgités lors d'un futur repas sanguin. De cette façon, le phlébotome garanti la perpétuation de ce cycle^{346,348-350}.

1.7 Traitement de la maladie

1.7.1 Sels d'antimoine

Les antimoniaux pentavalents constituent depuis 80 ans le traitement de première intention recommandé pour la leishmaniose dans la majorité des régions du monde³⁵¹⁻³⁵⁵. L'antimoniate de méglumine (Glucantime) et le stibogluconate de sodium (Pentostam) (Figure 92) sont les deux sels d'antimoine injectés par voie parentérale quotidiennement sur une durée de 20 jours minimum^{351,356}.

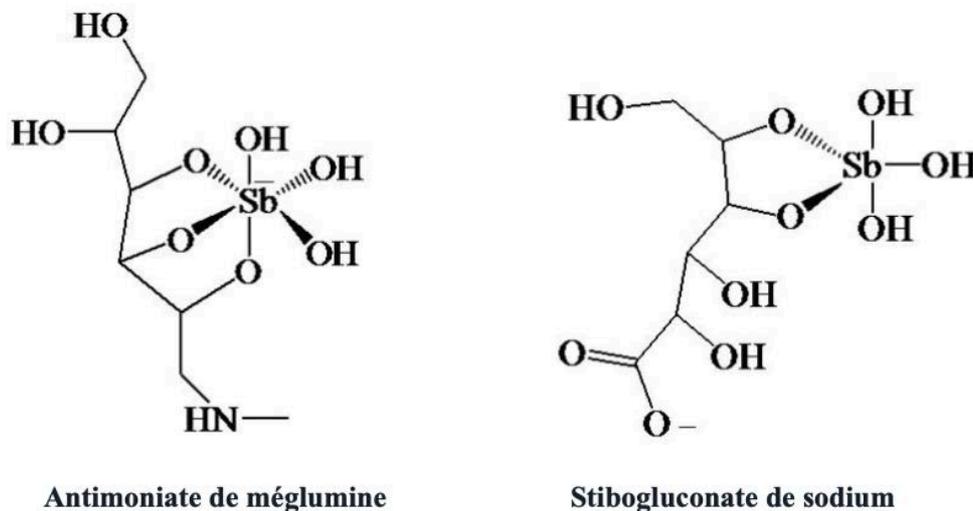


Figure 92 : Les antimoniaux pentavalents. D'après Frézard, 2008^{356,357}

Le mécanisme d'action des antimoniaux pentavalents n'est pas complètement clarifié. Il semblerait que la forme pentavalente de l'antimoine ne soit pas toxique pour les promastigotes du parasite de *Leishmania*. L'antimoine pentavalent subit une réduction enzymatique par les macrophages de l'hôte en antimoine trivalent. L'activité anti-leishmanienne résiderait donc en réalité dans la forme trivalente de l'antimoine³⁵⁸. Cependant, la forme pentavalente de l'antimoine s'avère toxique pour les amastigotes axéniques³⁵⁹.

L'utilisation des antimoniaux pentavalents s'accompagne de nombreux effets secondaires allant de la stibio-intolérance (nausées, vomissements, faiblesse, myalgies, coliques abdominales, diarrhée, éruptions cutanées) à la stibio-intoxication (atteintes cardiaques, hépatique, pancréatique et rénale)³⁶⁰⁻³⁶². A ces effets secondaires viennent s'ajouter fréquemment des résistances^{363,364}.

1.7.2 Amphotéricine B

L'amphotéricine B (Figure 93) est un antibiotique et un antifongique isolé depuis plus de 60 ans de *Streptomyces nodosus*^{351,365}. Elle fait partie de la famille des macrolides polyéniques. Compte tenu de sa toxicité plus élevée que celle de l'antimoine, l'amphotéricine B est utilisée en deuxième intention.

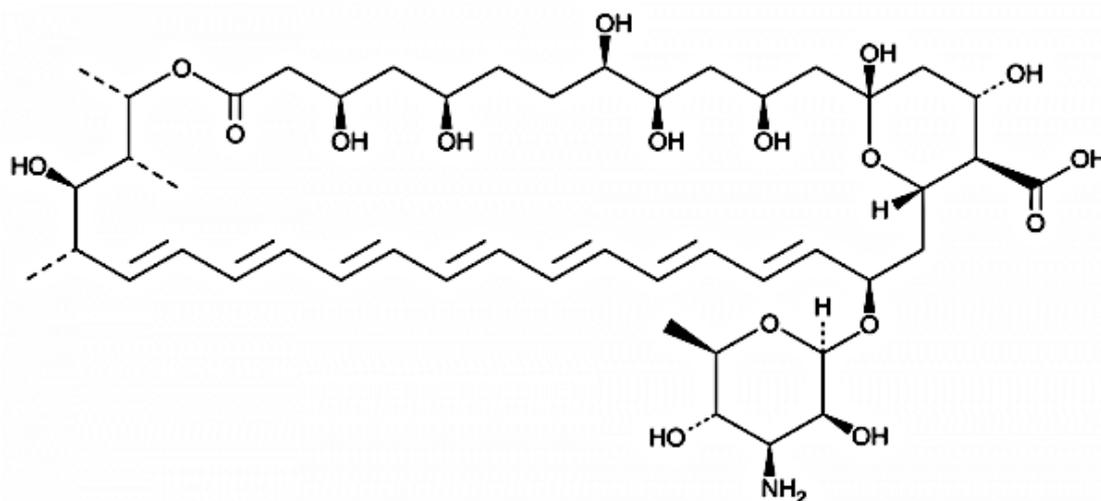


Figure 93 : Structure chimique de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B possède une très forte affinité pour les stérols et plus particulièrement pour l'ergostérol présent dans les parois fongiques ainsi que dans la membrane cellulaire des protozoaires telles que les *Leishmania*. Son mécanisme d'action est basé sur l'altération de la perméabilité de la membrane en interagissant avec l'ergostérol³⁶⁶. De multiples pores sont ainsi générés provoquant la libération d'électrolytes. L'intégrité de la cellule est alors rompue aboutissant pour finir à sa mort^{367,368}. Dans les cellules des mammifères, c'est le cholestérol qui est le principal stérol. L'amphotéricine B présente donc une certaine sélectivité puisqu'elle a une affinité beaucoup plus prononcée pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Cependant, celle-ci n'est pas nulle ce qui engendre une toxicité pour les cellules humaines³⁶⁹.

L'administration de l'amphotéricine B sous forme liposomale (AmBisome) réduit fortement le risque de toxicité tout en améliorant son activité anti-leishmanienne³⁷⁰.

1.7.3 Pentamidine

La pentamidine (Figure 94), dérivé organique synthétique de l'amidine est un antiparasitaire appartenant à la famille des trypanocides. Adressée à la prévention et au traitement de *Pneumocystis jiroveci pneumonia*, il a été établi qu'elle présente une activité contre de nombreux protozoaires dont *Leishmania*³⁵³.

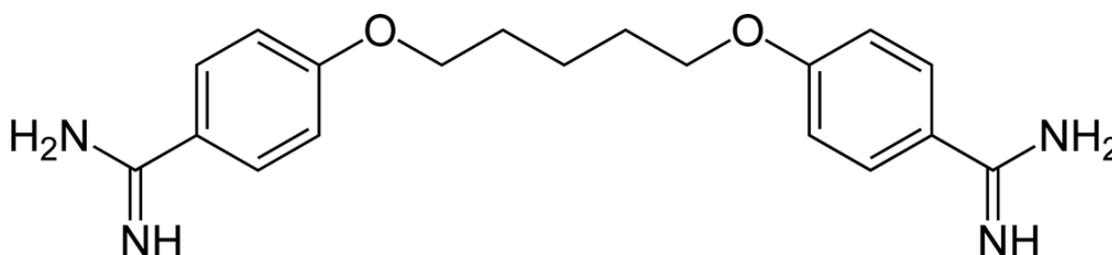


Figure 94 : Structure chimique de la pentamidine

Son principal inconvénient est sa toxicité³⁵¹. De plus, son administration provoque dans la majorité des cas des effets indésirables comme une faiblesse intense, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales impliquant des lésions pancréatiques³⁷¹, ainsi qu'un taux anormalement élevé d'hyperglycémie révélateur d'un diabète, de l'hypotension, de la tachycardie, et occasionnellement des changements électrocardiographiques³⁵³. La pentamidine semble agir en perturbant l'activité des mitochondries du parasite³⁷². Ces derniers subissent une dilatation puis une fragmentation provoquant la mort du parasite³⁷³.

1.7.4 Paromomycine

La paromomycine (Figure 95) est essentiellement connue pour être prescrite en tant qu'antibiotique aminoglycoside. Elle est également utilisée comme médicament pour le traitement de la leishmaniose avec deux voies d'administration : parentérale pour la leishmaniose viscérale et topique pour la leishmaniose cutanée³⁵³. Le traitement à la paromomycine permet des taux de guérison comparable à ceux obtenus avec l'amphotéricine

B mais son utilisation est longue avec une durée de 21 jours^{374,375}. La douleur au point d'injection représente l'effet indésirable majeur du traitement à la paromomycine³⁵⁴.

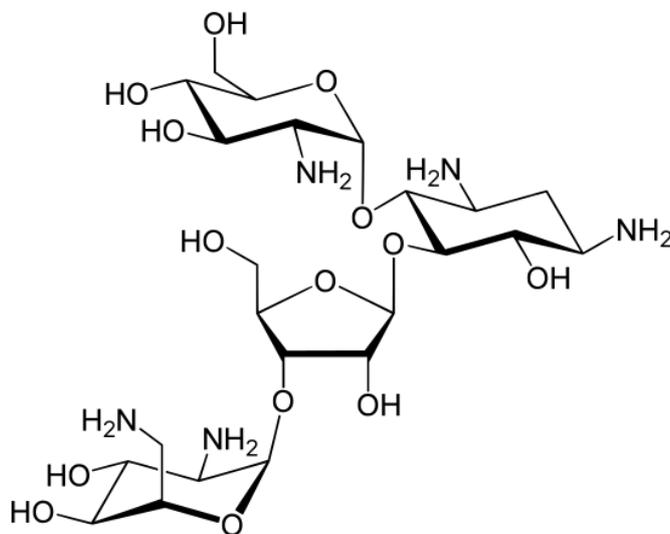


Figure 95 : Structure chimique de la paromomycine

Son mécanisme d'action n'est pas clair dans le cas de *Leishmania*. Cependant, il a été supposé qu'elle altère la fluidité membranaire, qu'elle interagit avec les ribosomes, mais également qu'elle dépolarise la membrane des mitochondries et provoque un dysfonctionnement des fonctions respiratoires^{376,377}.

1.7.5 Miltéfosine

L'hexadécylphosphocholine (Figure 96) plus généralement présenté sous la dénomination miltéfosine correspond à un analogue de la phosphocholine. Au départ, ce composé a été développé en tant que médicament anticancéreux³⁵⁴. Il s'est ensuite avéré avoir une activité anti-leishmanienne. La miltéfosine est le premier composé anti-leishmanien pouvant être administré par voie orale³⁵³. Les problèmes gastro-intestinaux représentent les effets secondaires les plus fréquents lors d'un traitement à la miltéfosine³⁵⁴. En revanche, si ce composé n'est pas utilisé comme traitement de première intention c'est en raison de ses effets tératogènes ne permettant pas aux femmes enceintes de profiter de ce traitement³⁷⁸.

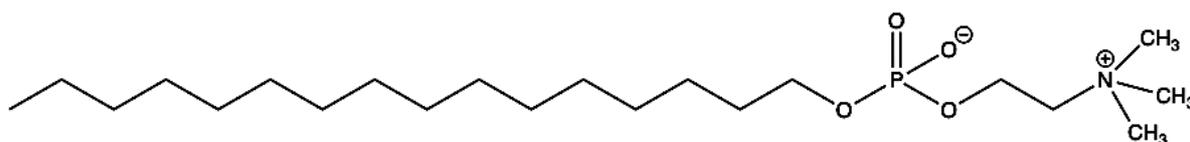


Figure 96 : Structure chimique de la miltéfosine

Son mode d'action contre les parasites de *Leishmania* semble être multiple. En effet, il est supposé que la miltéfosine induit des perturbations du métabolisme des acides gras, des stérols et de la synthèse de l'ancre Glycosyl-PhosphatidyInositol (GPI)³⁷⁹. Une altération de la transduction du signal membranaire du parasite est également envisageable³⁸⁰. Chez les promastigotes de *L. donovani*, la cytochrome c oxydase serait inhibée³⁸¹. Si le mécanisme d'action de la miltéfosine n'est pas encore complètement défini, il est formellement établi que la médiation de la mort du parasite de *Leishmania* passe par un mécanisme similaire à celui de l'apoptose^{382,383}. En complément de son activité anti-leishmanienne, la miltéfosine présente des propriétés immunomodulatrices³⁸⁴.

1.8 Le glycocalyx de *Leishmania*

Les microorganismes tels que les parasites de leishmanie présentent à la surface un manteau membranaire constitué de composés glycosylés, plus connu sous le nom de glycocalyx, pouvant être une des causes de la pathogénicité du parasite. En fonction de l'évolution dans le cycle de vie et de l'espèce de leishmanie, la composition ainsi que la taille du glycocalyx diffèrent. Particulièrement mince au stade amastigote, il est de l'ordre de 6 nm au stade promastigote procyclique (forme présente dans l'intestin du phlébotome) et peut atteindre les 12 nm pour les promastigotes métacycliques (forme virulente dans le proboscis du phlébotome)^{385,386}. Il est composé essentiellement de lipophosphoglycane (LPG), de phospholipide de glycoinositol (GIPL), de glycoprotéine (GP63), de protéophosphoglycane membranaires et filamenteux (mPPG et fPPG) ainsi que des phosphatases acides sécrétées (sAP) (Figure 97).

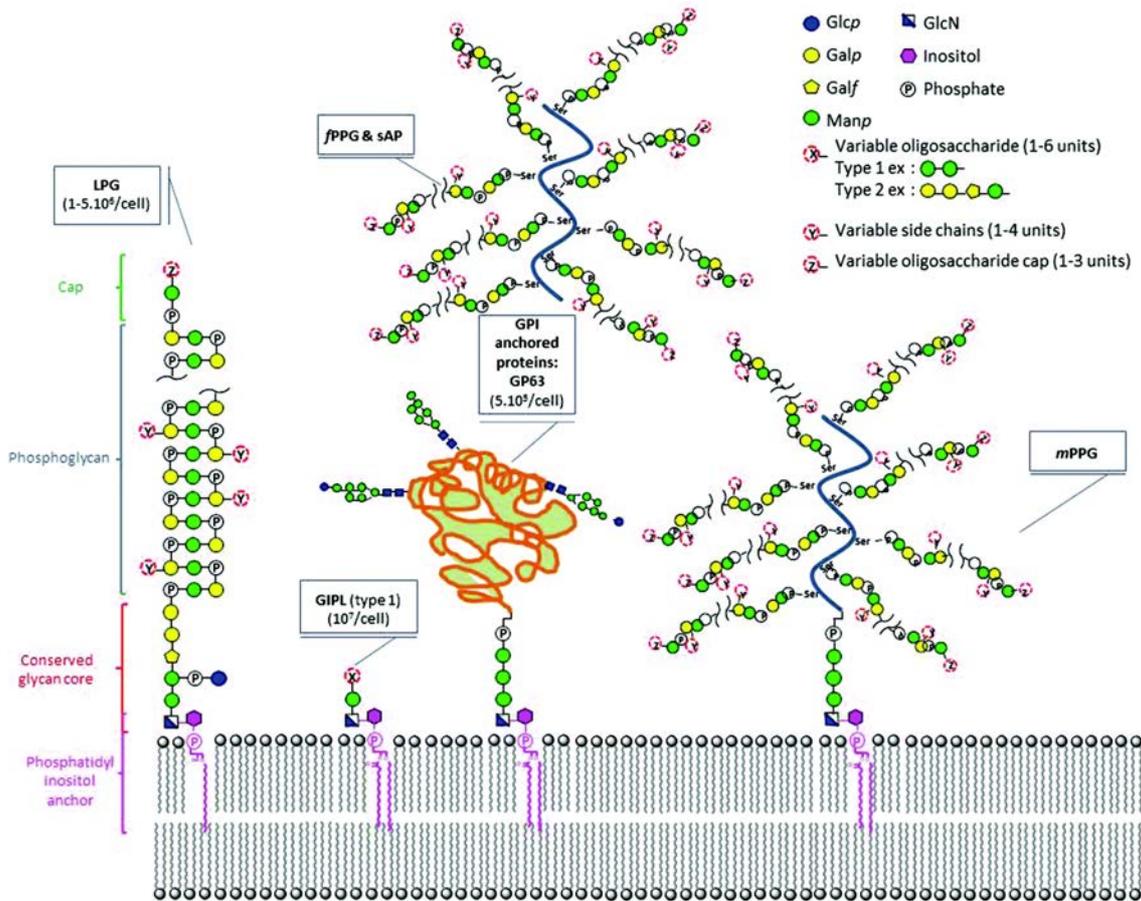


Figure 97 : Principaux composés du glycocalyx des promastigotes de *Leishmania*. D'après Cabezas, 2015³⁸⁷

1.8.1 Le LPG

Correspondant au composé principal, il recouvre l'ensemble de la surface des parasites de leishmanies au stade promastigote, y compris le flagelle³⁸⁸. Le LPG comporte quatre parties : une ancre lipidique phosphatidylinositol, un cœur hexasaccharidique, un domaine comprenant une répétition de disaccharides phosphorylés et une coiffe oligosaccharidique (Figure 98)³⁸⁹.

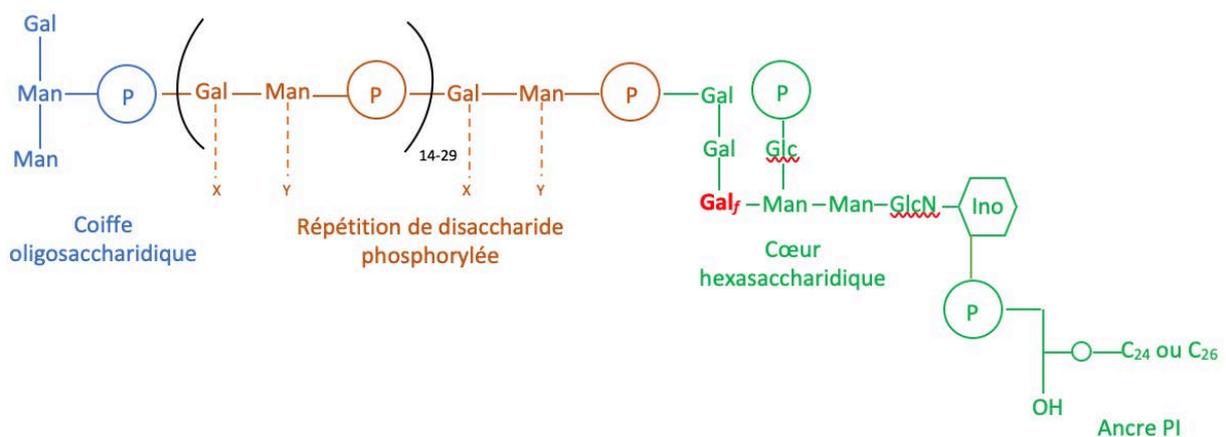


Figure 98 : Représentation générale de l'architecture du LPG de *Leishmania*. Adapté de Forestier, 2014³⁸⁹

Les études structurales du LPG de différentes espèces de leishmanie témoignent d'une préservation des trois premières parties^{390,391}. Néanmoins, en fonction des différentes espèces de parasites et de l'évolution dans le cycle de vie, des variations sont observées pour les chaînes latérales du domaine de répétition de disaccharides phosphorylés et pour la coiffe oligosaccharidique³⁹². En fonction du stade dans le cycle de vie du parasite, le LPG est soumis à des modifications caractéristiques selon les espèces de leishmanies. En effet, alors que le nombre d'unités répétitives est d'environ 15 au stade de promastigote procyclique, il subit une amplification pendant le processus de métacyclogenèse en passant à environ 30 unités répétitives au stade de promastigote métacyclique, expliquant ainsi le doublement de l'épaisseur du glycocalyx^{391,393}. Le LPG confère ainsi au parasite une protection à l'encontre des enzymes digestives du phlébotome et permet également d'assurer sa liaison au tractus digestif du vecteur via une reconnaissance de certaines lectines de sorte qu'il ne soit pas emporté au sein du transit intestinal^{349,350,394}. Considérablement présent chez les promastigotes au stade métacyclique, le LPG est quasiment absent chez les amastigotes (Figure 99). Entre le stade promastigote procyclique et le stade promastigote métacyclique la quantité de molécule de LPG est en forte augmentation (Figure 99), sûrement pour assurer au parasite une protection contre un groupe de protéines faisant partie de l'immunité innée qui est nommée le système du complément^{395,396}. En effet, les promastigotes procycliques ainsi que les promastigotes dénués de leur LPG se sont révélés être extrêmement sensibles à la lyse engendrée par le système du complément³⁹⁶. A l'intérieur des macrophages, le LPG participe à l'instauration d'un environnement favorable pour permettre la transformation des promastigotes en amastigotes en bloquant le processus de maturation des phagosomes³⁹⁷.

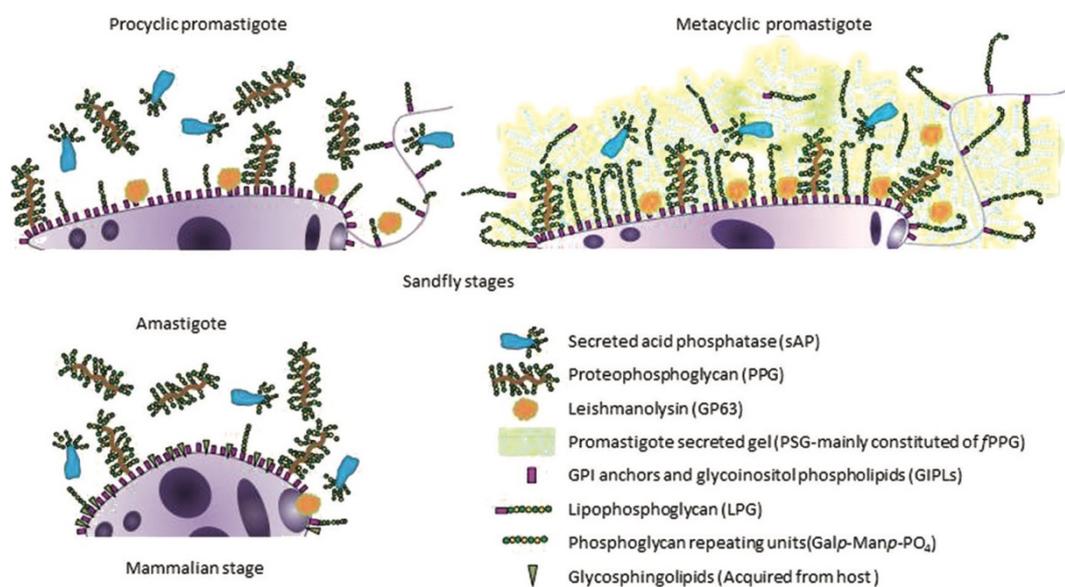


Figure 99 : Représentation des composés présents à la surface des différents stades d'évolution du parasite pour *L. donovani*. D'après Cabezas, 2015³⁸⁷

1.8.2 Les GIPL

Présent en quantité très élevée, les GIPL représentent les principaux glycolipides du glycocalyx de *Leishmania* aux différents stades d'évolutions du parasite. Ils sont de faibles masses moléculaires et ne sont reliés à aucun phosphoglycane ou protéine³⁹⁸. Les GIPL peuvent être classés en trois catégories selon leurs motifs glycosidiques : Enrichis en mannose, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. aethiopica* et *L. tropica* ont des GIPL de type I. Les GIPL enrichies en galactose sont de type II et sont caractéristiques de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* et *L. mexicana*. Le troisième type de GIPL concerne les hybrides. Ils correspondent à un mélange des caractéristiques structurales des GIPL de type I et II, ils sont présents chez *L. donovani* et *L. mexicana*³⁹⁹⁻⁴⁰¹. La fonction des GIPL est encore mal définie, cependant il a été démontré qu'ils ont la capacité d'inhiber de manière importante les fonctions des macrophages (protéine kinase C et transduction du signal)⁴⁰².

1.8.3 La GP63

La GP63 abréviation de glycoprotéine de 63 kDa est une métalloprotéase de zinc majoritairement présente au stade promastigote mais également présente au stade amastigote. Elle est également désignée sous le nom protéase de surface principale, leishmanolysine (nomenclature de l'union internationale de la biochimie et de la biologie moléculaire) ou protéase de surface du promastigote⁴⁰³. Elle a la capacité d'altérer une multitude de substrats protéiques telles que la caséine, l'azocaséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et le fibrinogène⁴⁰⁴. Cette métalloprotéase est incontestablement un facteur de virulence liée à l'instauration de l'infection ainsi qu'à sa progression⁴⁰⁵. Elle agit en stimulant l'altération de la fibronectine, engendrant une diminution de l'activation des macrophages infectés par les parasites de *Leishmania*.⁴⁰⁶ De plus, elle favorise les clivages des molécules transcriptionnelles, inhibe le système du complément et permet au parasite de s'adapter à l'environnement intracellulaire afin de survivre⁴⁰⁷.

1.8.4 Les protéophosphoglycans

Présent à la surface du parasite, les protéophosphoglycans (PPG) font partie de la famille des glycoconjugués et existent sous trois formes : membranaires (mPPG), sécrétés (sPPG) et filamenteux (fPPG)⁴⁰⁸. Les PPG possèdent la capacité de se lier aux macrophages et jouent potentiellement un rôle dans la survie des parasites dans les cellules hôtes⁴⁰⁹.

Le fPPG permettrait d'améliorer l'efficacité de la transmission des parasites en créant un gel engendrant pour le phlébotome d'importantes difficultés à prendre un repas sanguin et en provoquant la régurgitation des parasites. Cette difficulté rencontrée par le phlébotome le conduirait donc à renouveler ses repas sanguins multipliant ainsi la probabilité de transmission des parasites^{410,411}.

1.8.5 Les phosphatases acides sécrétées

Les phosphatases acides sécrétées (sAP) sont produites à la surface de quasiment toutes les espèces de *Leishmania* et possèdent la capacité de déphosphoryler une multitude de substrats organiques telles que des sucres, des inositols et des protéines.

Extrêmement glycosylés, les sAP résistent à la dégradation protéolytique⁴¹². La fonction de ces sAP peut être directement liée à la survie du parasite à l'intérieur de la cellule hôte. En effet, une forte activité des sAP a été relevée dans les amastigotes, suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle de protection à l'encontre de l'environnement des vacuoles parasitophores extrêmement défavorable⁴¹³. Bien que des différences aient été observées pour les phosphatases acides sécrétées des différentes espèces de leishmanie, ils présentent des similitudes concernant les épitopes immunologiques⁴¹⁴.

2 Objet de l'étude

La présence abondante du LPG à la surface des promastigotes et son implication majeure dans la virulence ainsi que la survie des parasites de *Leishmania* a suscité une attention particulière. Il a été démontré que l'altération de l'architecture du LPG conduit à la mort du parasite ou au moins à l'atténuation de sa virulence⁴¹⁵. La présence d'un motif galactofuranose (Gal_f) au niveau du cœur hexasaccharidique (Figure 100) est commune à toutes les souches de leishmanies et représente un motif rare, absent chez tous les mammifères⁴¹⁶. De plus, il a été rapporté que ce motif galactofuranose joue un rôle primordial dans le cycle de vie ainsi que dans la virulence des parasites⁴¹⁷.

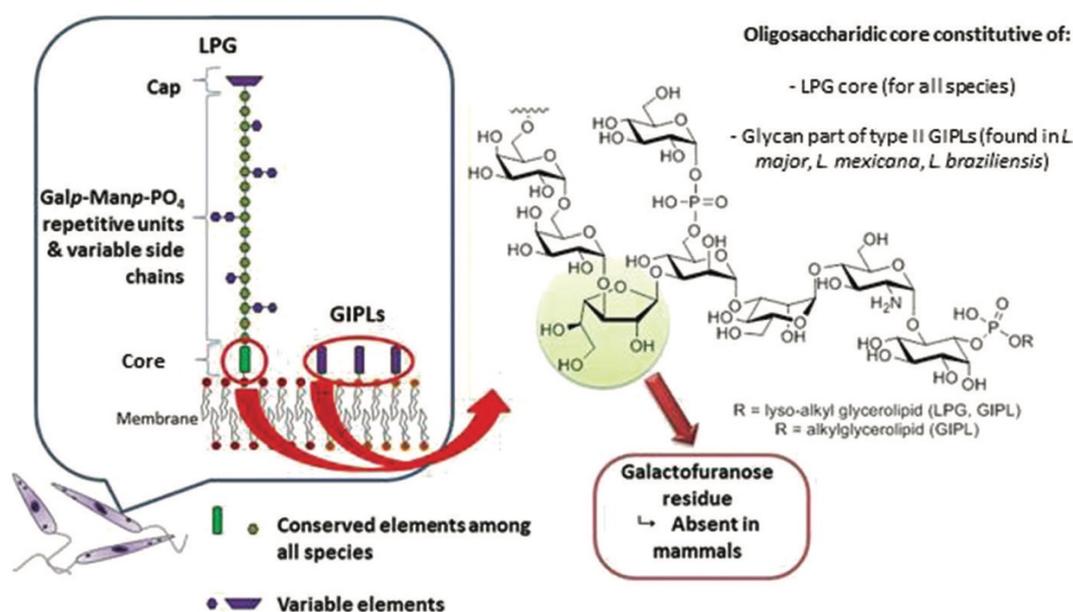


Figure 100 : Glycoconjugués présents à la surface des parasites de *Leishmania* et exprimant le motif galactofuranose. D'après Cabezas, 2015³⁸⁷

Ce motif galactofuranose a été envisagé comme cible pour le développement de composés anti-leishmaniens. Les équipes de V. Ferrières et F. Robert-Gangneux ont réalisé des tests d'inhibitions sur les promastigotes de *L. donovani* avec le β -D-galactofuranoside d'octyle. Leurs résultats montrent une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) définie comme la concentration nécessaire permettant d'inhiber 50 % de la prolifération des parasites de $8,96 \pm 2,5 \mu\text{M}$ et un indice de sélectivité caractérisé par le rapport de la concentration cytotoxique à 50 % (CC₅₀) par l'IC₅₀ (CC₅₀/IC₅₀) 4 fois meilleur que celui de la miltefosine¹⁹.

L'absence de motif galactofuranose (Gal_f) chez les mammifères implique que les enzymes responsables de la synthèse et l'incorporation de ce motif (Gal_f) sont également absentes. Il s'avère que les souches mutantes de leishmanies, souche *lpgI*⁻ (exempt de galactofuranosyltransférase putative)⁴¹⁸ et souche *glf*² (exempt d'UDP-galactopyranose mutase)⁴¹⁵ ne présentant pas de LPG montre une véritable atténuation de la virulence. Par conséquent, ces enzymes représentent potentiellement des cibles thérapeutiques (Figure 101).

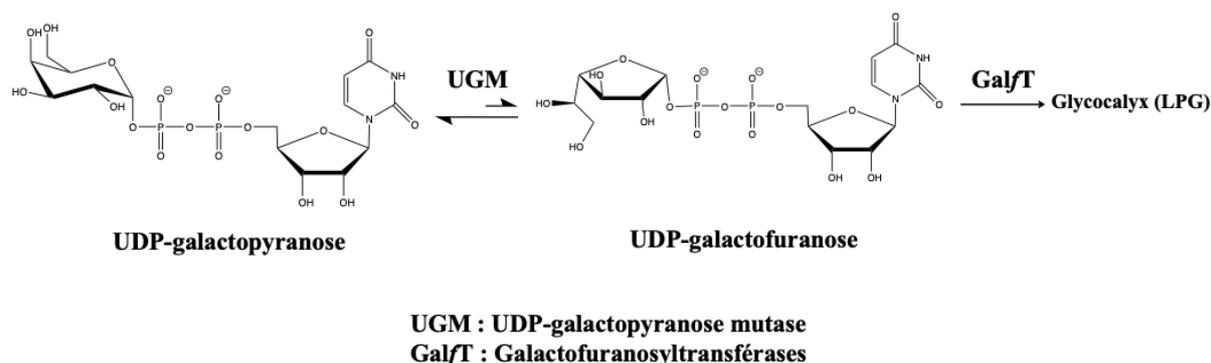


Figure 101 : Biosynthèse du galactofuranoconjugués^{258,419}

L'hypothèse sur laquelle est basé cette partie de thèse, supposait que le galactofuranoside d'octyle interagit spécifiquement avec le LPG présent à la surface des parasites de leishmanie et inhibe ainsi leur prolifération. Par conséquent, des différences auraient dues être obtenues avec l'utilisation de souches avec et sans LPG.

Ainsi, un des objectifs de la thèse était d'étudier par RMN le mécanisme d'interaction du β-D-galactofuranoside d'octyle sur *L. tarentolae*, une souche de leishmanie n'exprimant pas de LPG et sur *C. fasciculata*, un modèle de leishmanie exprimant le LPG. L'étude a ensuite été étendue à plusieurs dérivés du β-D-galactofuranoside d'octyle. Pour finir, en raison de la présence de charges négatives en surface des leishmanies, les aza-β³-peptides présentés dans le chapitre 2 ont également été testés sur plusieurs souches de *Leishmania*.

3 Résultats et discussion

3.1 Résultats RMN

Il a été précédemment démontré que les dérivés de galactofuranoside d'octyle avec un substituant polaire en position C-6 présentait des activités anti-parasitaires prometteuses contre la forme promastigote de *L. donovani* avec une IC_{50} de $8,96 \pm 2,5 \mu M^{19}$. De ce fait, l'hypothèse que le Galf interagirait avec le LPG et engendrerait une inhibition de la prolifération des leishmanies a été envisagée. Par conséquent, pour caractériser cette éventuelle interaction, nous avons utilisé une souche modèle proche de leishmanie présentant du LPG (*C. fasciculata*) et une souche non pathogène de leishmanie ne présentant pas de LPG (*L. tarentolae*) (Figure 102).

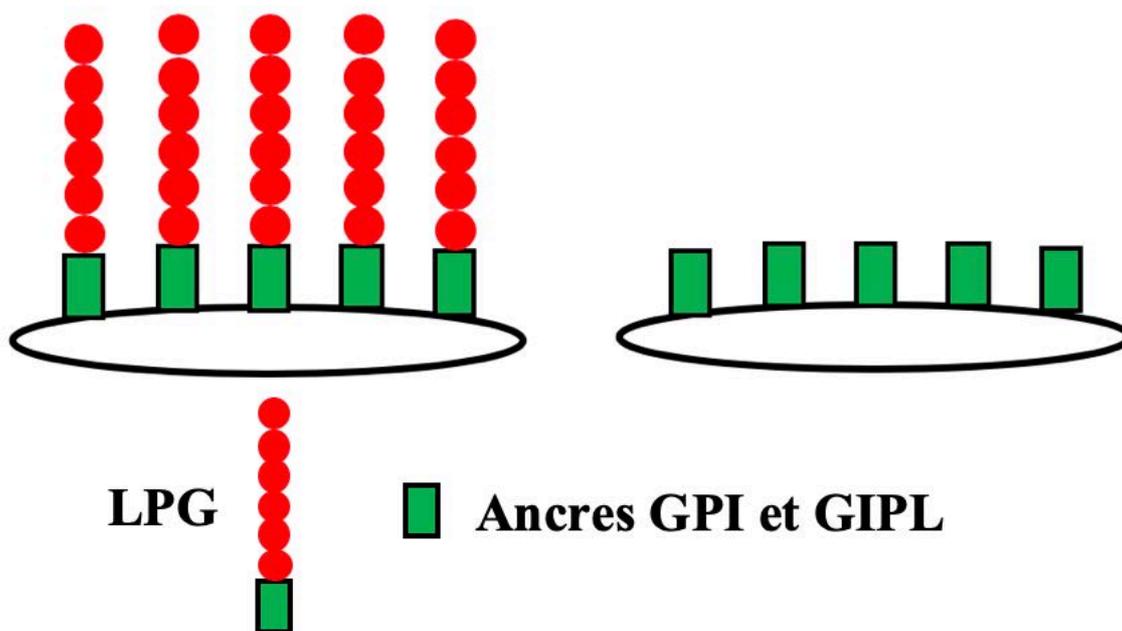


Figure 102 : Structure schématique de la surface des promastigotes de *C. fasciculata* et *L. tarentolae*

Cette étude RMN est basée sur l'utilisation de la séquence RMN sur la différence de transfert de saturation (STD). Cette technique a été utilisée afin de caractériser l'interaction entre le β -D-galactofuranoside d'octyle (Galf-oct) et les deux types de souches. Le premier spectre enregistré est un spectre off-résonance. L'irradiation sélective décalée en un endroit très éloigné des résonances du ligand et des composés présents à la surface des leishmanies a été réalisée à +100 ppm. Le second spectre enregistré est un spectre on-résonance. Dans cette étude, l'irradiation spécifique, utilisée pour l'excitation des molécules présentes à la surface des

leishmanies est appliquée dans la région des aromatiques à 7 ppm, loin des résonances du ligand, pendant 2 s. L'application de cette irradiation dans cette région permet d'éviter la saturation du ligand pouvant provoquer des résultats biaisés. La saturation du complexe est observée sur les signaux du ligand suite à la différence des spectres off-résonance et on-résonance.

Dans les deux cas, les protons témoignant de l'effet STD le plus fort sont ceux du méthyle présent à l'extrémité de la chaîne octyle (Figure 103).

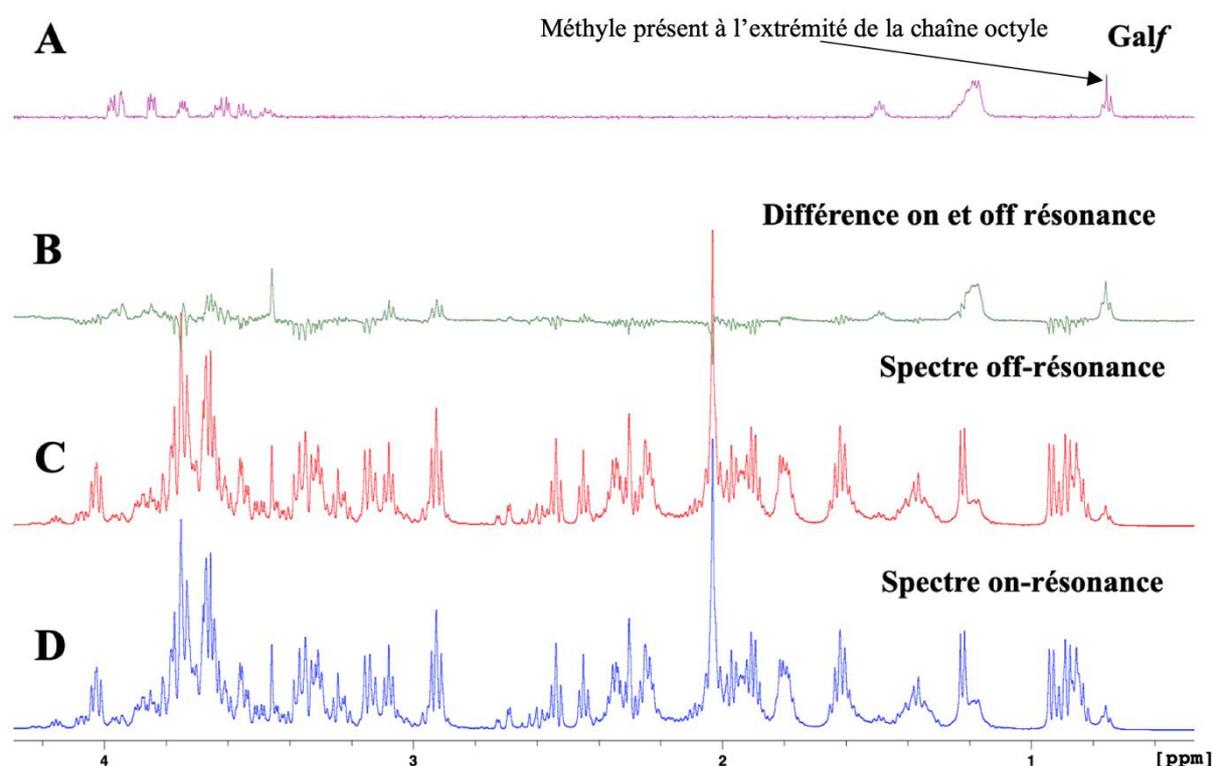


Figure 103 : Spectre RMN 1H du Galf-oct (A) et spectre RMN-STD du Galf-oct en présence de *C. fasciculata* dans du milieu drosophile de Schneider. (B) : Différence des spectres on-résonance (D) et off-résonance (C)

Les effets STD de ce groupe méthyle sont comparés pour détecter d'éventuelles différences d'interactions entre le Galf-oct avec *C. fasciculata* d'une part et le Galf-oct avec *L. tarentolae* d'autre part. Les effets STD obtenus sont de 8% et 4% pour ces deux souches respectivement, montrant ainsi une faible différence de l'effet STD entre les souches avec ou sans LPG. De manière générale, ces valeurs sont interprétées en termes de différence d'affinité, montrant ainsi une affinité du Galf-oct légèrement plus importante pour la souche de *C. fasciculata*. Néanmoins ces valeurs d'effets STD sont faibles et remettent en question l'interaction du Galf-

oct avec le LPG. Afin de valider ces données, nous avons procédé à des tests d'inhibition du Galf-oct sur *L. tarentolae*.

3.2 Résultat d'activité anti-leishmanienne du Galf-oct

L'IC₅₀ responsable de 50% de l'inhibition de la croissance des parasites, a été mesuré sur *L. tarentolae* avec des concentrations croissantes de galactofuranoside d'octyle. Théoriquement, si le postulat de départ était correct, à savoir que le LPG est bien la cible d'interaction du Galf, alors *L. tarentolae* qui en est dépourvu ne devrait pas y être sensible. Cependant nous avons obtenu une valeur d'IC₅₀ de 555 µM (Figure 104) et une CMI de 750 µM.

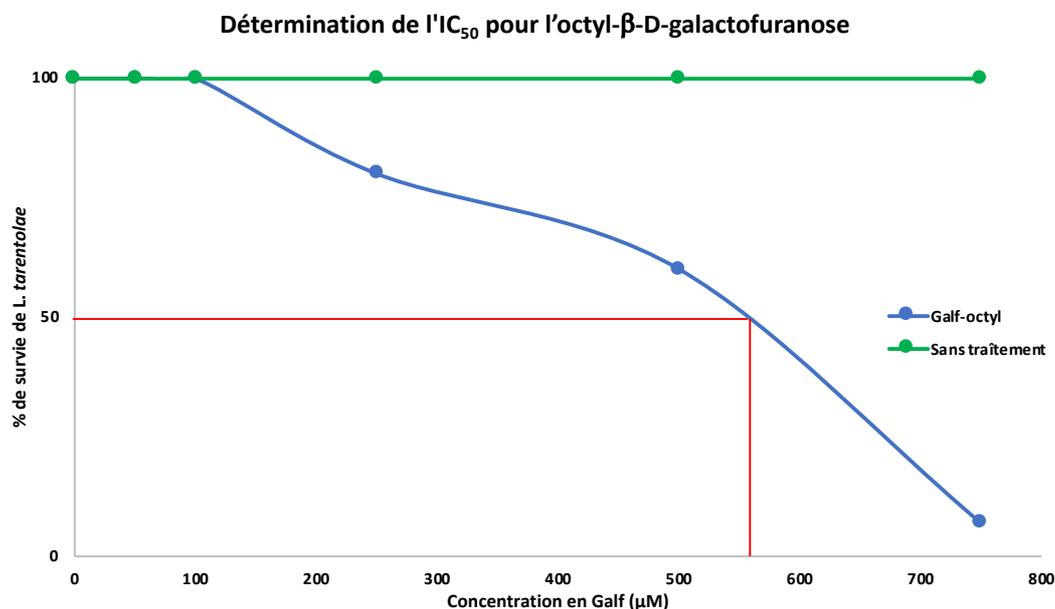


Figure 104 : Détermination de l'IC₅₀ du Galf-oct sur *L. tarentolae*

Des tests d'inhibition réalisés dans le laboratoire de parasitologie de Villejean ont révélé une valeur d'IC₅₀ sur *L. donovani* 54 fois plus élevée que celle fournie dans la littérature, soit une valeur d'IC₅₀ de 479 µM^{19,419}. La même valeur d'IC₅₀ a été obtenue pour des souches mutantes de *L. donovani* dépourvues de LPG. Les valeurs d'IC₅₀ du galactofuranoside d'octyle déterminées sur la souche de *L. tarentolae* et les souches de *L. donovani* sont relativement proches, laissant penser que *L. tarentolae* pourrait constituer un bon modèle non pathogène de *L. donovani*. Les résultats d'IC₅₀ et de RMN sont résumés dans le Tableau 24.

	<i>C. fasciculata</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>KO</i>
LPG	OUI	NON	OUI	NON
IC ₅₀ (μM)	Nd	555	479	479
RMN – STD	8%	4%	Nd	Nd

Tableau 24 : Résumé des résultats d'inhibition et d'effet STD obtenus pour le Galf en fonction des différentes souches de *Leishmania*

Suite à ces différents résultats, nous pouvons en conclure que le LPG n'est pas la cible d'interaction du galactofuranoside d'octyle. De plus, bien que celui-ci inhibe la prolifération des leishmanies, il n'est pas un bon candidat pour un futur anti-leishmanien avec une concentration d'inhibition aussi élevée. Cependant, du fait de la présence d'une bibliothèque de composés dérivés du galactofuranoside d'octyle au laboratoire, nous avons réalisé des tests d'inhibitions de ces différents dérivés.

3.3 Résultats d'activité anti-leishmanienne de la bibliothèque de composés

3.3.1 Les galactofuranoses d'acyle

La CMI des galactofuranoses d'acyle a été mesuré sur *L. tarentolae*. Nous avons vu précédemment que le galf-octyle de référence présente une activité anti-leishmanienne relativement modérée contre les promastigotes de *L. tarentolae* avec une CMI de 750 μM . Les composés étudiés numérotés de 1 à 9 (Tableau 25) sont constitués d'un galactofuranose et d'une fonction ester en position anomère (Figure 105).

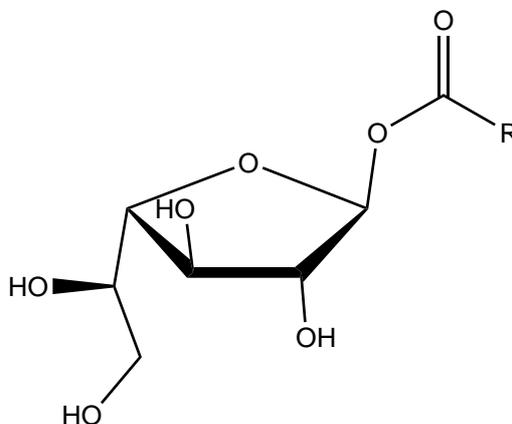
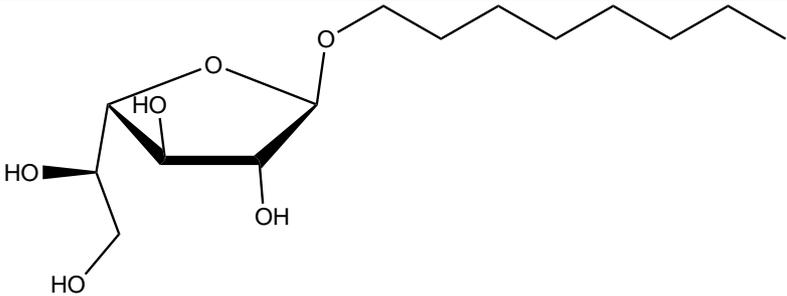
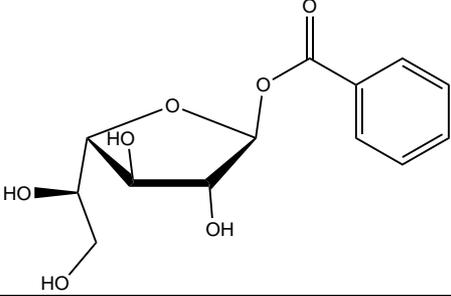
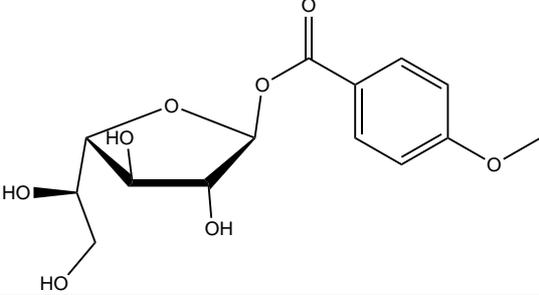
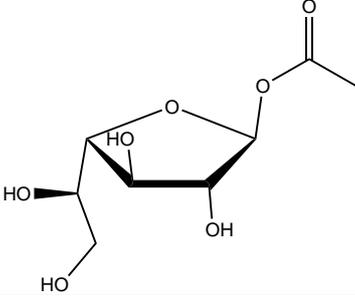
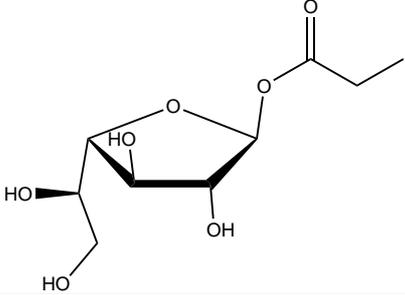
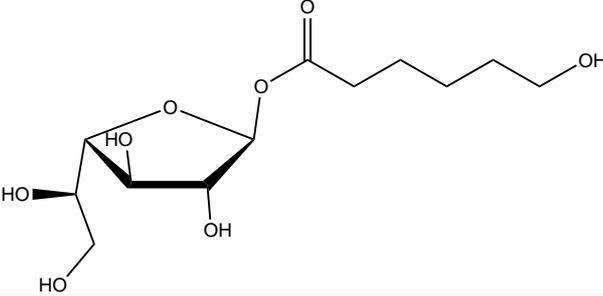


Figure 105 : Structure chimique générale des galactofuranoses d'acyle étudiés

Ils ne diffèrent entre eux que par la présence et la nature de leur chaîne grasse R. Les galactofuranoses d'acyle 1, 2, 3 et 4, ne comportant pas du tout de chaîne grasse ou alors une chaîne très courte, ne présentent pas d'activité à une concentration de 1000 μM (Tableau 25). Le galactofuranose d'acyle 5, caractérisé par la présence d'un hexanol greffé sur la fonction acyle présente une activité inférieure à celle du galactofuranoside d'octyle avec une CMI de 1000 μM (Tableau 25). Le composé 6, présentant une chaîne grasse de 6 carbones a une activité similaire au composé de référence avec une CMI de 750 μM (Tableau 25). Les galactofuranoses d'acyle 7, 8 et 9 présentent des CMI inférieures, avec des valeurs de 600 μM , 550 μM et 375 μM , respectivement (Tableau 25). Les composés 7 et 8, constitués d'une chaîne de 8 carbones, diffèrent par la présence d'une insaturation sur la chaîne grasse du composé 7. Le composé 9, présente la chaîne grasse la plus longue avec 12 carbones.

	Structure chimique	CMI (μM)
Galf-octyl		750
1		> 1000
2		> 1000
3		> 1000
4		> 1000
5		1000

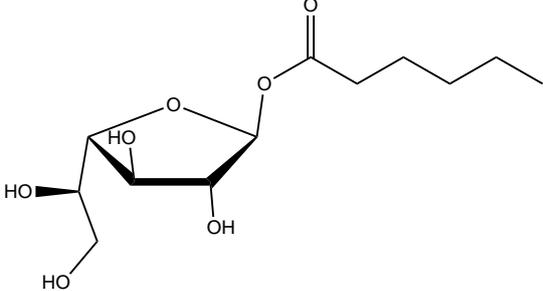
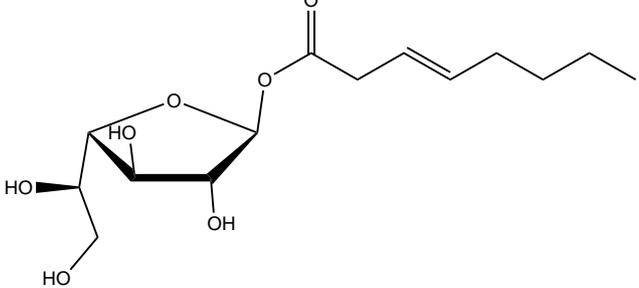
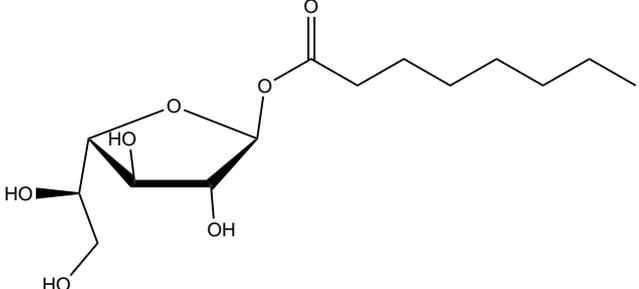
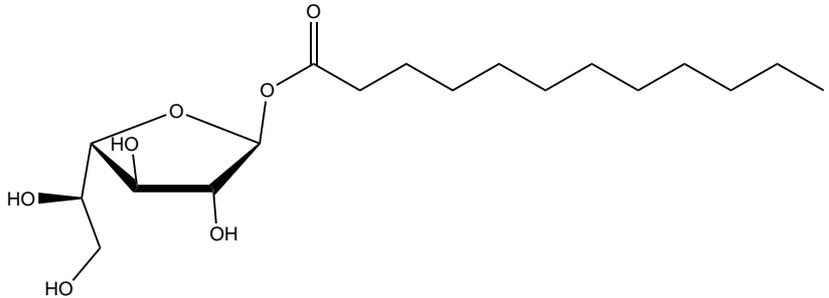
6		750
7		600
8		550
9		375

Tableau 25 : Structures chimiques et CMI obtenues pour les galactofuranoses d'acyle et le galf-octyle contre les promastigotes de *L. tarentolae*

Ces tests d'activités anti-leishmaniennes ont mis en évidence l'effet bénéfique de la fonction acyle. En effet, l'insertion de la fonction acyle (composé 8 - Tableau 25) a permis d'augmenter de manière significative l'activité anti-leishmanienne avec une CMI de 550 μM soit 200 μM de moins par rapport à la CMI du Galf-octyle de référence (750 μM) (Tableau 25 : Galf-octyle et composé 8).

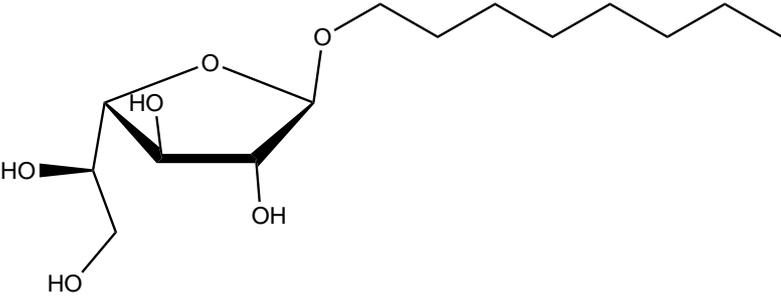
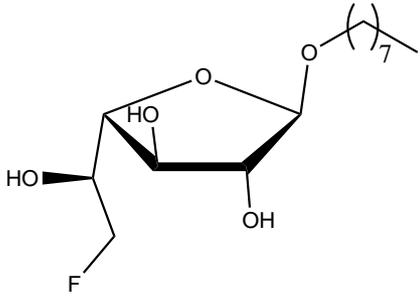
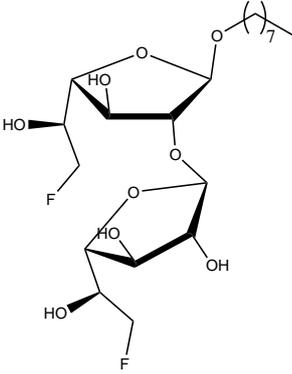
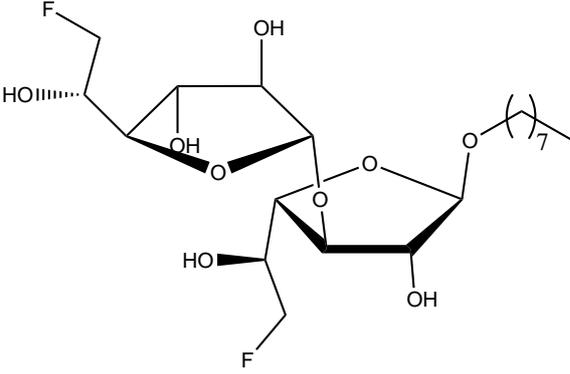
L'importance de la chaîne grasse a également été mise en évidence. En effet, l'absence totale de chaîne grasse (Tableau 25 - composé 1 et composé 2) n'a pas permis d'inhiber la prolifération des leishmanies à une concentration de 1000 μM . Il apparaît également que la

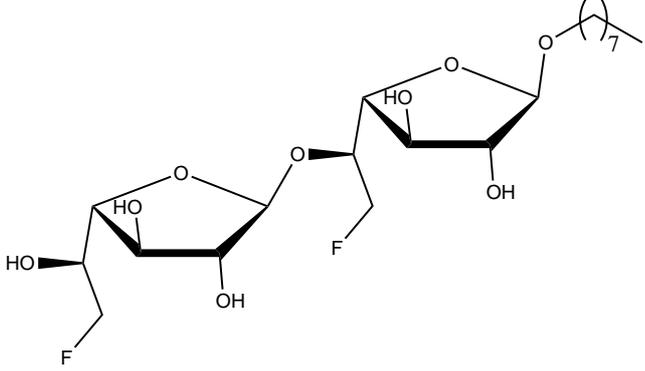
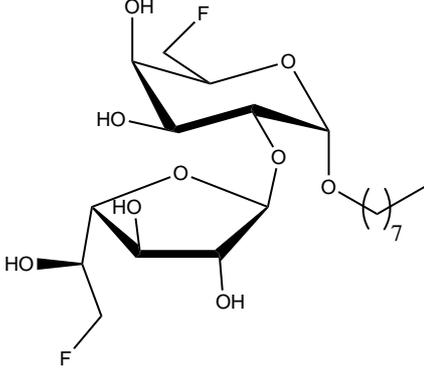
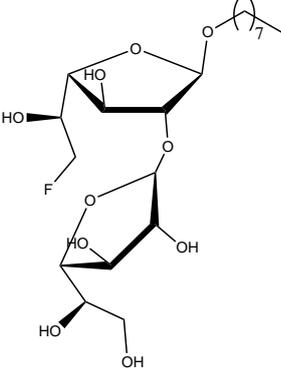
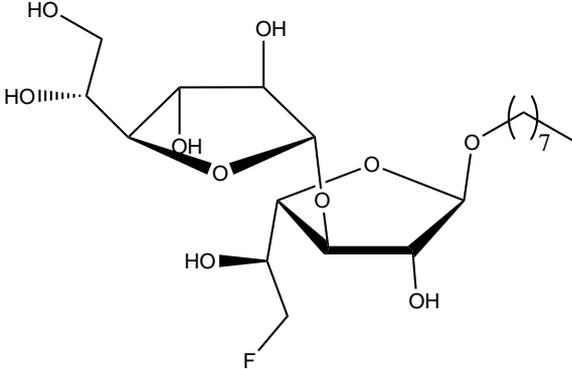
longueur de la chaîne lipidique à une influence sur l'activité anti-leishmanienne puisque les composés 3 et 4 constitués d'une chaîne grasse très courte ne présentent pas d'activité contre *L. tarentolae* à une concentration de 1000 μM . De plus, en comparant le composé 6 décrit précédemment avec le composé 9 qui possède une chaîne grasse deux fois plus grande soit une chaîne grasse de 12 carbones, nous observons une diminution de la CMI d'un facteur 2 passant alors de 750 μM à 350 μM . Il apparaît que jusqu'à une chaîne grasse comportant 12 carbones, plus la longueur de la chaîne grasse augmente plus la CMI diminue. Cependant, la comparaison des écarts de CMI des composés 6, 8 et 9 tend à montrer qu'à partir d'une certaine longueur de chaîne grasse, l'augmentation de cette dernière semble ne plus avoir trop d'effet sur l'activité anti-leishmanienne.

Il semblerait que la présence d'une insaturation ou d'une fonction alcool sur la chaîne grasse de ces composés induits une réduction plus ou moins importante de l'activité anti-leishmanienne. En effet, l'insaturation sur la chaîne grasse en position 3' du composé 7 par rapport au composé 8 qui en est dépourvu a engendré une légère diminution de l'activité sur *L. tarentolae* avec une CMI de 600 μM . Par ailleurs, la présence d'un groupe hydroxyle à l'extrémité de la chaîne grasse engendre une forte augmentation de la CMI. C'est notamment le cas du composé 5, présentant une fonction alcool à l'extrémité de sa chaîne grasse. Celui-ci présente une activité anti-leishmanienne bien plus faible que son homologue dépourvue de fonction alcool (composé 6). Cette diminution d'activité est engendrée par la présence de l'hydroxyle sur la chaîne grasse qui vient défavoriser l'interaction hydrophobe.

3.3.2 Les Furanosides d'octyle fluoré

Les effets de l'atome de fluor sont connus pour influencer les propriétés biologiques⁴²⁰⁻⁴²³. De ce fait, l'inhibition de la prolifération du parasite de *L. tarentolae* a également été étudiée avec des furanosides d'octyle fluoré (Tableau 26) et leurs activités ont été comparées avec celle du galactofuranoside d'octyle de référence.

N° Composé	Structures chimiques	CMI (μM)
Gal β -octyle		750
10		175
N° Composé	Composés difluorés	CMI (μM)
11		500
12		750

13		250
14		> 1000
N° Composé	Mélange de composés monofluorés	CMI (μM)
15		750
16		750

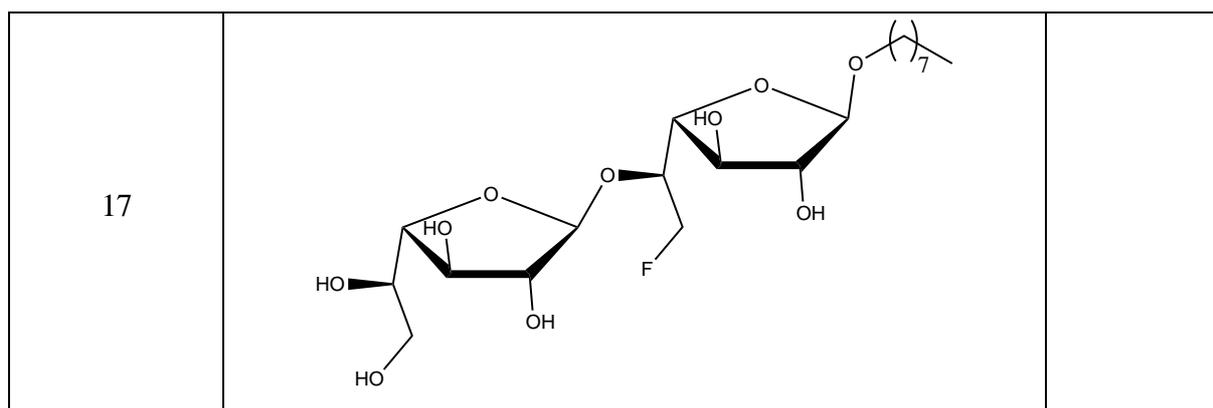


Tableau 26 : Structures chimiques et CMI obtenues pour les glycosides d'octyle fluorés étudiés contre les promastigotes de *L. tarentolae*

Le disaccharide 14, composé d'un résidu furanose et d'un résidu pyranose comportant tous deux un atome de fluor en position C-6 n'a pas montré d'activité dans la gamme de concentration testé soit jusqu'à 1000 μM . Le disaccharide difluoré 12, ainsi que le mélange de disaccharides monofluoré 15-17 ont montré une activité identique à celle du galactofuranoside d'octyle de référence soit une CMI de 750 μM . Les disaccharides difluorés 11 et 13 ainsi que le composé 10 ont montré des meilleures activités avec des CMI de 500 μM , 250 μM , et 175 μM respectivement. Ces trois disaccharides présentent une entité 6-désoxy-6-fluoro galactofuranoside sur le bras pendant.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique de la fluoration des entités furanosyles. Cependant, pour que la fluoration soit bénéfique, le glucide lié à la chaîne alkyle ne doit pas être sous forme pyranose (composé 14). En effet, la présence de cette forme engendre l'annulation de l'activité anti-leishmanienne du composé. Cette dernière observation est en parfait accord avec l'absence d'activité anti-leishmanienne du galactopyranoside d'octyle sur la souche infectieuse *L. donovani* mise en évidence par Suleman et coll. dans une étude précédente¹⁹.

4 Conclusion

Cette partie de thèse est initialement basée sur une hypothèse supposant que le galactofuranoside d'octyle interagit spécifiquement avec le LPG présent à la surface des parasites de leishmanie et inhibe ainsi leur prolifération. L'étude RMN basée sur l'utilisation de la séquence RMN-STD réalisée au cours de cette thèse a donné de très faibles valeurs d'effets STD, témoignant ainsi d'une interaction du galactofuranoside d'octyle avec la surface parasitaire relativement faible. De plus les résultats d'activités entrepris sur les promastigotes de *L. tarentolae*, l'analogue non pathogène de *L. donovani* ont montré une activité anti-leishmanienne relativement faible confirmant ainsi les résultats récemment obtenus au laboratoire de parasitologie de Villejean⁴¹⁹. Ainsi, nous pouvons affirmer que le galactofuranoside d'octyle ne cible pas le LPG présent à la surface des parasites de leishmanie. Par la suite, plusieurs tests d'activités ont été réalisés avec une bibliothèque de composés dérivés du galactofuranoside d'octyle à savoir des galactofuranoses d'acyle et des furanosides d'octyle fluoré.

Concernant les galactofuranoses d'acyle, la présence de la fonction acyle sur le galactofuranose a permis une augmentation de l'activité contre *L. tarentolae*. Cependant celle-ci demeure encore faible. L'importance de la chaîne grasse a été prouvée par l'absence d'activité des dérivés du galactofuranoside d'octyle dépourvus totalement de chaîne grasse ou contenant une chaîne grasse très courte. Ainsi, l'interaction hydrophobe établit par la chaîne grasse de ces composés avec les queues lipidiques des phospholipides composant la membrane parasitaire est nécessaire pour présenter une activité anti-leishmanienne. Cette observation est en accord avec l'augmentation drastique de la CMI suite à une hydroxylation de la chaîne grasse défavorisant ainsi l'interaction hydrophobe avec la membrane. L'allongement de la chaîne grasse de 8 à 12 carbones associée à la fonction acyle a permis d'augmenter l'activité d'un facteur 2 par rapport au galactofuranoside d'octyle de référence. En revanche, la présence d'insaturation dans la chaîne grasse n'a que peu d'effet sur l'activité de ces composés.

La fluoration des entités furanosyles (monogalactofuranoside ou digalactofuranoside d'octyle) a eu un impact favorable sur l'inhibition de la prolifération de *L. tarentolae*. En effet, une valeur de CMI 4,3 fois plus faible a été déterminée pour le 6-fluoro-galactofuranoside d'octyle par rapport au galactofuranoside d'octyle de référence. La tendance observée par Suleman et coll. quant à

l'importance du cycle à 5 a ici été confirmée puisque la forme pyranose est dépourvue d'activité.

5 Étude préliminaire de l'activité anti-leishmanienne de pseudopeptides

L'efficacité de deux pseudopeptides antimicrobiens sur des bactéries multi-résistantes de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* nous a amené à penser que ces peptides pouvaient également présenter des activités anti-leishmaniennes importantes. C'est pourquoi nous avons entrepris dans un premier temps des tests d'inhibitions sur la souche non-pathogène de *L. tarentolae*. Les tests ont été réalisés de la même manière que précédemment avec le galactofuranoside d'octyle et une CMI de 50 μM a été déterminée pour le pseudopeptide Pep16.

Le Pep16 présente une activité 15 fois supérieure au β -D-galactofuranoside d'octyle de référence sur la prolifération du parasite de *L. tarentolae*. Les tests ayant été réalisés sur une souche non pathogène, il été important de vérifier cette activité par des tests sur des souches virulentes de leishmanies. De ce fait, nous avons entrepris avec le service de parasitologie de Villejean à Rennes des tests avec le Pep16 mais également avec le Pep18 et le Pep19 sur les souches virulentes de *L. infantum* et *L. donovani* responsables respectivement de la leishmaniose viscérale anthroponotique et zoonotique. Les résultats préliminaires d'activités anti-leishmaniennes du Pep19 sur les promastigotes des souches viscérales de *L. infantum* et *L. donovani* sont très prometteurs et sont donc détaillés dans cette thèse.

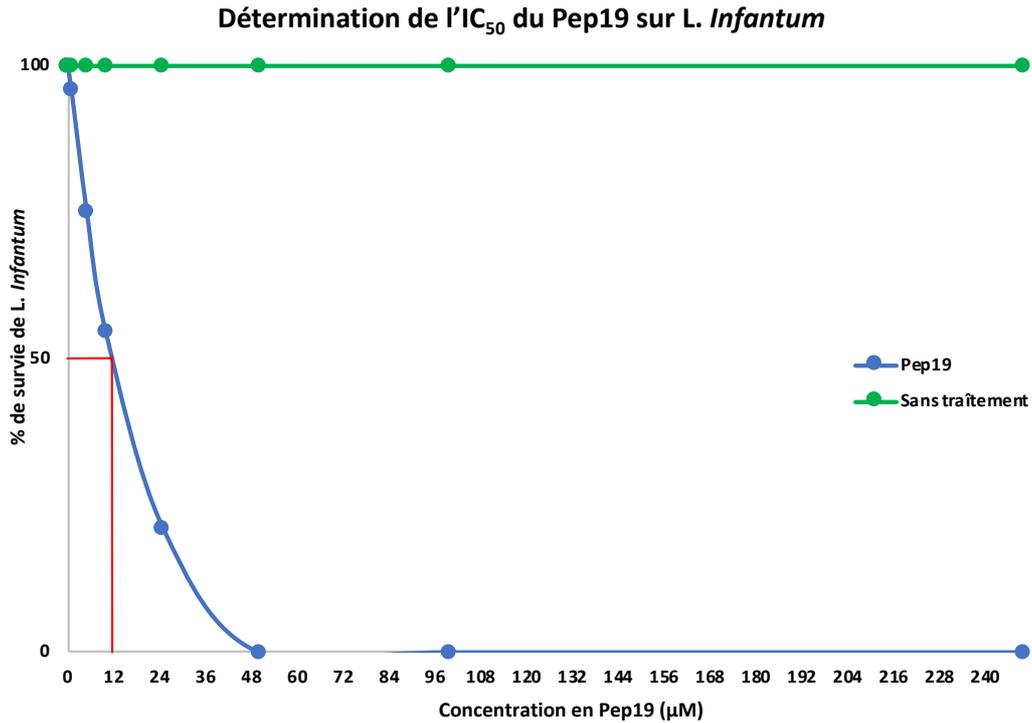


Figure 106 : Détermination de l'IC₅₀ du Pep19 sur le parasite de *L. infantum*

Une valeur d'IC₅₀ de 12 µM a été déterminée pour le Pep19 sur *L. infantum* (Figure 106) tandis qu'une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 1 µM a été déterminée sur *L. donovani* (Figure 107).

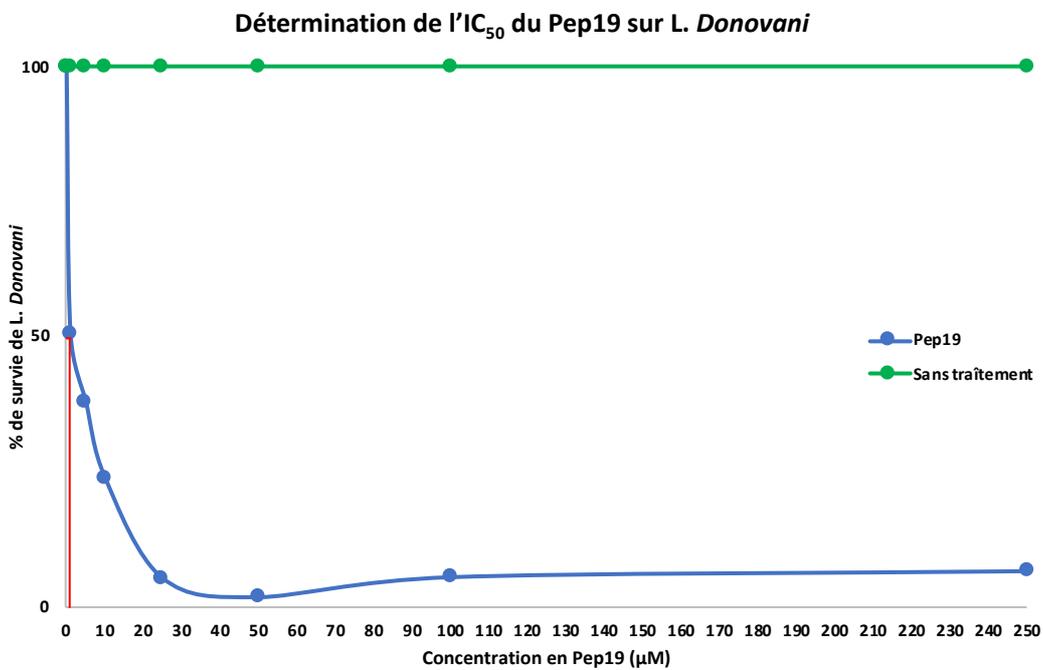


Figure 107 : Détermination de l'IC₅₀ du Pep19 sur le parasite de *L. donovani*

La valeur d'IC₅₀ obtenue pour le Pep19 sur *L. donovani* est entre 5-10 fois plus faible que la valeur d'IC₅₀ obtenu pour *L. infantum*. Bien que dans l'ensemble, le Pep19 présente une excellente efficacité anti-leishmanienne, il semble être plus efficace pour inhiber la croissance à 50 % de *L. donovani* par rapport à *L. infantum*. En revanche, la CMI du Pep19 sur ces deux souches est très similaires (~ 50 µM).

Concernant le Pep18, la tendance observée avec les tests préliminaires d'activités anti-leishmaniennes indique que ce peptide antimicrobien est très faiblement actif contre le parasite de *L. infantum* dans la gamme de concentration testée soit jusqu'à 250 µM (CMI > 250 µM). L'activité du Pep18 contre la souche de *L. donovani* semble être légèrement meilleure, cependant celle-ci demeure modérée.

Le Pep16 semble présenter une activité contre *L. donovani* similaire à celle observée pour *L. tarentolae*. Ainsi, *L. tarentolae* constitue une véritable souche analogue de *L. donovani*. La souche de *L. tarentolae* peut donc être utilisée en substitution de la souche virulente de *L. donovani* par les laboratoires non habilités à l'utilisation de souches pathogènes. Cette observation est en accord avec Wyatt et *al.* stipulant que la pharmacologie des inhibiteurs de *L. tarentolae* est globalement semblable à celle de *L. donovani*⁴²⁴.

Il apparaît que la présence de résidus aza-β³ pour le Pep16 et Pep19, leur confère une meilleure efficacité anti-leishmanienne. Cette tendance concorde parfaitement avec les résultats qui ont été obtenus dans une étude précédente par le groupe de B. Felden sur des bactéries multi-résistantes¹¹. Les tests préliminaires ont montré des activités anti-leishmaniennes très prometteuses pour le Pep16 et le Pep19. Des investigations plus poussées seront nécessaires pour confirmer ces premières données.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse était d'obtenir une meilleure compréhension des interactions existantes entre les composés antimicrobiens et antiparasitaires avec le glyco-calix des bactéries et des parasites. Pour cela, nous avons déterminé les structures tridimensionnelles de différents peptides antimicrobiens (PAM) en milieux membranaires et étudié leur mode d'action.

Les peptides dont les structures tridimensionnelles ont été déterminées au cours de cette thèse (altérine980 et Pep19) présentent un mode d'action relativement similaire avec une première interaction électrostatique et une seconde interaction hydrophobe. Ces deux peptides ont été identifiés comme des PAM de liaison au LPS des bactéries à Gram négatif comme c'est le cas, par exemple, pour la polymyxine B.

La réalisation de cette thèse a ouvert plusieurs perspectives de recherche :

- En complément du rôle des charges que nous avons mis en évidence avec l'utilisation de SUV anioniques et zwitterioniques il serait intéressant d'étudier le rôle de la fluidité membranaire. Pour cela deux approches sont envisagées :
 - L'utilisation de divers lipides avec notamment une variation au niveau de la longueur des chaînes.
 - L'utilisation de cholestérol uniquement présent dans les membranes des cellules eucaryotes afin de différencier les membranes des cellules eucaryotes de celles des cellules bactériennes.
- Il serait particulièrement intéressant de caractériser la structure de LPS de souches sensibles et résistantes. Cette caractérisation réalisée par spectrométrie de masse à Quimper sera réalisée par le groupe de Y. Fleury. Cela permettrait de mettre en évidence le rôle possible des modifications du LPS et ainsi de définir si les variations d'activité antimicrobienne des peptides sont associées à des différences d'affinité pour le LPS. La caractérisation de la structure tridimensionnelle des peptides avec des LPS de souches sensibles et résistantes permettrait d'obtenir de plus amples renseignements sur le mode d'action de ces peptides.
- Des travaux d'interactions de ces PAM sur des bactéries entières sont actuellement en cours au laboratoire. Les premiers résultats sur des souches bactériennes entières d'*E.*

Coli montrent la présence d'une interaction dynamique du Pep19. Cette interaction a-t-elle lieu avec la bactérie entière ou avec du LPS que les bactéries auraient libéré ?

- La présence de charges négatives en surface des parasites de *Leishmania*, nous a incité à réaliser des tests d'inhibitions avec les pseudopeptides présentés dans cette thèse. Les résultats préliminaires, très prometteurs nécessitent d'être confirmés. Des tests sur amastigotes sont également envisagés.

Matériels et méthodes - Chapitre I et II

1 Préparation des SUV

Les phospholipides de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) provenant de chez Avanti Polar Lipids sont pesés de manière à avoir 70 % de DOPC et 30 % de DOPS puis solubilisés dans du chloroforme. Le chloroforme est alors retiré par évaporation rotative jusqu'à obtention d'un film lipidique qui est ensuite placé sous vide durant toute la nuit. Le film lipidique est ensuite réhydraté avec une quantité d'eau contenant 10 % de D₂O (H₂O/D₂O : 90/10) de manière à obtenir des concentrations de vésicules multilamellaires (MLV) entre 60 et 100 mM selon la préparation. Les petites vésicules unilamellaires (SUV) sont obtenues par sonication de la solution de MLV à température ambiante après ajustement du pH^{340,425}. Le sonicateur (U200S, UKA Labortechnik) utilisé était équipé d'une micro-pointe. La suspension claire de SUV obtenue a été centrifugée afin d'éliminer les résidus de titane provenant de la sonde du sonicateur³⁴⁰. La même procédure a été utilisée pour la formulation des SUV contenant 100 % de DOPC. Les SUV obtenues ont été contrôlées par DLS⁴²⁶. Relativement homogènes, les SUV présentaient une taille d'environ 100 nm (Figure 108).

2 Préparation des micelles de LPS

Nous avons utilisé le LPS d'*E. Coli* K235 provenant de chez Sigma Aldrich (LPS L2268) sans aucune autre purification. Le LPS a été pesé puis dissous dans l'eau (90% H₂O – 10% D₂O) afin d'obtenir une concentration de 1 mM. Le LPS a une CMC de l'ordre du micromolaire et forme donc facilement des micelles à 1 mM. Le pH a été ajusté à 4,5.

3 Bactérie utilisée en RMN

Les bactéries utilisées pour les expériences RMN ont été obtenues par Mme Valérie Bordeau. Ce sont des *E. coli* (K12) cultivées jusqu'à la phase stationnaire de croissance. La culture est réalisée à partir d'une seule colonie sur gélose de milieu Luria-Bertani (LB) sur laquelle est additionnée 10 mL de milieu LB liquide. La culture est ensuite placée à l'incubateur à 37°C avec une agitation de 160 tr/min pendant 24 H. La culture est ensuite centrifugée pendant 15 minutes à 4500 tr/min. Le surnageant est retiré et le culot bactérien repris dans 10 mL d'eau

stérile. La solution est de nouveau centrifugée pendant 15 minutes à 4500 tr/min, le surnageant est alors retiré et le culot bactérien repris dans 10 mL d'eau stérile pour un second lavage. Le culot bactérien est alors récupéré pour les expériences en RMN.

3.1 Comptage des bactéries

Après les 24 H de culture à 37 °C, un aliquot de 20 µL est dilué de 10 en 10 dans de l'eau stérile jusqu'à atteindre une dilution de 10^{12} . A chaque dilution, 10 µL sont déposés sur gélose de milieu LB est placé à l'incubateur à 37 °C pendant 24H. Les unités de formation de colonie (CFU : Colony Forming Unit) sont alors évaluées et le nombre de bactéries présentes dans l'inoculum de départ estimé.

4 Diffusion dynamique de la lumière

La taille des SUV a été contrôlée pour chaque formulation par diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering)⁴²⁶ (Figure 108) sur un appareil Zetasizer Nano ZS fabriqué par Malvern.

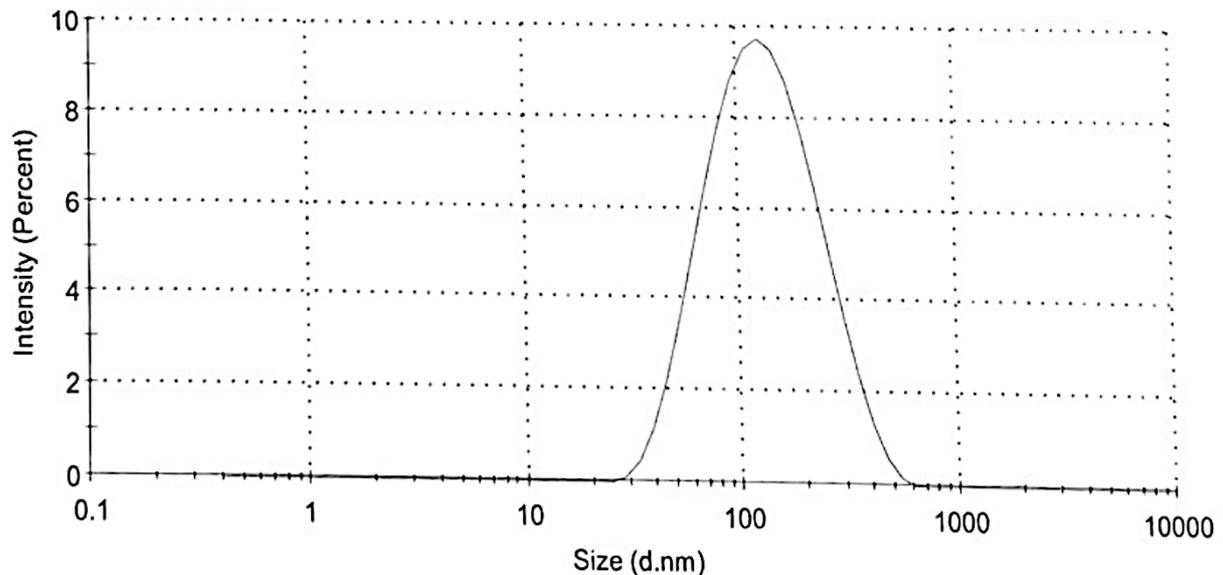


Figure 108 : Exemple de courbe obtenue en DLS pour les SUV de DOPC/DOPS dans l'eau à 25°C montrant une taille relativement homogène avec une taille des SUV de l'ordre de 100 nm. Un angle d'observation de 90° et le logiciel Zetasizer ont été utilisés

5 Spectroscopie RMN

Les échantillons RMN contenaient 0,57 à 5,24 mM de Pep19, Pep18 ou d'altérine980 mis en solution dans l'eau (90 % H₂O – 10 % D₂O) avec un pH de 4 – 5. Les différents peptides ont été étudiés en présence de micelles de LPS et de SUV à la fois anioniques (DOPC/DOPS) et zwitterioniques (DOPC). Les SUV utilisés étaient toujours fraîchement préparées. Les rapports peptides / micelles de LPS étaient de 1 : 0,0169 ; 1 : 0,021 et 1 : 0,0141 pour les Pep19, Pep18 et altérine980 respectivement. Dans le cas du Pep19 également étudié en présence de SUV, le rapport Pep19 : SUV DOPC/DOPS (lipide) était de 1 : 0,4 et le rapport Pep19 : SUV DOPC (lipide) était de 1 : 3. L'ensemble des spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance NEO 500 MHz équipé d'une cryosonde inverse triple résonance (TCI : ¹H, ¹³C, ¹⁵N) de 5 mm. Les déplacements chimiques ¹H des peptides ont été attribués à partir d'une série de spectres 2D homonucléaires : COSY, TOCSY, Tr-NOESY. Cette série de spectre a été enregistrée en mode phasé States-TPPI à partir des séquences Bruker standard en utilisant une matrice composée de 400 (F1) x 4096 (F2) points et une largeur spectrale de 6266 Hz dans les deux dimensions. Le nombre de scan utilisé en COSY et TOCSY étaient de 56 et 48 respectivement. En NOESY, 8 expériences de 8 scans sont réalisées et les spectres résultants sont additionnés de manière à supprimer au maximum le bruit t1 comme il a été récemment suggéré⁴²⁷. Pour toutes les expériences le délai de recyclage était de 1,0 s. Pour les spectres TOCSY un temps de mélange de 80 à 100 ms a été utilisé et pour les spectres Tr-NOESY le temps de mélange était de 100 à 150 ms. Les spectres ont été traités via le logiciel TopSpin 4.0.5 de Bruker. Un zero-filling de 1024 (F1) x 2048 (F2) points a été appliqué après une apodisation par une fonction sinus carré dans les deux dimensions. L'acide triméthylsilylpropanoïque (TSP) a été utilisé comme référence interne pour la calibration des déplacements chimiques. La procédure d'attribution séquentielle classique a été utilisée pour l'attribution des déplacements chimiques ¹H³¹⁴. Les pics croisés Tr-NOE ont été assignés puis intégrés à partir du logiciel NMRView⁴²⁸.

6 Modélisation moléculaire

La distance entre les protons d'un méthylène est de 1,8 Å. De ce fait, nous avons utilisé comme référence les volumes de pics des protons diastéréotopes appartenant aux différents méthylènes de la molécule afin de définir les limites. Pour toutes les contraintes une limite inférieure de 1,8 Å a été définie. Concernant les limites supérieures elles ont été fixées à 2,7, 3,3 et 5,0 Å pour les corrélations fortes, moyennes et faibles respectivement.

En amont du calcul des structures réalisé à partir du logiciel AMBER 17³²⁴, nous avons imposé des angles de 180° sur toutes les liaisons peptidiques. Le calcul à partir d'AMBER 17 comprend deux étapes. La première étape dite de cuisson réalisée à 1 000 K qui permet de générer 100 structures aléatoire initiales. La seconde étape comprend des calculs de recuit simulés réalisés pendant 20 ps soit 20 000 pas de 1 fs. Cette seconde étape commence par une augmentation rapide de la température jusqu'à 1 000 K. La température est alors maintenue pendant les 5000 premiers pas puis le système est refroidi à 100 K progressivement. Celle-ci est ensuite maintenue de l'étape 5 001 à 18 000. Pour les 2 000 pas restant, la température a été portée à 0 K. Une augmentation progressive de la contrainte de force de 2,0 à 20 kcal.mol⁻¹.Å a été appliquée pour les 3 000 premier pas puis maintenue à 20 kcal.mol⁻¹.Å pour les 17 000 étapes restantes. Les 20 structures de plus basse énergie ne présentant aucune violation au-delà de 0,3 Å sont considérées comme représentatives de la structure adoptée par le peptide dans le milieu dans lequel il a été étudié. La représentation des structures a été effectuée en utilisant MOLMOL³²⁸.

Matériels et méthodes - Chapitre III

1 Culture des *Leishmania*

Les cultures des promastigotes de *L. tarentolae* (souche Tar II : ATCC®30267) de *L. donovani* et de *L. infantum* sont réalisées dans un milieu M199 dans lequel sont additionné 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, 40 µM HEPES, 100 µM d'adénine, 5 µM d'hémine, 1 µM de biotine, 3 µM de biopérine et 1 µM de pénicilline / streptomycine. Le pH du milieu M199 supplémenté est ajusté à 7,4 et les cultures sont réalisées à 27 °C avec une agitation à 50 tr/min pendant 6 jours jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance.

2 Culture de *C. fasciculata*

Les cultures des promastigotes de *C. fasciculata* sont réalisées dans un milieu drosophile de Schneider dans lequel est additionné 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur. Les cultures sont réalisées à 27 °C avec une agitation à 50 tr/min pendant 5 jours jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance.

3 Comptage des parasites

Les parasites sont dilués dans une solution de PBS à 0,1M contenant 4% de formol. Le formol va permettre d'immobiliser les parasites et ainsi faciliter le comptage au microscope réalisé à l'aide de cellule de comptage (KOVA® Glasstic® Slide 10).

4 Traitement des cultures et préparation d'échantillons pour l'étude par RMN

Une fois la phase stationnaire de croissance atteinte, la viabilité des parasites est contrôlée au microscope. La culture est ensuite centrifugée à 500 g pendant 20 min, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du milieu drosophile de Schneider. Cette opération est répétée trois fois afin d'éliminer toutes traces du sérum bovin foetal ou autres composés pouvant interagir avec l'octyl-β-D-galactofuranose. La viabilité des parasites est vérifiée au microscope après chaque centrifugation.

Pour comparer l'affinité du Galf avec *C. fasciculata* et *L. tarentolae*, il est important d'avoir la même charge parasitaire et la même concentration en Galf pour toutes les expériences. 10^7 parasites sont introduits dans un tube RMN de 5 mm contenant une solution de β -D-galactofuranose d'octyle à 3,6 mM préparé dans du milieu drosophile de Schneider. Le tube est ensuite complété à 600 μ L avec du milieu drosophile de Schneider.

5 Préparation des galactofuranoses d'acyle et des furanosides d'octyle fluoré pour les tests d'inhibitions

Différentes quantités de galactofuranoses d'acyle et de furanosides d'octyle fluoré ont été solubilisées dans le milieu M199 supplémenté comme décrit précédemment afin d'obtenir un volume total de 1 mL avec les concentrations suivantes des différents composés : 0, 50, 100, 250, 500 et 750 μ mol L⁻¹. Chaque tube contenait 10 μ L de culture soit 10^5 parasites de *L. tarentolae*. Un nombre égal de tubes sans inoculum de *L. tarentolae* a été préparé en parallèle pour être utilisé comme témoin négatif. Tous les échantillons sont ensuite placés à l'incubateur pendant 3 jours à 27 °C et 50 tr/min.

6 Test d'inhibition

La résazurine (IUPAC: 7-hydroxy-10-oxidophénoxazin-10-ium-3-one) également connue sous le nom de Alamar Blue a été utilisée pour les tests de détermination des CMI des différents composés⁴²⁹. La résazurine est un colorant bleu non fluorescent réduit en un composé rose extrêmement fluorescent nommé la résosfurine. Cette réduction s'effectue via l'activité métabolique des cellules viables par acceptation d'électrons. Ce test est considéré comme le plus facile et le plus rapide à mettre en place⁴³⁰. D'un modèle cellulaire à un autre, l'optimisation du test de viabilité est nécessaire. Dans le cas des protozoaires du genre *Leishmania*, nous nous sommes basés sur le protocole décrit par Kulshrestha et al.⁴³¹. Par conséquent, une solution de résazurine à 0,0125 % dans du PBS est préparé (m/v). Pour cela, 1,25 mg de résazurine est solubilisé dans 10 mL d'une solution saline de tampon phosphate (PBS) à 0,1 M. Cette solution est ensuite filtrée (0,2 μ m) sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). 50 μ L de cette solution sont introduit dans chaque tube sous le PSM.

Les tubes sont ensuite placés pendant 4 h dans un incubateur à 37 °C et une agitation de 100 tr / min. 400 µL de chacun des échantillons sont centrifugés à 5000 tr / min, pendant 5 min. 200 µL de surnageant de ces échantillons sont ensuite introduit dans les puits d'une microplaque à 96 puits.

Cette microplaque comporte un ensemble de contrôles : le β-D-galactofuranose d'octyle à 750 µM ainsi que le milieu de culture complet sans inoculum de *L. tarentolae*, servant tous deux de contrôle positif et une culture contenant seulement les promastigotes de *L. tarentolae* pour le contrôle négatif. Une ligne de la microplaque comporte le composé testé aux différentes concentrations. L'absorbance de chaque puits est ensuite mesurée à 602 nm. La CMI de l'échantillon sans inoculum de *L. tarentolae* est définie comme la concentration où 99% de la croissance parasitaire est inhibée. Les valeurs d'absorbances des puits traités sont exprimées en pourcentage de viabilité par rapport aux contrôles sans traitements.

Bibliographie

- (1) Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4* (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- (2) *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*; World Health Organization, Ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
- (3) Cosgrove, S. E. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42* (Supplement_2), S82–S89. <https://doi.org/10.1086/499406>.
- (4) de Kraker, M. E. A.; Stewardson, A. J.; Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year Due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Med.* **2016**, *13* (11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>.
- (5) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>.
- (6) Mishra, A. K.; Choi, J.; Moon, E.; Baek, K.-H. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2018**, *23* (4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>.
- (7) Feng, P.; Wang, Z.; Yu, X. Predicting Antimicrobial Peptides by Using Increment of Diversity with Quadratic Discriminant Analysis Method. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* **2019**, *16* (4), 1309–1312. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2017.2669302>.
- (8) Offret, C.; Rochard, V.; Laguerre, H.; Mounier, J.; Huchette, S.; Brillet, B.; Le Chevalier, P.; Fleury, Y. Protective Efficacy of a Pseudoalteromonas Strain in European Abalone, *Haliotis Tuberculata*, Infected with *Vibrio Harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11* (1), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9389-8>.
- (9) Defer, D.; Desriac, F.; Henry, J.; Bourgougnon, N.; Baudy-Floc'h, M.; Brillet, B.; Le Chevalier, P.; Fleury, Y. Antimicrobial Peptides in Oyster Hemolymph: The Bacterial Connection. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *34* (6), 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357>.
- (10) Saravanan, R.; Joshi, M.; Mohanram, H.; Bhunia, A.; Mangoni, M. L.; Bhattacharjya, S. NMR Structure of Temporin-1 Ta in Lipopolysaccharide Micelles: Mechanistic Insight into Inactivation by Outer Membrane. *PLoS ONE* **2013**, *8* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072718>.
- (11) Nicolas, I.; Bordeau, V.; Bondon, A.; Baudy-Floc'h, M.; Felden, B. Novel Antibiotics Effective against Gram-Positive and -Negative Multi-Resistant Bacteria with Limited Resistance. *PLoS Biol.* **2019**, *17* (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000337>.
- (12) Dali, H.; Busnel, O.; Hoebeke, J.; Bi, L.; Decker, P.; Briand, J.-P.; Baudy-Floc'h, M.; Muller, S. Heteroclitic Properties of Mixed Alpha- and Aza-Beta3-Peptides Mimicking a Supradominant CD4 T Cell Epitope Presented by Nucleosome. *Mol. Immunol.* **2007**, *44* (11), 3024–3036. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.028>.
- (13) Cheguillaume, A.; Salaün, A.; Sinbandhit, S.; Potel, M.; Gall, P.; Baudy-Floc'h, M.; Le Grel, P. Solution Synthesis and Characterization of Aza-B3-Peptides (N α -Substituted Hydrazino Acetic Acid Oligomers). *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (14), 4923–4929. <https://doi.org/10.1021/jo001500d>.
- (14) Cheguillaume, A.; Lehardy, F.; Bouget, K.; Baudy-Floc'h, M.; Le Grel, P. Submonomer Solution Synthesis of Hydrazinoazapeptoids, a New Class of Pseudopeptides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (8), 2924–2927. <https://doi.org/10.1021/jo981487l>.
- (15) Laurencin, M.; Amor, M.; Fleury, Y.; Baudy-Floc'h, M. De Novo Cyclic Pseudopeptides Containing Aza-B3-Amino Acids Exhibiting Antimicrobial Activities. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (24), 10885–10895. <https://doi.org/10.1021/jm3009037>.
- (16) Laurencin, M.; Legrand, B.; Duval, E.; Henry, J.; Baudy-Floc'h, M.; Zatylny-Gaudin,

- C.; Bondon, A. From a Marine Neuropeptide to Antimicrobial Pseudopeptides Containing Aza-B3-Amino Acids: Structure and Activity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (5), 2025–2034. <https://doi.org/10.1021/jm2011595>.
- (17) Laurencin, M.; Simon, M.; Fleury, Y.; Baudy-Floc'h, M.; Bondon, A.; Legrand, B. Selectivity Modulation and Structure of α /Aza-B3 Cyclic Antimicrobial Peptides. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (23), 6191–6201. <https://doi.org/10.1002/chem.201800152>.
- (18) Levy, S. B.; Marshall, B. Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses. *Nat. Med.* **2004**, *10* (12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>.
- (19) Suleman, M.; Gangneux, J.-P.; Legentil, L.; Belaz, S.; Cabezas, Y.; Manuel, C.; Dureau, R.; Sergent, O.; Burel, A.; Daligault, F.; Ferrières, V.; Robert-Gangneux, F. Alkyl Galactofuranosides Strongly Interact with Leishmania Donovanii Membrane and Provide Antileishmanial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (4), 2156–2166. <https://doi.org/10.1128/AAC.01350-13>.
- (20) Hancock, R. E. W.; Lehrer, R. Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (2), 82–88. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01156-6).
- (21) Wang, Z.; Wang, G. APD: The Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Database issue), D590–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh025>.
- (22) Hancock, R. E. W.; Diamond, G. The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (9), 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0).
- (23) Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G. Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>.
- (24) Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (Database issue), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
- (25) Dubos, R. J. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : I. PREPARATION OF THE AGENT. ITS ACTIVITY IN VITRO. *J. Exp. Med.* **1939**, *70* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1084/jem.70.1.1>.
- (26) Hoffmann, J. A. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **1999**, *284* (5418), 1313–1318. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>.
- (27) Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, Å.; Bennich, H.; Boman, H. G. Pillars Article: Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity. *Nature* **1981**, *292*: 246–248. *J. Immunol.* **2009**, *182* (11), 6635–6637.
- (28) Zasloff, M. Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (15), 5449–5453.
- (29) Marion, D.; Zasloff, M.; Bax, A. A Two-Dimensional NMR Study of the Antimicrobial Peptide Magainin 2. *FEBS Lett.* **1988**, *227* (1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81405-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81405-4).
- (30) Cammers-Goodwin, A.; Allen, T. J.; Oslick, S. L.; McClure, K. F.; Lee, J. H.; Kemp, D. S. Mechanism of Stabilization of Helical Conformations of Polypeptides by Water Containing Trifluoroethanol. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (13), 3082–3090. <https://doi.org/10.1021/ja952900z>.
- (31) Ting, C.-H.; Huang, H.-N.; Huang, T.-C.; Wu, C.-J.; Chen, J.-Y. The Mechanisms by Which Pardaxin, a Natural Cationic Antimicrobial Peptide, Targets the Endoplasmic Reticulum and Induces c-FOS. *Biomaterials* **2014**, *35* (11), 3627–3640. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.032>.
- (32) Thompson, S. A.; Tachibana, K.; Nakanishi, K.; Kubota, I. Melittin-Like Peptides from the Shark-Repelling Defense Secretion of the Sole *Pardachirus Pavoninus*. *Science* **1986**, *233*

- (4761), 341–343. <https://doi.org/10.1126/science.233.4761.341>.
- (33) Qian, S.; Heller, W. T. Melittin-Induced Cholesterol Reorganization in Lipid Bilayer Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (10, Part A), 2253–2260. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.012>.
- (34) Sitaram, N.; Nagaraj, R. Interaction of Antimicrobial Peptides with Biological and Model Membranes: Structural and Charge Requirements for Activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462* (1), 29–54. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00199-6).
- (35) All-D-Magainin: Chirality, Antimicrobial Activity and Proteolytic Resistance. *FEBS Lett.* **1990**, *274* (1–2), 151–155. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81351-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81351-N).
- (36) Oren, Z.; Hong, J.; Shai, Y. A Repertoire of Novel Antibacterial Diastereomeric Peptides with Selective Cytolytic Activity. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (23), 14643–14649. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14643>.
- (37) Hong, J.; Oren, Z.; Shai, Y. Structure and Organization of Hemolytic and Nonhemolytic Diastereomers of Antimicrobial Peptides in Membranes. *Biochemistry* **1999**, *38* (51), 16963–16973. <https://doi.org/10.1021/bi991850y>.
- (38) Shai, Y.; Oren, Z. Diastereomers of Cytolysins, a Novel Class of Potent Antibacterial Peptides. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (13), 7305–7308. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7305>.
- (39) Nüsslein, K.; Arnt, L.; Rennie, J.; Owens, C.; Tew, G. N. Broad-Spectrum Antibacterial Activity by a Novel Abiogenic Peptide Mimic. *Microbiology* **2006**, *152* (7), 1913–1918. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28812-0>.
- (40) Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. Anti-Microbial Peptides: From Invertebrates to Vertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198* (1), 169–184. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>.
- (41) Fehlbaum, P.; Bulet, P.; Chernysh, S.; Briand, J. P.; Roussel, J. P.; Letellier, L.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A. Structure-Activity Analysis of Thanatin, a 21-Residue Inducible Insect Defense Peptide with Sequence Homology to Frog Skin Antimicrobial Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (3), 1221–1225.
- (42) Romeo, D.; Skerlavaj, B.; Bolognesi, M.; Gennaro, R. Structure and Bactericidal Activity of an Antibiotic Dodecapeptide Purified from Bovine Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (20), 9573–9575.
- (43) Kokryakov, V. N.; Harwig, S. S. L.; Panyutich, E. A.; Shevchenko, A. A.; Aleshina, G. M.; Shamova, O. V.; Korneva, H. A.; Lehrer, R. I. Protegrins: Leukocyte Antimicrobial Peptides That Combine Features of Corticostatic Defensins and Tachyplesins. *FEBS Lett.* **1993**, *327* (2), 231–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80175-T](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80175-T).
- (44) Silva, P. I.; Daffre, S.; Bulet, P. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-Rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (43), 33464–33470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001491200>.
- (45) Shafee, T. M. A.; Lay, F. T.; Hulett, M. D.; Anderson, M. A. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33* (9), 2345–2356. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>.
- (46) Shafee, T. M. A.; Lay, F. T.; Phan, T. K.; Anderson, M. A.; Hulett, M. D. Convergent Evolution of Defensin Sequence, Structure and Function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74* (4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>.
- (47) Cornet, B.; Bonmatin, J.-M.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Ptak, M.; Vovelle, F. Refined Three-Dimensional Solution Structure of Insect Defensin A. *Structure* **1995**, *3* (5), 435–448. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00177-0).
- (48) Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.

- (49) Frank, R. W.; Gennaro, R.; Schneider, K.; Przybylski, M.; Romeo, D. Amino Acid Sequences of Two Proline-Rich Bactenecins. Antimicrobial Peptides of Bovine Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (31), 18871–18874.
- (50) Gennaro, R.; Skerlavaj, B.; Romeo, D. Purification, Composition, and Activity of Two Bactenecins, Antibacterial Peptides of Bovine Neutrophils. *Infect. Immun.* **1989**, *57* (10), 3142–3146.
- (51) Agerberth, B.; Lee, J.-Y.; Bergman, T.; Carlquist, M.; Boman, H. G.; Mutt, V.; Jörnvall, H. Amino Acid Sequence of PR-39. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202* (3), 849–854. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16442.x>.
- (52) Xu, T.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D.; Oppenheim, F. G. Anticandidal Activity of Major Human Salivary Histatins. *Infect. Immun.* **1991**, *59* (8), 2549–2554.
- (53) Helmerhorst, E. J.; Hof, W. van't; Breeuwer, P.; Veerman, E. C. I.; Abee, T.; Troxler, R. F.; Amerongen, A. V. N.; Oppenheim, F. G. Characterization of Histatin 5 with Respect to Amphipathicity, Hydrophobicity, and Effects on Cell and Mitochondrial Membrane Integrity Excludes a Candidacidal Mechanism of Pore Formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5643–5649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008229200>.
- (54) Oppenheim, F. G.; Xu, T.; McMillian, F. M.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D.; Offner, G. D.; Troxler, R. F. Histatins, a Novel Family of Histidine-Rich Proteins in Human Parotid Secretion. Isolation, Characterization, Primary Structure, and Fungistatic Effects on *Candida Albicans*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (16), 7472–7477.
- (55) Selsted, M. E.; Novotny, M. J.; Morris, W. L.; Tang, Y. Q.; Smith, W.; Cullor, J. S. Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (7), 4292–4295.
- (56) Lawyer, C.; Pai, S.; Watabe, M.; Borgia, P.; Mashimo, T.; Eagleton, L.; Watabe, K. Antimicrobial Activity of a 13 Amino Acid Tryptophan-Rich Peptide Derived from a Putative Porcine Precursor Protein of a Novel Family of Antibacterial Peptides. *FEBS Lett.* **1996**, *390* (1), 95–98. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00637-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00637-0).
- (57) Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
- (58) Hill, C.; Draper, L.; Ross, R.; Cotter, P. Lantibiotic Immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2008**, *9* (1), 39–49. <https://doi.org/10.2174/138920308783565750>.
- (59) Whitmore, L.; Chugh, J. K.; Snook, C. F.; Wallace, B. A. The Peptaibol Database: A Sequence and Structure Resource. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (11–12), 663–665. <https://doi.org/10.1002/psc.533>.
- (60) Shin, J. M.; Gwak, J. W.; Kamarajan, P.; Fenno, J. C.; Rickard, A. H.; Kapila, Y. L. Biomedical Applications of Nisin. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120* (6), 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>.
- (61) Willey, J. M.; van der Donk, W. A. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61* (1), 477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501>.
- (62) Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 633–684. <https://doi.org/10.1021/cr030105v>.
- (63) Draper, L. A.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. Lantibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2015**, *79* (2), 171–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-14>.
- (64) Parisot, J.; Carey, S.; Breukink, E.; Chan, W. C.; Narbad, A.; Bonev, B. Molecular Mechanism of Target Recognition by Subtilin, a Class I Lanthionine Antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (2), 612–618. <https://doi.org/10.1128/AAC.00836-07>.
- (65) Kellner, R.; Jung, G.; Hörner, T.; Zähner, H.; Schnell, N.; Entian, K.-D.; Götz, F. Gallidermin: A New Lanthionine-Containing Polypeptide Antibiotic. *Eur. J. Biochem.* **1988**,

- 177 (1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14344.x-i2>.
- (66) Götz, F.; Perconti, S.; Popella, P.; Werner, R.; Schlag, M. Epidermin and Gallidermin: Staphylococcal Lantibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304* (1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.012>.
- (67) Kirschbaum, J.; Krause, C.; Winzheimer, R. K.; Brückner, H. Sequences of Alamethicins F30 and F50 Reconsidered and Reconciled. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (11–12), 799–809. <https://doi.org/10.1002/psc.535>.
- (68) Duclohier, H.; Molle, G.; Spach, G. The Influence of the Trichorzianin C-Terminal Residues on the Ion Channel Conductance in Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1989**, *987* (1), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90465-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90465-3).
- (69) Leclerc, G.; Goulard, C.; Prigent, Y.; Bodo, B.; Wróblewski, H.; Rebuffat, S. Sequences and Antimycoplasmic Properties of Longibrachins LGB II and LGB III, Two Novel 20-Residue Peptaibols from *Trichoderma l Ongibrachiatum*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (2), 164–170. <https://doi.org/10.1021/np000240s>.
- (70) Whitmore, L.; Wallace, B. A. Analysis of Peptaibol Sequence Composition: Implications for in Vivo Synthesis and Channel Formation. *Eur. Biophys. J.* **2004**, *33* (3). <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0348-1>.
- (71) Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. Gramicidin S and Its Use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature* **1944**, *154* (3918), 703–703. <https://doi.org/10.1038/154703a0>.
- (72) Berditsch, M.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. The Ability of *Aneurinibacillus Migulanus* (*Bacillus Brevis*) To Produce the Antibiotic Gramicidin S Is Correlated with Phenotype Variation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (20), 6620–6628. <https://doi.org/10.1128/AEM.00881-07>.
- (73) Lee, D. L.; Hodges, R. S. Structure–Activity Relationships of de Novo Designed Cyclic Antimicrobial Peptides Based on Gramicidin S. *Pept. Sci.* **2003**, *71* (1), 28–48. <https://doi.org/10.1002/bip.10374>.
- (74) Salgado, J.; Grage, S. L.; Kondejewski, L. H.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N.; Ulrich, A. S. Membrane-Bound Structure and Alignment of the Antimicrobial Beta-Sheet Peptide Gramicidin S Derived from Angular and Distance Constraints by Solid State 19F-NMR. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (3), 191–208. <https://doi.org/10.1023/a:1012946026231>.
- (75) Stansly, P. G.; Brownlee, G. Nomenclature of Polymyxin Antibiotics. *Nature* **1949**, *163* (4146), 611–611. <https://doi.org/10.1038/163611a0>.
- (76) Yu, Z.; Sun, Z.; Yin, J.; Qiu, J. Enhanced Production of Polymyxin E in *Paenibacillus Polymyxa* by Replacement of Glucose by Starch. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/1934309>.
- (77) Stansly, P. G.; Schlosser, M. E. Studies on Polymyxin: Isolation and Identification of *Bacillus Polymyxa* and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics. *J. Bacteriol.* **1947**, *54* (5), 549–556.
- (78) Li, J.; Nation, R. L.; Kaye, K. S. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*; Springer, 2019.
- (79) Roberts, K. D.; Azad, M. A. K.; Wang, J.; Horne, A. S.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Velkov, T.; Li, J. Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-Line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (11), 568–575. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00085>.
- (80) Phe, K.; Lee, Y.; McDanel, P. M.; Prasad, N.; Yin, T.; Figueroa, D. A.; Musick, W. L.; Cottreau, J. M.; Hu, M.; Tam, V. H. In Vitro Assessment and Multicenter Cohort Study of Comparative Nephrotoxicity Rates Associated with Colistimethate versus Polymyxin B Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (5), 2740–2746. <https://doi.org/10.1128/AAC.02476-13>.

- (81) Arnold, T. M.; Forrest, G. N.; Messmer, K. J. Polymyxin Antibiotics for Gram-Negative Infections. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **2007**, *64* (8), 819–826. <https://doi.org/10.2146/ajhp060473>.
- (82) Zavascki, A. P.; Nation, R. L. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02319-16>.
- (83) Avedissian, S. N.; Liu, J.; Rhodes, N. J.; Lee, A.; Pais, G. M.; Hauser, A. R.; Scheetz, M. H. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiotics* **2019**, *8* (1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010031>.
- (84) Mogi, T.; Kita, K. Gramicidin S and Polymyxins: The Revival of Cationic Cyclic Peptide Antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (23), 3821. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0129-9>.
- (85) Mor, A.; Nguyen Van Huong; Delfour, A.; Migliore-Samour, D.; Nicolas, P. Isolation, Amino Acid Sequence and Synthesis of Dermaseptin, a Novel Antimicrobial Peptide of Amphibian Skin. *Biochemistry* **1991**, *30* (36), 8824–8830. <https://doi.org/10.1021/bi00100a014>.
- (86) Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D. G. Solid-Phase Peptide Synthesis: A Silver Anniversary Report*. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30* (6), 705–739. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1987.tb03385.x>.
- (87) Chang, C.-D.; Meienhofer, J. SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS USING MILD BASE CLEAVAGE OF N α FLUORENYLMETHYLOXYCARBONYLAMINO ACIDS, EXEMPLIFIED BY A SYNTHESIS OF DIHYDROSOMATOSTATIN. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11* (3), 246–249. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1978.tb02845.x>.
- (88) Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc Solid-phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (1), 4–27. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>.
- (89) Wade, D.; Boman, A.; Wählin, B.; Drain, C. M.; Andreu, D.; Boman, H. G.; Merrifield, R. B. All-D Amino Acid-Containing Channel-Forming Antibiotic Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (12), 4761–4765. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4761>.
- (90) Knappe, D.; Piantavigna, S.; Hansen, A.; Mechler, A.; Binas, A.; Nolte, O.; Martin, L. L.; Hoffmann, R. Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRIYNR-NH₂): A Novel Antibacterial Peptide Optimized against Gram-Negative Human Pathogens. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (14), 5240–5247. <https://doi.org/10.1021/jm100378b>.
- (91) Wessolowski, A.; Bienert, M.; Dathe, M. Antimicrobial Activity of Arginine- and Tryptophan-Rich Hexapeptides: The Effects of Aromatic Clusters, d-Amino Acid Substitution and Cyclization. *J. Pept. Res.* **2004**, *64* (4), 159–169. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00182.x>.
- (92) Strøm, M. B.; Rekdal, Ø.; Svendsen, J. S. Antimicrobial Activity of Short Arginine- and Tryptophan-Rich Peptides: SHORT ANTIMICROBIAL PEPTIDES. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8* (8), 431–437. <https://doi.org/10.1002/psc.398>.
- (93) Strøm, M. B.; Haug, B. E.; Skar, M. L.; Stensen, W.; Stiberg, T.; Svendsen, J. S. The Pharmacophore of Short Cationic Antibacterial Peptides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (9), 1567–1570. <https://doi.org/10.1021/jm0340039>.
- (94) Jing, W.; Hunter, H. N.; Hagel, J.; Vogel, H. J. The Structure of the Antimicrobial Peptide Ac-RRWWRF-NH₂ Bound to Micelles and Its Interactions with Phospholipid Bilayers: Antimicrobial Peptide Combi-1. *J. Pept. Res.* **2003**, *61* (5), 219–229. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2003.00050.x>.
- (95) Gallardo-Godoy, A.; Hansford, K. A.; Muldoon, C.; Becker, B.; Elliott, A. G.; Huang, J. X.; Pelington, R.; Butler, M. S.; Blaskovich, M. A. T.; Cooper, M. A. Structure-Function Studies of Polymyxin B Liponapeptides. *Molecules* **2019**, *24* (3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030553>.

- (96) Mak, P.; Pohl, J.; Dubin, A.; Reed, M. S.; Bowers, S. E.; Fallon, M. T.; Shafer, W. M. The Increased Bactericidal Activity of a Fatty Acid-Modified Synthetic Antimicrobial Peptide of Human Cathepsin G Correlates with Its Enhanced Capacity to Interact with Model Membranes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *21* (1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00245-5](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00245-5).
- (97) Avrahami, D.; Shai, Y. Conjugation of a Magainin Analogue with Lipophilic Acids Controls Hydrophobicity, Solution Assembly, and Cell Selectivity. *Biochemistry* **2002**, *41* (7), 2254–2263. <https://doi.org/10.1021/bi011549t>.
- (98) Molchanova, N.; Hansen, P. R.; Franzyk, H. Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *22* (9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091430>.
- (99) Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. β -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert Homologation with Concomitant Peptide Coupling. Structure Determination by NMR and CD Spectroscopy and by X-Ray Crystallography. Helical Secondary Structure of a β -Hexapeptide in Solution and Its Stability towards Pepsin. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79* (4), 913–941. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790402>.
- (100) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (51), 13071–13072. <https://doi.org/10.1021/ja963290l>.
- (101) Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. ‘Mixed’ β -Peptides: A Unique Helical Secondary Structure in Solution. Preliminary Communication. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80* (7), 2033–2038. <https://doi.org/10.1002/hlca.19970800703>.
- (102) Hintermann, T.; Seebach, D. The Biological Stability of β -Peptides: No Interactions between α - and β -Peptidic Structures? **1997**, 4.
- (103) Szekely, T.; Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. α -Peptoides et composés apparentés : synthèse et contrôle de la conformation. *Comptes Rendus Chim.* **2013**, *16* (4), 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2012.11.015>.
- (104) 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. Peptoids: A Modular Approach to Drug Discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (20), 9367–9371. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9367>.
- (105) Hamper, B. C.; Kolodziej, S. A.; Scates, A. M.; Smith, R. G.; Cortez, E. Solid Phase Synthesis of β -Peptoids: N-Substituted β -Aminopropionic Acid Oligomers. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (3), 708–718. <https://doi.org/10.1021/jo971675w>.
- (106) Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Peptoid Oligomers with α -Chiral, Aromatic Side Chains: Sequence Requirements for the Formation of Stable Peptoid Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (28), 6778–6784. <https://doi.org/10.1021/ja003154n>.
- (107) Tang, Y.-C.; Deber, C. M. Hydrophobicity and Helicity of Membrane-Interactive Peptides Containing Peptoid Residues. *Biopolymers* **2002**, *65* (4), 254–262. <https://doi.org/10.1002/bip.10236>.
- (108) Caumes, C.; Hjelmgard, T.; Roy, O.; Reynaud, M.; Servent, D.; Taillefumier, C.; Faure, S. Synthesis and Binding Affinities for Sst Receptors of Cyclic Peptoid SRIF-Mimetics. *MedChemComm* **2012**, *3* (12), 1531–1535. <https://doi.org/10.1039/C2MD20265D>.
- (109) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Comparison of the Proteolytic Susceptibilities of Homologous L-Amino Acid, D-Amino Acid, and N-Substituted Glycine Peptide and Peptoid Oligomers. *Drug Dev. Res.* **1995**, *35* (1), 20–32. <https://doi.org/10.1002/ddr.430350105>.

- (110) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic Studies of Homologous Peptide and N-Substituted Glycine Peptoid Oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (22), 2657–2662. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80691-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80691-0).
- (111) Burkoth, T. S.; Fafarman, A. T.; Charych, D. H.; Connolly, M. D.; Zuckermann, R. N. Incorporation of Unprotected Heterocyclic Side Chains into Peptoid Oligomers via Solid-Phase Submonomer Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (29), 8841–8845. <https://doi.org/10.1021/ja0352101>.
- (112) Gante, J. Synthesis 1989, 405.Pdf.
- (113) Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Hölzemann, G.; Kessler, H. Novel Solid-Phase Synthesis of Azapeptides and Azapeptoides via Fmoc-Strategy and Its Application in the Synthesis of RGD-Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (20), 7388–7394. <https://doi.org/10.1021/jo9906173>.
- (114) Hess, H.-Jurgen.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. **N- [2-Isopropyl-3-(L-Aspartyl-L-Arginyl)-Carbazoyl]-L- Tyrosyl-L-Valyl-L-Histidyl-L-Prolyl-L-Phenylalanine, ¹ an Isostere of Bovine Angiotensin II** . *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (24), 4040–4041. <https://doi.org/10.1021/ja00907a036>.
- (115) Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational Properties of Azapeptides. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *469* (1), 63–76. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00567-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00567-3).
- (116) Bailey, M. D.; Halmos, T.; Goudreau, N.; Lescop, E.; Llinàs-Brunet, M. Novel Azapeptide Inhibitors of Hepatitis C Virus Serine Protease. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (15), 3788–3799. <https://doi.org/10.1021/jm049864b>.
- (117) Randolph, J. T.; Zhang, X.; Huang, P. P.; Klein, L. L.; Kurtz, K. A.; Konstantinidis, A. K.; He, W.; Kati, W. M.; Kempf, D. J. Synthesis, Antiviral Activity, and Conformational Studies of a P3 Aza-Peptide Analog of a Potent Macrocyclic Tripeptide HCV Protease Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (8), 2745–2750. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.053>.
- (118) Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. Crystal Structures of Aza-B3-Peptides, A New Class of Foldamers Relying on a Framework of Hydrazinoturns. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (16), 6499–6502. <https://doi.org/10.1021/jo050938g>.
- (119) Le Grel, P.; Salaün, A.; Potel, M.; Le Grel, B.; Lassagne, F. Aza-B3-Cyclohexapeptides: Pseudopeptidic Macrocycles with Interesting Conformational and Configurational Properties Slow Pyramidal Nitrogen Inversion in 24-Membered Rings! *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (15), 5638–5645. <https://doi.org/10.1021/jo0608467>.
- (120) Mocquet, C.; Salaün, A.; Claudon, P.; Le Grel, B.; Potel, M.; Guichard, G.; Jamart-Grégoire, B.; Le Grel, P. Aza-β³-Cyclopeptides: A New Way of Controlling Nitrogen Chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (40), 14521–14525. <https://doi.org/10.1021/ja9058074>.
- (121) Raetz, C. R. H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
- (122) Kushibiki, T.; Kamiya, M.; Aizawa, T.; Kumaki, Y.; Kikukawa, T.; Mizuguchi, M.; Demura, M.; Kawabata, S.; Kawano, K. Interaction between Tachyplesin I, an Antimicrobial Peptide Derived from Horseshoe Crab, and Lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2014**, *1844* (3), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.017>.
- (123) Nikaido, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* **1994**, *264* (5157), 382–388. <https://doi.org/10.1126/science.8153625>.
- (124) Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2003**, *67* (4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.593-656.2003>.
- (125) Sondhi, P.; Maruf, M. H. U.; Stine, K. J. Nanomaterials for Biosensing Lipopolysaccharide. *Biosensors* **2020**, *10* (1), 2. <https://doi.org/10.3390/bios10010002>.

- (126) Petsch, D.; Anspach, F. B. Endotoxin Removal from Protein Solutions. *J. Biotechnol.* **2000**, *76* (2), 97–119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6).
- (127) Ohno, N.; Morrison, D. C. Lipopolysaccharide Interaction with Lysozyme. Binding of Lipopolysaccharide to Lysozyme and Inhibition of Lysozyme Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (8), 4434–4441.
- (128) Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takeda, Y.; Takeda, K.; Akira, S. Cutting Edge: Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1999**, *162* (7), 3749–3752.
- (129) Takada, H.; Kotani, S. Structural Requirements of Lipid A for Endotoxicity and Other Biological Activities. *Crit. Rev. Microbiol.* **1989**, *16* (6), 477–523. <https://doi.org/10.3109/10408418909104475>.
- (130) Galanos, C.; Lüderitz, O.; Rietschel, E. T.; Westphal, O.; Brade, H.; Brade, L.; Freudenberg, M.; Schade, U.; Imoto, M.; Yoshimura, H. Synthetic and Natural Escherichia Coli Free Lipid A Express Identical Endotoxic Activities. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *148* (1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08798.x>.
- (131) Trent, M. S.; Stead, C. M.; Tran, A. X.; Hankins, J. V. Diversity of Endotoxin and Its Impact on Pathogenesis. *J. Endotoxin Res.* **2006**, *12* (4), 205–223. <https://doi.org/10.1179/096805106X118825>.
- (132) Raetz, C. R. H.; Guan, Z.; Ingram, B. O.; Six, D. A.; Song, F.; Wang, X.; Zhao, J. Discovery of New Biosynthetic Pathways: The Lipid A Story. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (Suppl), S103–S108. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800060-JLR200>.
- (133) Jansson, P. E.; Lindberg, A. A.; Lindberg, B.; Wollin, R. Structural Studies on the Hexose Region of the Core in Lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *115* (3), 571–577. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06241.x>.
- (134) CHABY. *Des endotoxines aux lipopolysaccharides*; Lavoisier, 2010.
- (135) Kusumoto, S.; Fukase, K.; Fukase, Y.; Kataoka, M.; Yoshizaki, H.; Sato, K.; Oikawa, M.; Suda, Y. Structural Basis for Endotoxic and Antagonistic Activities: Investigation with Novel Synthetic Lipid A Analogs. *J. Endotoxin Res.* **2003**, *9* (6), 361–366. <https://doi.org/10.1179/096805103225002737>.
- (136) Kusama, T.; Soga, T.; Ono, Y.; Kumazawa, E.; Shioya, E.; Osada, Y.; Kusumoto, S.; Shiba, T. Synthesis and Biological Activities of Analogs of a Lipid A Biosynthetic Precursor: 1-O-Phosphonoxyethyl-4'-O-Phosphono-Disaccharides with (R)-3-Hydroxytetradecanoyl or Tetradecanoyl Groups at Positions 2, 3, 2' and 3'. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1991**, *39* (8), 1994–1999. <https://doi.org/10.1248/cpb.39.1994>.
- (137) Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zähringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. Bacterial Endotoxin: Molecular Relationships of Structure to Activity and Function. *FASEB J.* **1994**, *8* (2), 217–225. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119492>.
- (138) Flad, H.-D.; Loppnow, H.; Rietschel, E. T.; Ulmer, A. J. Agonists and Antagonists for Lipopolysaccharide-Induced Cytokines. *Immunobiology* **1993**, *187* (3–5), 303–316. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80346-3](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80346-3).
- (139) Mamat, U.; Wilke, K.; Bramhill, D.; Schromm, A. B.; Lindner, B.; Kohl, T. A.; Corchero, J. L.; Villaverde, A.; Schaffer, L.; Head, S. R.; Souvignier, C.; Meredith, T. C.; Woodard, R. W. Detoxifying Escherichia Coli for Endotoxin-Free Production of Recombinant Proteins. *Microb. Cell Factories* **2015**, *14*, 57. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0241-5>.
- (140) Koch, A. L. The Biophysics of the Gram-Negative Periplasmic Space. *Crit. Rev. Microbiol.* **1998**, *24* (1), 23–59. <https://doi.org/10.1080/10408419891294172>.
- (141) Stock, J. B.; Rauch, B.; Roseman, S. Periplasmic Space in Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (21), 7850–7861.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41044-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41044-1).

(142) Miller, S. I.; Salama, N. R. The Gram-Negative Bacterial Periplasm: Size Matters. *PLoS Biol.* **2018**, *16* (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004935>.

(143) Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.

(144) FISCHETTI, V. A. Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7* (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0012-2018>.

(145) Brown, S.; Santa Maria, J. P.; Walker, S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>.

(146) Rajagopal, M.; Walker, S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *404*, 1–44. https://doi.org/10.1007/82_2015_5021.

(147) Brown, S.; Xia, G.; Luhachack, L. G.; Campbell, J.; Meredith, T. C.; Chen, C.; Winstel, V.; Gekeler, C.; Irazoqui, J. E.; Peschel, A.; Walker, S. Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus* Requires Glycosylated Wall Teichoic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (46), 18909–18914. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209126109>.

(148) Campbell, J.; Singh, A. K.; Santa Maria, J. P.; Kim, Y.; Brown, S.; Swoboda, J. G.; Mylonakis, E.; Wilkinson, B. J.; Walker, S. Synthetic Lethal Compound Combinations Reveal a Fundamental Connection between Wall Teichoic Acid and Peptidoglycan Biosyntheses in *Staphylococcus Aureus*. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (1), 106–116. <https://doi.org/10.1021/cb100269f>.

(149) Xia, G.; Kohler, T.; Peschel, A. The Wall Teichoic Acid and Lipoteichoic Acid Polymers of *Staphylococcus Aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, *300* (2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001>.

(150) Laurencin, M. Peptides et Pseudopeptides Auto-Assembleurs à Activité Antimicrobienne. These de doctorat, Rennes 1, 2008.

(151) Travkova, O. G.; Moehwald, H.; Brezesinski, G. The Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *247*, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.001>.

(152) Breukink, E.; de Kruijff, B. The Lantibiotic Nisin, a Special Case or Not? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462* (1), 223–234. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00208-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00208-4).

(153) Mathew, B.; Nagaraj, R. Variations in the Interaction of Human Defensins with *Escherichia Coli*: Possible Implications in Bacterial Killing. *PLoS ONE* **2017**, *12* (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175858>.

(154) Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55* (1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.

(155) Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Antifungal Agents: Mechanisms of Action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11* (6), 272–279. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00117-3).

(156) Breukink, E.; Heusden, H. E. van; Vollmerhaus, P. J.; Swiezewska, E.; Brunner, L.; Walker, S.; Heck, A. J. R.; Kruijff, B. de. Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (22), 19898–19903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301463200>.

(157) Breukink, E.; de Kruijff, B. Lipid II as a Target for Antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (4), 321–323. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>.

(158) Bessalle, R.; Haas, H.; Gorla, A.; Shalit, I.; Fridkin, M. Augmentation of the Antibacterial Activity of Magainin by Positive-Charge Chain Extension. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36* (2), 313–317. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.2.313>.

(159) Matsuzaki, K.; Nakamura, A.; Murase, O.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. Modulation of Magainin 2–Lipid Bilayer Interactions by Peptide Charge [†]. *Biochemistry* **1997**,

- 36 (8), 2104–2111. <https://doi.org/10.1021/bi961870p>.
- (160) Fillion, M.; Valois-Paillard, G.; Lorin, A.; Noël, M.; Voyer, N.; Auger, M. Membrane Interactions of Synthetic Peptides with Antimicrobial Potential: Effect of Electrostatic Interactions and Amphiphilicity. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2015**, *7* (1), 66–74. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9177-z>.
- (161) Juba, M. L.; Porter, D. K.; Williams, E. H.; Rodriguez, C. A.; Barksdale, S. M.; Bishop, B. M. Helical Cationic Antimicrobial Peptide Length and Its Impact on Membrane Disruption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (5), 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.007>.
- (162) Mavri, J.; Vogel, H. J. Ion Pair Formation of Phosphorylated Amino Acids and Lysine and Arginine Side Chains: A Theoretical Study. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1996**, *24* (4), 495–501. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199604\)24:4<495::AID-PROT8>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199604)24:4<495::AID-PROT8>3.0.CO;2-D).
- (163) Powers, J.-P. S.; Hancock, R. E. W. The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity. *Peptides* **2003**, *24* (11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>.
- (164) Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S. Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (6), 1317–1323.
- (165) Canepari, P.; Boaretti, M. Lipoteichoic Acid as a Target for Antimicrobial Action. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **1996**, *2* (1), 85–89. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.85>.
- (166) Matsuzaki, K. Why and How Are Peptide–Lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462* (1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2).
- (167) Yang, L.; Weiss, T. M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W. Crystallization of Antimicrobial Pores in Membranes: Magainin and Protegrin. *Biophys. J.* **2000**, *79* (4), 2002–2009. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76448-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76448-4).
- (168) Wolf, J.; Aisenbrey, C.; Harmouche, N.; Raya, J.; Bertani, P.; Voievoda, N.; Süß, R.; Bechinger, B. PH-Dependent Membrane Interactions of the Histidine-Rich Cell-Penetrating Peptide LAH4-L1. *Biophys. J.* **2017**, *113* (6), 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.053>.
- (169) Bechinger, B.; Gorr, S.-U. Antimicrobial Peptides. *J. Dent. Res.* **2017**, *96* (3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>.
- (170) Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- (171) Luque-Ortega, J. R.; Hof, W. van't; Veerman, E. C. I.; Saugar, J. M.; Rivas, L. Human Antimicrobial Peptide Histatin 5 Is a Cell- Penetrating Peptide Targeting Mitochondrial ATP Synthesis in Leishmania. *FASEB J.* **2008**, *22* (6), 1817–1828. <https://doi.org/10.1096/fj.07-096081>.
- (172) Shai, Y. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. *Pept. Sci.* **2002**, *66* (4), 236–248. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>.
- (173) Pushpanathan, M.; Gunasekaran, P.; Rajendhran, J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *Int. J. Pept.* **2013**, *2013*, 675391. <https://doi.org/10.1155/2013/675391>.
- (174) Huang, H. W. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8347–8352. <https://doi.org/10.1021/bi000946l>.
- (175) Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. Evidence for Membrane Thinning Effect as the Mechanism for Peptide-Induced Pore Formation. *Biophys. J.* **2003**, *84* (6), 3751–3758. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75103-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75103-0).
- (176) Lee, T.-H.; N. Hall, K.; Aguilar, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16* (1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>.

- (177) Ehrenstein, G.; Lecar, H. Electrically Gated Ionic Channels in Lipid Bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10* (1), 1–34. <https://doi.org/10.1017/S0033583500000123>.
- (178) Rapaport, D.; Shai, Y. Aggregation and Organization of Pardaxin in Phospholipid Membranes. A Fluorescence Energy Transfer Study. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (10), 6502–6509.
- (179) Sansom, M. S. P. Alamethicin and Related Peptaibols? Model Ion Channels. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22* (2). <https://doi.org/10.1007/BF00196915>.
- (180) He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L.; Huang, H. W. Neutron Scattering in the Plane of Membranes: Structure of Alamethicin Pores. *Biophys. J.* **1996**, *70* (6), 2659–2666. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79835-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79835-1).
- (181) Song, C.; Weichbrodt, C.; Salnikov, E. S.; Dynowski, M.; Forsberg, B. O.; Bechinger, B.; Steinem, C.; Groot, B. L. de; Zachariae, U.; Zeth, K. Crystal Structure and Functional Mechanism of a Human Antimicrobial Membrane Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (12), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214739110>.
- (182) Hara, T.; Kodama, H.; Kondo, M.; Wakamatsu, K.; Takeda, A.; Tachi, T.; Matsuzaki, K. Effects of Peptide Dimerization on Pore Formation: Antiparallel Disulfide-Dimerized Magainin 2 Analogue. *Biopolymers* **2001**, *58* (4), 437–446. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(20010405\)58:4<437::AID-BIP1019>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0282(20010405)58:4<437::AID-BIP1019>3.0.CO;2-I).
- (183) Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.* **2001**, *81* (3), 1475–1485. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X).
- (184) Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane Pores Induced by Magainin †. *Biochemistry* **1996**, *35* (43), 13723–13728. <https://doi.org/10.1021/bi9620621>.
- (185) Murzyn, K.; Pasenkiewicz-Gierula, M. Construction of a Toroidal Model for the Magainin Pore. *J. Mol. Model.* **2003**, *9* (4), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00894-003-0127-z>.
- (186) Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. Antimicrobial Peptides in Action. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12156–12161. <https://doi.org/10.1021/ja062927q>.
- (187) Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides †. *Biochemistry* **2004**, *43* (12), 3590–3599. <https://doi.org/10.1021/bi036153r>.
- (188) Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogs with Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **1992**, *31* (49), 12416–12423. <https://doi.org/10.1021/bi00164a017>.
- (189) Gazit, E.; Miller, I. R.; Biggin, P. C.; Sansom, M. S. P.; Shai, Y. Structure and Orientation of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 within Phospholipid Membranes. *J. Mol. Biol.* **1996**, *258* (5), 860–870. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0293>.
- (190) I. Fernandez, D.; Brun, A. P. L.; C. Whitwell, T.; Sani, M.-A.; James, M.; Separovic, F. The Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 Disrupts Model Membranes via the Carpet Mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (45), 15739–15751. <https://doi.org/10.1039/C2CP43099A>.
- (191) Shai, Y.; Oren, Z. From “Carpet” Mechanism to de-Novo Designed Diastereomeric Cell-Selective Antimicrobial Peptides. *Peptides* **2001**, *22* (10), 1629–1641. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00498-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00498-3).
- (192) Matsuzaki, K. Membrane Permeabilization Mechanisms. In *Antimicrobial Peptides*; Matsuzaki, K., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer Singapore: Singapore, 2019; Vol. 1117, pp 9–16. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_2.
- (193) Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Miyajima, K.; Epanand, R. M. Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2 †. *Biochemistry* **1998**, *37* (34), 11856–11863. <https://doi.org/10.1021/bi980539y>.
- (194) Moravej, H.; Moravej, Z.; Yazdanparast, M.; Heiat, M.; Mirhosseini, A.; Moosazadeh

- Moghaddam, M.; Mirnejad, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2018**, *24* (6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.
- (195) Moghaddam, M. M.; Abolhassani, F.; Babavalian, H.; Mirnejad, R.; Azizi Barjini, K.; Amani, J. Comparison of in Vitro Antibacterial Activities of Two Cationic Peptides CM15 and CM11 against Five Pathogenic Bacteria: *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, *Vibrio Cholerae*, *Acinetobacter Baumannii*, and *Escherichia Coli*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2012**, *4* (2), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9098-7>.
- (196) Koo, S.-P.; Bayer, A. S.; Yeaman, M. R. Diversity in Antistaphylococcal Mechanisms among Membrane-Targeting Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (8), 4916–4922. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4916-4922.2001>.
- (197) Park, C. B.; Kim, H. S.; Kim, S. C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244* (1), 253–257. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>.
- (198) Park, C. B.; Yi, K.-S.; Matsuzaki, K.; Kim, M. S.; Kim, S. C. Structure–Activity Analysis of Buforin II, a Histone H2A-Derived Antimicrobial Peptide: The Proline Hinge Is Responsible for the Cell-Penetrating Ability of Buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (15), 8245–8250.
- (199) Blondelle, S. E.; Lohner, K.; Aguilar, M.-I. Lipid-Induced Conformation and Lipid-Binding Properties of Cytolytic and Antimicrobial Peptides: Determination and Biological Specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1462* (1), 89–108. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00202-3).
- (200) Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B. A.; Hoffmann, R.; Otvos, L. The Antibacterial Peptide Pyrrolicin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry* **2001**, *40* (10), 3016–3026. <https://doi.org/10.1021/bi002656a>.
- (201) Helmerhorst, E. J.; Troxler, R. F.; Oppenheim, F. G. The Human Salivary Peptide Histatin 5 Exerts Its Antifungal Activity through the Formation of Reactive Oxygen Species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (25), 14637–14642. <https://doi.org/10.1073/pnas.141366998>.
- (202) Sanders, C. R.; Oxenoid, K. Customizing Model Membranes and Samples for NMR Spectroscopic Studies of Complex Membrane Proteins | This Review Is Dedicated to the Fond Memory of Professor Gitte Vold of the University of California, San Diego, CA, USA. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2000**, *1508* (1), 129–145. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00308-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00308-4).
- (203) Bhunia, A.; Domadia, P. N.; Torres, J.; Hallock, K. J.; Ramamoorthy, A.; Bhattacharjya, S. NMR Structure of Pardaxin, a Pore-Forming Antimicrobial Peptide, in Lipopolysaccharide Micelles. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (6), 3883–3895. <https://doi.org/yeam>.
- (204) Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Beaugrand, M.; Gravel, A.; Chartrand, É.; Marcotte, I. Choosing Membrane Mimetics for NMR Structural Studies of Transmembrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2011**, *1808* (8), 1957–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.016>.
- (205) Timmons, P. B.; O’Flynn, D.; Conlon, J. M.; Hewage, C. M. Structural and Positional Studies of the Antimicrobial Peptide Brevinin-1BYa in Membrane-mimetic Environments. *J. Pept. Sci.* **2019**, *25* (11). <https://doi.org/10.1002/psc.3208>.
- (206) Ramirez, L. S.; Pande, J.; Shekhtman, A. Helical Structure of Recombinant Melittin. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (2), 356–368. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08424>.
- (207) Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G. N,N'-Linked Oligoureas as Foldamers:

- Chain Length Requirements for Helix Formation in Protic Solvent Investigated by Circular Dichroism, NMR Spectroscopy, and Molecular Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2156–2164. <https://doi.org/10.1021/ja044392b>.
- (208) Xu, Y.; Yushmanov, V. E.; Tang, P. NMR Studies of Drug Interaction with Membranes and Membrane-Associated Proteins. *Biosci. Rep.* **2002**, *22* (2), 175–196. <https://doi.org/10.1023/A:1020182404940>.
- (209) Haney, E. F.; Hunter, H. N.; Matsuzaki, K.; Vogel, H. J. Solution NMR Studies of Amphibian Antimicrobial Peptides: Linking Structure to Function? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788* (8), 1639–1655. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.002>.
- (210) Jeong, J.-H.; Kim, J.-S.; Choi, S.-S.; Kim, Y. NMR Structural Studies of Antimicrobial Peptides: LPCin Analogs. *Biophys. J.* **2016**, *110* (2), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.006>.
- (211) Gomes, K. A. G. G.; dos Santos, D. M.; Santos, V. M.; Piló-Veloso, D.; Mundim, H. M.; Rodrigues, L. V.; Lião, L. M.; Verly, R. M.; de Lima, M. E.; Resende, J. M. NMR Structures in Different Membrane Environments of Three Ocellatin Peptides Isolated from *Leptodactylus Labyrinthicus*. *Peptides* **2018**, *103*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.03.016>.
- (212) Henry, G. D.; Sykes, B. D. [18] Methods to Study Membrane Protein Structure in Solution. In *Methods in Enzymology; Nuclear Magnetic Resonance, Part C*; Academic Press, 1994; Vol. 239, pp 515–535. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)39020-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)39020-7).
- (213) Wimmer, R.; Uggerhøj, L. E. Determination of Structure and Micellar Interactions of Small Antimicrobial Peptides by Solution-State NMR. In *Antimicrobial Peptides*; Hansen, P. R., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2017; Vol. 1548, pp 73–88. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_6.
- (214) Arora, A.; Tamm, L. K. Biophysical Approaches to Membrane Protein Structure Determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11* (5), 540–547. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00246-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00246-3).
- (215) Klöpfer, K.; Hagn, F. Beyond Detergent Micelles: The Advantages and Applications of Non-Micellar and Lipid-Based Membrane Mimetics for Solution-State NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2019**, *114–115*, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.08.001>.
- (216) Mäler, L. Solution NMR Studies of Peptide-Lipid Interactions in Model Membranes. *Mol. Membr. Biol.* **2012**, *29* (5), 155–176. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.683456>.
- (217) Andersson, A.; Mäler, L. NMR Solution Structure and Dynamics of Motilin in Isotropic Phospholipid Bicellar Solution. *J. Biomol. NMR* **2002**, *24* (2), 103–112. <https://doi.org/10.1023/A:1020902915969>.
- (218) Chou, J. J.; Kaufman, J. D.; Stahl, S. J.; Wingfield, P. T.; Bax, A. Micelle-Induced Curvature in a Water-Insoluble HIV-1 Env Peptide Revealed by NMR Dipolar Coupling Measurement in Stretched Polyacrylamide Gel. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (11), 2450–2451. <https://doi.org/10.1021/ja017875d>.
- (219) Sanders, C. R.; Prestegard, J. H. Magnetically Orientable Phospholipid Bilayers Containing Small Amounts of a Bile Salt Analogue, CHAPSO. *Biophys. J.* **1990**, *58* (2), 447–460. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82390-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82390-0).
- (220) Andersson, A.; Mäler, L. Magnetic Resonance Investigations of Lipid Motion in Isotropic Bicelles. *Langmuir* **2005**, *21* (17), 7702–7709. <https://doi.org/10.1021/la0513003>.
- (221) Björnerås, J.; Nilsson, M.; Mäler, L. Analysing DHPC/DMPC Bicelles by Diffusion NMR and Multivariate Decomposition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (11, Part A), 2910–2917. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.002>.
- (222) Sanders, C. R.; Schwonek, J. P. Characterization of Magnetically Orientable Bilayers in Mixtures of Dihexanoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylcholine by Solid-

- State NMR. *Biochemistry* **1992**, *31* (37), 8898–8905. <https://doi.org/10.1021/bi00152a029>.
- (223) Diller, A.; Loudet, C.; Aussenac, F.; Raffard, G.; Fournier, S.; Laguerre, M.; Grélard, A.; Opella, S. J.; Marassi, F. M.; Dufourc, E. J. Bicycles: A Natural ‘Molecular Goniometer’ for Structural, Dynamical and Topological Studies of Molecules in Membranes. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.003>.
- (224) Prosser, R. S.; Evanics, F.; Kitevski, J. L.; Al-Abdul-Wahid, M. S. Current Applications of Bicycles in NMR Studies of Membrane-Associated Amphiphiles and Proteins. *Biochemistry* **2006**, *45* (28), 8453–8465. <https://doi.org/10.1021/bi060615u>.
- (225) Isabettoni, S.; Baumgartner, M. E.; Fischer, P.; Windhab, E. J.; Liebi, M.; Kuster, S. Fabrication Procedures and Birefringence Measurements for Designing Magnetically Responsive Lanthanide Ion Chelating Phospholipid Assemblies. *J. Vis. Exp.* **2018**, No. 131, 56812. <https://doi.org/10.3791/56812>.
- (226) Matsumori, N.; Murata, M. 3D Structures of Membrane-Associated Small Molecules as Determined in Isotropic Bicycles. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (10), 1480. <https://doi.org/10.1039/c0np00002g>.
- (227) Glover, K. J.; Whiles, J. A.; Wu, G.; Yu, N.; Deems, R.; Struppe, J. O.; Stark, R. E.; Komives, E. A.; Vold, R. R. Structural Evaluation of Phospholipid Bicycles for Solution-State Studies of Membrane-Associated Biomolecules. *Biophys. J.* **2001**, *81* (4), 2163–2171. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75864-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75864-X).
- (228) Struppe, J.; Whiles, J. A.; Vold, R. R. Acidic Phospholipid Bicycles: A Versatile Model Membrane System. *Biophys. J.* **2000**, *78* (1), 281–289.
- (229) Losonczi, J. A.; Prestegard, J. H. Improved Dilute Bicycle Solutions for High-Resolution NMR of Biological Macromolecules. *J. Biomol. NMR* **1998**, *12* (3), 447–451. <https://doi.org/10.1023/A:1008302110884>.
- (230) Prosser, R. S.; Hwang, J. S.; Vold, R. R. Magnetically Aligned Phospholipid Bilayers with Positive Ordering: A New Model Membrane System. *Biophys. J.* **1998**, *74* (5), 2405–2418. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77949-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77949-4).
- (231) Loudet, C.; Diller, A.; Grélard, A.; Oda, R.; Dufourc, E. J. Biphenyl Phosphatidylcholine: A Promoter of Liposome Deformation and Bicycle Collective Orientation by Magnetic Fields. *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49* (3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.02.002>.
- (232) Whiles, J. A.; Brasseur, R.; Glover, K. J.; Melacini, G.; Komives, E. A.; Vold, R. R. Orientation and Effects of Mastoparan X on Phospholipid Bicycles. *Biophys. J.* **2001**, *80* (1), 280–293. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76013-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76013-4).
- (233) Triba, M. N.; Zoonens, M.; Popot, J.-L.; Devaux, P. F.; Warschawski, D. E. Reconstitution and Alignment by a Magnetic Field of a β -Barrel Membrane Protein in Bicycles. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35* (3), 268–275. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0014-x>.
- (234) Düzgüneş, N.; Gregoriadis, G. Introduction: The Origins of Liposomes: Alec Bangham at Babraham. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2005; Vol. 391, pp 1–3. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91029-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91029-X).
- (235) Basile, A.; Charcosset, C. *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes: Membrane Processes in the Pharmaceutical and Biotechnological Field*; Elsevier, 2018.
- (236) Chauhan, B. P. S. *Hybrid Nanomaterials: Synthesis, Characterization, and Applications*; John Wiley & Sons, 2011.
- (237) Liang, B.; Tamm, L. K. Solution NMR of SNAREs, Complexin and α -Synuclein in Association with Membrane-Mimetics. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2018**, *105*, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2018.02.001>.
- (238) Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. 14.

- (239) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- (240) Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 147–168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>.
- (241) Zhang, L.; Liu, L.; Maltsev, S.; Lorigan, G. A.; Dabney-Smith, C. Solid-State NMR Investigations of Peptide–Lipid Interactions of the Transmembrane Domain of a Plant-Derived Protein, Hcf106. *Chem. Phys. Lipids* **2013**, *175–176*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.09.002>.
- (242) Watts, A. Solid-State NMR in Drug Design and Discovery for Membrane-Embedded Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (7), 555–568. <https://doi.org/10.1038/nrd1773>.
- (243) Kimura, T.; Okamura, E.; Matubayasi, N.; Asami, K.; Nakahara, M. NMR Study on the Binding of Neuropeptide Achatin-I to Phospholipid Bilayer: The Equilibrium, Location, and Peptide Conformation. *Biophys. J.* **2004**, *87* (1), 375–385. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038950>.
- (244) Da Costa, G.; Mouret, L.; Chevance, S.; Le Rumeur, E.; Bondon, A. NMR of Molecules Interacting with Lipids in Small Unilamellar Vesicles. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36* (8), 933–942. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0186-7>.
- (245) Da Costa, G.; Chevance, S.; Le Rumeur, E.; Bondon, A. Proton NMR Detection of Porphyrins and Cytochrome c in Small Unilamellar Vesicles: Role of the Dissociation Kinetic Constant. *Biophys. J.* **2006**, *90* (8), L55–L57. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.081521>.
- (246) Pandey, H.; Rani, R.; Agarwal, V.; Sam Higginbottom Institute of Agriculture Technology & Sciences, India; Motilal Nehru National Institute of Technology, India. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2016**, *59* (0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>.
- (247) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E. Localization of Tyrosine at the Binding Site of Neurophysin II by Negative Nuclear Overhauser Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (11), 4017–4018. <https://doi.org/10.1021/ja00766a064>.
- (248) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Dadok, J. Negative Nuclear Overhauser Effects as Probes of Macromolecular Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (11), 4015–4017. <https://doi.org/10.1021/ja00766a063>.
- (249) Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Carlson, G.; Meyer, E. F. Stereochemistry of Binding of the Tetrapeptide Acetyl-Pro-Ala-Pro-Tyr-NH₂ to Porcine Pancreatic Elastase: Combined Use of Two-Dimensional Transferred Nuclear Overhauser Enhancement Measurements, Restrained Molecular Dynamics, X-Ray Crystallography and Molecular Modelling. *J. Mol. Biol.* **1986**, *190* (2), 259–267. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90297-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90297-4).
- (250) Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Theory and Applications of the Transferred Nuclear Overhauser Effect to the Study of the Conformations of Small Ligands Bound to Proteins. *J. Magn. Reson. 1969* **1982**, *48* (3), 402–417. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90073-7).
- (251) Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Theory of the Time Dependent Transferred Nuclear Overhauser Effect: Applications to Structural Analysis of Ligand-Protein Complexes in Solution. *J. Magn. Reson. 1969* **1983**, *53* (3), 423–442. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(83\)90215-9](https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90215-9).
- (252) Otter, A.; Kotovych, G. The Solution Conformation of the Synthetic Tubulin Fragment Ac-Tubulin- α (430–441)-Amide Based on Two-Dimensional ROESY Experiments. *Can. J. Chem.* **1988**, *66* (8), 1814–1820. <https://doi.org/10.1139/v88-293>.
- (253) Moseley, H. N. B.; Curto, E. V.; Krishna, N. R. Complete Relaxation and Conformational Exchange Matrix (CORCEMA) Analysis of NOESY Spectra of Interacting

- Systems; Two-Dimensional Transferred NOESY. *J. Magn. Reson. B* **1995**, *108* (3), 243–261. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1995.1129>.
- (254) Post, C. B. Exchange-Transferred NOE Spectroscopy and Bound Ligand Structure Determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13* (5), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.012>.
- (255) Gizachew, D.; Dratz, E. Transferred NOESY NMR Studies of Biotin Mimetic Peptide (FSHPQNT) Bound to Streptavidin: A Structural Model for Studies of Peptide–Protein Interactions. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78* (1), 14–24. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01096.x>.
- (256) L. Wagstaff, J.; L. Taylor, S.; J. Howard, M. Recent Developments and Applications of Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance (STD NMR) Spectroscopy. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9* (4), 571–577. <https://doi.org/10.1039/C2MB25395J>.
- (257) Venkitakrishnan, R. P.; Benard, O.; Max, M.; Markley, J. L.; Assadi-Porter, F. M. Use of NMR Saturation Transfer Difference Spectroscopy to Study Ligand Binding to Membrane Proteins. In *Membrane Protein Structure and Dynamics*; Vaidehi, N., Klein-Seetharaman, J., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp 47–63. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-023-6_4.
- (258) Cabezas, Y. Vers Le Développement d’outils Diagnostiques et Thérapeutiques Contre La Leishmaniose. Approches Régiosélectives et Chimio-Enzymatiques Pour La Synthèse d’oligosaccharides Leishmaniens. These de doctorat, École nationale supérieure de chimie (Rennes), 2015.
- (259) Raingeval, C.; Cala, O.; Brion, B.; Borgne, M. L.; Hubbard, R. E.; Krimm, I. 1D NMR WaterLOGSY as an Efficient Method for Fragment-Based Lead Discovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34* (1), 1218–1225. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1636235>.
- (260) Dalvit, C.; Fogliatto, G.; Stewart, A.; Veronesi, M.; Stockman, B. WaterLOGSY as a Method for Primary NMR Screening: Practical Aspects and Range of Applicability. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (4), 349–359. <https://doi.org/10.1023/A:1013302231549>.
- (261) Huang, R.; Bonnichon, A.; Claridge, T. D. W.; Leung, I. K. H. Protein-Ligand Binding Affinity Determination by the WaterLOGSY Method: An Optimised Approach Considering Ligand Rebinding. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 43727. <https://doi.org/10.1038/srep43727>.
- (262) Boyd, C. E.; Tucker, C. S. *Pond Aquaculture Water Quality Management*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (263) *La situation mondiale des pêches et de l’aquaculture 2020*; FAO, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229fr>.
- (264) Kibenge, F. S. Emerging Viruses in Aquaculture. *Curr. Opin. Virol.* **2019**, *34*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.008>.
- (265) Banerjee, G.; Ray, A. K. The Advancement of Probiotics Research and Its Application in Fish Farming Industries. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *115*, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>.
- (266) Rodrigues, S.; Paillard, C.; Le Pennec, G.; Dufour, A.; Bazire, A. *Vibrio* Tapetis, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01384>.
- (267) Turner, J. W.; Good, B.; Cole, D.; Lipp, E. K. Plankton Composition and Environmental Factors Contribute to *Vibrio* Seasonality. *ISME J.* **2009**, *3* (9), 1082–1092. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.50>.
- (268) Thompson, F. L.; Iida, T.; Swings, J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68* (3), 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>.
- (269) Baker-Austin, C.; Oliver, J. D.; Alam, M.; Ali, A.; Waldor, M. K.; Qadri, F.; Martinez-Urtaza, J. *Vibrio* Spp. Infections. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2018**, *4* (1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>.

- (270) Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*; Springer Science & Business Media, 2006.
- (271) Igbinsosa, E. O.; Obi, L. C.; Okoh, A. I. Occurrence of Potentially Pathogenic Vibrios in Final Effluents of a Wastewater Treatment Facility in a Rural Community of the Eastern Cape Province of South Africa. *Res. Microbiol.* **2009**, *160* (8), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.007>.
- (272) ISHIMARU, K.; AKAGAWA-MATSUSHITA, M.; MUROGA, K. *Vibrio Ichthyenteri* Sp. Nov., a Pathogen of Japanese Flounder (*Paralichthys Olivaceus*) Larvae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1996**, *46* (1), 155–159. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-155>.
- (273) Broberg, C. A.; Calder, T. J.; Orth, K. *Vibrio Parahaemolyticus* Cell Biology and Pathogenicity Determinants. *Microbes Infect.* **2011**, *13* (12), 992–1001. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.013>.
- (274) Yildiz, F. H.; Visick, K. L. *Vibrio* Biofilms: So Much the Same yet so Different. *Trends Microbiol.* **2009**, *17* (3), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>.
- (275) Kokashvili, T.; Whitehouse, C. A.; Tskhvediani, A.; Grim, C. J.; Elbakidze, T.; Mitaishvili, N.; Janelidze, N.; Jaiani, E.; Haley, B. J.; Lashkhi, N.; Huq, A.; Colwell, R. R.; Tediashvili, M. Occurrence and Diversity of Clinically Important *Vibrio* Species in the Aquatic Environment of Georgia. *Front. Public Health* **2015**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00232>.
- (276) Janda, J. M.; Newton, A. E.; Bopp, C. A. *Vibriosis*. *Clin. Lab. Med.* **2015**, *35* (2), 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.007>.
- (277) Abdelaziz, M.; Ibrahim, M. D.; Ibrahim, M. A.; Abu-Elala, N. M.; Abdel-moneam, D. A. Monitoring of Different *Vibrio* Species Affecting Marine Fishes in Lake Qarun and Gulf of Suez: Phenotypic and Molecular Characterization. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2017**, *43* (2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.06.002>.
- (278) Egidius, E. *Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review*. *Aquaculture* **1987**, *67* (1), 15–28. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90004-4).
- (279) Bachère, E. Anti-Infectious Immune Effectors in Marine Invertebrates: Potential Tools for Disease Control in Larviculture. *Aquaculture* **2003**, *227* (1), 427–438. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00521-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00521-0).
- (280) Destoumieux-Garzón, D.; Rosa, R. D.; Schmitt, P.; Barreto, C.; Vidal-Dupiol, J.; Mitta, G.; Gueguen, Y.; Bachère, E. Antimicrobial Peptides in Marine Invertebrate Health and Disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371* (1695). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0300>.
- (281) Lavilla-Pitogo, C. R.; Leño, E. M.; Paner, M. G. Mortalities of Pond-Cultured Juvenile Shrimp, *Penaeus Monodon*, Associated with Dominance of Luminescent Vibrios in the Rearing Environment. *Aquaculture* **1998**, *164* (1), 337–349. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00198-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00198-7).
- (282) Leño, E. M.; Lavilla-Pitogo, C. R.; Paner, M. G. Bacterial Flora in the Hepatopancreas of Pond-Reared *Penaeus Monodon* Juveniles with Luminous *Vibriosis*. *Aquaculture* **1998**, *164* (1), 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00201-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00201-4).
- (283) Busico-Salcedo, N.; Owens, L. Virulence Changes to *Harveyi* Clade Bacteria Infected with Bacteriophage from *Vibrio Owensii*. *Indian J. Virol.* **2013**, *24* (2), 180–187. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0136-1>.
- (284) Mo, W. Y.; Chen, Z.; Leung, H. M.; Leung, A. O. W. Application of Veterinary Antibiotics in China's Aquaculture Industry and Their Potential Human Health Risks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24* (10), 8978–8989. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5607-z>.
- (285) Tang, H.-J.; Chang, M.-C.; Ko, W.-C.; Huang, K.-Y.; Lee, C.-L.; Chuang, Y.-C. In Vitro and In Vivo Activities of Newer Fluoroquinolones against *Vibrio Vulnificus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (11), 3580–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3580->

3584.2002.

- (286) Han, F.; Walker, R. D.; Janes, M. E.; Prinyawiwatkul, W.; Ge, B. Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio Vulnificus* Isolates from Louisiana Gulf and Retail Raw Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (21), 7096–7098. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-07>.
- (287) MY AlOthubi, S. Antibiotic Resistance of *Vibrio Parahaemolyticus* Isolated from Cockles and Shrimp Sea Food Marketed in Selangor, Malaysia. *Clin. Microbiol. Open Access* **2014**, *03* (03). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000148>.
- (288) Letchumanan, V.; Chan, K.-G.; Pusparajah, P.; Saokaew, S.; Duangjai, A.; Goh, B.-H.; Ab Mutalib, N.-S.; Lee, L.-H. Insights into Bacteriophage Application in Controlling *Vibrio* Species. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01114>.
- (289) Rico, A.; Satapornvanit, K.; Haque, M. M.; Min, J.; Nguyen, P. T.; Telfer, T. C.; Brink, P. J. van den. Use of Chemicals and Biological Products in Asian Aquaculture and Their Potential Environmental Risks: A Critical Review. *Rev. Aquac.* **2012**, *4* (2), 75–93. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>.
- (290) Yano, Y.; Hamano, K.; Satomi, M.; Tsutsui, I.; Ban, M.; Aue-umneoy, D. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio* Species Related to Food Safety Isolated from Shrimp Cultured at Inland Ponds in Thailand. *Food Control* **2014**, *38*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.019>.
- (291) Labella, A.; Gennari, M.; Ghidini, V.; Trento, I.; Manfrin, A.; Borrego, J. J.; Lleo, M. M. High Incidence of Antibiotic Multi-Resistant Bacteria in Coastal Areas Dedicated to Fish Farming. *Mar. Pollut. Bull.* **2013**, *70* (1), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.037>.
- (292) Gravningen, K.; Sorum, H.; Horsberg, T. E. The Future of Therapeutic Agents in Aquaculture: -EN- -FR- L’avenir Des Agents Thérapeutiques En Aquaculture -ES- El Futuro de Los Agentes Terapéuticos En La Acuicultura. *Rev. Sci. Tech. OIE* **2019**, *38* (2), 641–651. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.3010>.
- (293) Santos, L.; Ramos, F. Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Current Knowledge and Alternatives to Tackle the Problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52* (2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>.
- (294) Chuah, L.-O.; Effarizah, M. E.; Goni, A. M.; Rusul, G. Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global Catfish Aquaculture. *Curr. Environ. Health Rep.* **2016**, *3* (2), 118–127. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0091-2>.
- (295) Immanuel, G.; Vincybai, V. C.; Sivaram, V.; Palavesam, A.; Marian, M. P. Effect of Butanolic Extracts from Terrestrial Herbs and Seaweeds on the Survival, Growth and Pathogen (*Vibrio Parahaemolyticus*) Load on Shrimp *Penaeus Indicus* Juveniles. *Aquaculture* **2004**, *236* (1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.033>.
- (296) Cavallo, R.; Acquaviva, M.; Stabili, L.; Cecere, E.; Petrocelli, A.; Narracci, M. Antibacterial Activity of Marine Macroalgae against Fish Pathogenic *Vibrio* Species. *Open Life Sci.* **2013**, *8* (7), 646–653. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0181-6>.
- (297) Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Walsh, T. R. Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Food Animal Production. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *17* (6), 431–437. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00297-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00297-7).
- (298) Witte, W. Selective Pressure by Antibiotic Use in Livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00301-0).
- (299) Son, R.; Rusul, G.; Sahilah, A. M.; Zainuri, A.; Raha, A. R.; Salmah, I. Antibiotic Resistance and Plasmid Profile of *Aeromonas Hydrophila* Isolates from Cultured Fish, *Telapia* (*Telapia Mossambica*). *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *24* (6), 479–482. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00156.x>.
- (300) Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M. J.; Gibson, L. Probiotics in

- Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes. *Aquaculture* **2008**, 274 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>.
- (301) Lilly, D. M.; Stillwell, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* **1965**, 147 (3659), 747–748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>.
- (302) Fuller, R. History and Development of Probiotics. In *Probiotics: The scientific basis*; Fuller, R., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1992; pp 1–8. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_1.
- (303) Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y.; Lee, Y. K. Probiotics: How Should They Be Defined? *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, 10 (3), 107–110. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8).
- (304) Ouwehand, A. C.; Salminen, S. J. The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-Viable Bacteria. *Int. Dairy J.* **1998**, 8 (9), 749–758. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00114-9).
- (305) FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. **2001**, 34.
- (306) *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Eds.; FAO food and nutrition paper; Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization: Rome, 2006.
- (307) Verschuer, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64 (4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>.
- (308) Merrifield, D. L.; Dimitroglou, A.; Foey, A.; Davies, S. J.; Baker, R. T. M.; Børgwald, J.; Castex, M.; Ringø, E. The Current Status and Future Focus of Probiotic and Prebiotic Applications for Salmonids. *Aquaculture* **2010**, 302 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>.
- (309) Wang, A.; Ran, C.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Ding, Q.; Yang, Y.; Olsen, R. E.; Ringø, E.; Bindelle, J.; Zhou, Z. Use of Probiotics in Aquaculture of China—a Review of the Past Decade. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, 86, 734–755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.026>.
- (310) Kuebutornye, F. K. A.; Abarike, E. D.; Lu, Y. A Review on the Application of Bacillus as Probiotics in Aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, 87, 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>.
- (311) Zorriehzahra, M. J.; Delshad, S. T.; Adel, M.; Tiwari, R.; Karthik, K.; Dhama, K.; Lazado, C. C. Probiotics as Beneficial Microbes in Aquaculture: An Update on Their Multiple Modes of Action: A Review. *Vet. Q.* **2016**, 36 (4), 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>.
- (312) Offret, C.; Desriac, F.; Le Chevalier, P.; Mounier, J.; Jégou, C.; Fleury, Y. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar. Drugs* **2016**, 14 (7). <https://doi.org/10.3390/md14070129>.
- (313) Holmström, C.; Kjelleberg, S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, 30 (4), 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x>.
- (314) Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley&Sons.; New York, 1986.
- (315) Desriac, F.; Fleury, Y.; Le Chevalier, P.; Destoumieux, D.; Simon, M. Use of a Bacterium Isolated from the Genus *Pseudoalteromonas*, Cyclolipopeptides and Uses Thereof. **2014**, *Brevet WO2014187993*.
- (316) Hirota-Takahata, Y.; Kozuma, S.; Kuraya, N.; Fukuda, D.; Nakajima, M.; Takatsu, T.; Ando, O. Ogipeptins, Novel Inhibitors of LPS: Physicochemical Properties and Structural Elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2017**, 70 (1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.61>.

- (317) Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzon, D.; Romestand, B.; Fievet, J.; Pugnieri, M.; Roquet, F.; Escoubas, J.-M.; Vandenbulcke, F.; Levy, O.; Saune, L.; Bulet, P.; Bachere, E. Evidence of a Bactericidal Permeability Increasing Protein in an Invertebrate, the *Crassostrea Gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (45), 17759–17764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702281104>.
- (318) Ghosh, A.; Bera, S.; Shai, Y.; Mangoni, M. L.; Bhunia, A. NMR Structure and Binding of Esculentin-1a (1–21)NH₂ and Its Diastereomer to Lipopolysaccharide: Correlation with Biological Functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2016**, *1858* (4), 800–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.027>.
- (319) Mares, J.; Kumaran, S.; Gobbo, M.; Zerbe, O. Interactions of Lipopolysaccharide and Polymyxin Studied by NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (17), 11498–11506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806587200>.
- (320) Bhattacharjya, S.; David, S. A.; Mathan, V. I.; Balaram, P. Polymyxin B Nonapeptide: Conformations in Water and in the Lipopolysaccharide-Bound State Determined by Two-Dimensional NMR and Molecular Dynamics. *Biopolymers* **1997**, *41* (3), 251–265. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199703\)41:3<251::AID-BIP2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199703)41:3<251::AID-BIP2>3.0.CO;2-R).
- (321) Pristovšek, P.; Kidrič, J. Solution Structure of Polymyxins B and E and Effect of Binding to Lipopolysaccharide: An NMR and Molecular Modeling Study. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (22), 4604–4613. <https://doi.org/10.1021/jm991031b>.
- (322) D. Swarbrick, J.; A. Karas, J.; Li, J.; Velkov, T. Structure of Micelle Bound Cationic Peptides by NMR Spectroscopy Using a Lanthanide Shift Reagent. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (19), 2897–2900. <https://doi.org/10.1039/C9CC09207B>.
- (323) Yang, H.; Huang, Y.; He, J.; Li, S.; Tang, B.; Li, H. Interaction of Lafutidine in Binding to Human Serum Albumin in Gastric Ulcer Therapy: STD-NMR, WaterLOGSY-NMR, NMR Relaxation Times, Tr-NOESY, Molecule Docking, and Spectroscopic Studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *606*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.07.016>.
- (324) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- (325) Hirota-Takahata, Y.; Kozuma, S.; Kuraya, N.; Fukuda, D.; Nakajima, M.; Ando, O. Pedopeptins, Novel Inhibitors of LPS: Taxonomy of Producing Organism, Fermentation, Isolation, Physicochemical Properties and Structural Elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2014**, *67* (3), 243–251. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.122>.
- (326) Afonso, A.; Hon, F.; Brambilla, R. Structure Elucidation of Sch 20562, a Glucosidic Cyclic Dehydropeptide Lactone - the Major Component of W-10 Antifungal Antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1999**, *52* (4), 383–397. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.383>.
- (327) Sano, T.; Kaya, K. Two New (E)-2-Amino-2-Butenoic Acid (Dhb)-Containing Microcystins Isolated from *Oscillatoria Agardhii*. *Tetrahedron* **1998**, *54* (3), 463–470. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10291-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10291-5).
- (328) Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: A Program for Display and Analysis of Macromolecular Structures. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00009-4](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00009-4).
- (329) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7* (1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6).
- (330) Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure—Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 1898–1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>.
- (331) Brandenburg, K.; Heinbockel, L.; Correa, W.; Lohner, K. Peptides with Dual Mode of Action: Killing Bacteria and Preventing Endotoxin-Induced Sepsis. *Biochim. Biophys. Acta*

- BBA - Biomembr.* **2016**, 1858 (5), 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>.
- (332) Giannis, A.; Kolter, T. Peptidomimetics for Receptor Ligands—Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32 (9), 1244–1267. <https://doi.org/10.1002/anie.199312441>.
- (333) Hassan, M.; Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Lotfipour, F. Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 113 (4), 723–736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>.
- (334) Solecki, O.; Mosbah, A.; Baudy Floc’h, M.; Felden, B. Converting a Staphylococcus Aureus Toxin into Effective Cyclic Pseudopeptide Antibiotics. *Chem. Biol.* **2015**, 22 (3), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.016>.
- (335) Bordes, P.; Genevaux, P. Addiction Des Systèmes Toxine-Antitoxine Envers Un Chaperon Chez *Mycobacterium Tuberculosis*. *médecine/sciences* **2017**, 33 (5), 486–488. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305009>.
- (336) Hall, A. M.; Gollan, B.; Helaine, S. Toxin-Antitoxin Systems: Reversible Toxicity. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, 36, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.003>.
- (337) Slayden, R. A.; Dawson, C. C.; Cummings, J. E. Toxin–antitoxin systems and regulatory mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog. Dis.* **2018**, 76 (4). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty039>.
- (338) Costerton, J. W.; Irvin, R. T.; Cheng, K. J. The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **1981**, 35 (1), 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.001503>.
- (339) Legardinier, S.; Hubert, J.-F.; Bihan, O. L.; Tascon, C.; Rocher, C.; Raguénès-Nicol, C.; Bondon, A.; Hardy, S.; Rumeur, E. L. Sub-Domains of the Dystrophin Rod Domain Display Contrasting Lipid-Binding and Stability Properties. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2008**, 1784 (4), 672–682. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.12.014>.
- (340) Mouret, L.; Da Costa, G.; Bondon, A. Sterols Associated with Small Unilamellar Vesicles (SUVs): Intrinsic Mobility Role for 1H NMR Detection. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, 52 (7), 339–344. <https://doi.org/10.1002/mrc.4069>.
- (341) Costa, G. D.; Bondon, A.; Delalande, O.; Mouret, L.; Monti, J.-P. Elucidation by NMR Solution of Neurotensin in Small Unilamellar Vesicle Environment: Molecular Surveys for Neurotensin Receptor Recognition. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2013**, 31 (8), 809–817. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.712459>.
- (342) Roberts, L. S.; Schmidt, G. D.; Janovy, J. *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts’ Foundations of Parasitology*, 8th ed.; McGraw-Hill Higher Education: Boston, 2009.
- (343) World Health Organization <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- (344) Costa, D. N. C. C.; Bermudi, P. M. M.; Rodas, L. A. C.; Nunes, C. M.; Hiramoto, R. M.; Tolezano, J. E.; Cipriano, R. S.; Cardoso, G. C. D.; Codeço, C. T.; Chiaravalloti, F. Human Visceral Leishmaniasis and Relationship with Vector and Canine Control Measures. *Rev. Saúde Pública* **2018**, 52. <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000381>.
- (345) World Health Organization <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/>.
- (346) Alexander, J.; Russell, D. G. The Interaction of Leishmania Species with Macrophages. In *Advances in Parasitology*; Elsevier, 1992; Vol. 31, pp 175–254. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60022-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60022-6).
- (347) Centers for Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
- (348) Gossage, S. M.; Rogers, M. E.; Bates, P. A. Two Separate Growth Phases during the Development of Leishmania in Sand Flies: Implications for Understanding the Life Cycle. *Int. J. Parasitol.* **2003**, 33 (10), 1027–1034. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00142-5).

- (349) Sacks, D.; Kamhawi, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55* (1), 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.453>.
- (350) Sacks, D. L. Leishmania-Sand Fly Interactions Controlling Species-Specific Vector Competence. Microreview. *Cell. Microbiol.* **2001**, *3* (4), 189–196. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x>.
- (351) Carré, N.; Collot, M.; Guillard, P.; Horellou, M.; Gangneux, J.-P. La Leishmaniose Viscérale. *J. Pharm. Clin.* **2010**, *29* (3), 121–148. <https://doi.org/10.1684/jpc.2010.0148>.
- (352) Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet* **2005**, *366* (9496), 1561–1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5).
- (353) Mitropoulos, P.; Konidas, P.; Durkin-Konidas, M. New World Cutaneous Leishmaniasis: Updated Review of Current and Future Diagnosis and Treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**, *63* (2), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.088>.
- (354) Seifert, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 31–39. <https://doi.org/10.2174/1874104501105010031>.
- (355) Louzir, H.; Aoun, K.; Späth, G. F.; Laouini, D.; Prina, E.; Victoir, K.; Bouratbine, A. [Leishmania epidemiology, diagnosis, chemotherapy and vaccination approaches in the international network of Pasteur Institutes]. *Med. Sci. MS* **2013**, *29* (12), 1151–1160. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912020>.
- (356) Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Mol. Basel Switz.* **2009**, *14* (7), 2317–2336. <https://doi.org/10.3390/molecules14072317>.
- (357) Frézard, F.; Martins, P. S.; Barbosa, M. C. M.; Pimenta, A. M. C.; Ferreira, W. A.; de Melo, J. E.; Mangrum, J. B.; Demicheli, C. New Insights into the Chemical Structure and Composition of the Pentavalent Antimonial Drugs, Meglumine Antimonate and Sodium Stibogluconate. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (4), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.10.010>.
- (358) Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania Donovanii*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (6), 3971–3976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005423200>.
- (359) Ephros, M.; Bitnun, A.; Shaked, P.; Waldman, E.; Zilberstein, D. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania Donovanii* Axenic Amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (2), 278–282. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.2.278>.
- (360) Oliveira, L. F.; Schubach, A. O.; Martins, M. M.; Passos, S. L.; Oliveira, R. V.; Marzochi, M. C.; Andrade, C. A. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. *Acta Trop.* **2011**, *118* (2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.
- (361) Mlika, R. B.; Hamida, M. B.; Hammami, H.; Jannet, S. B.; Badri, T.; Fenniche, S.; Mokhtar, I. Should We Continue to Indicate Meglumine Antimoniate as First-Line Treatment for Cutaneous Leishmaniasis in Tunisia. *Dermatol. Ther.* **2012**, *25* (6), 615–618. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01522.x>.
- (362) Blum, J.; Lockwood, D. N. J.; Visser, L.; Harms, G.; Bailey, M. S.; Caumes, E.; Clerinx, J.; van Thiel, P. P. A. M.; Morizot, G.; Hatz, C.; Buffet, P. Local or Systemic Treatment for New World Cutaneous Leishmaniasis? Re-Evaluating the Evidence for the Risk of Mucosal Leishmaniasis. *Int. Health* **2012**, *4* (3), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.inhe.2012.06.004>.
- (363) Leprohon, P.; Fernandez-Prada, C.; Gazanion, É.; Monte-Neto, R.; Ouellette, M. Drug Resistance Analysis by next Generation Sequencing in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *5* (1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005>.
- (364) Lira, R.; Sundar, S.; Makharia, A.; Kenney, R.; Gam, A.; Saraiva, E.; Sacks, D.

- Evidence That the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania Donovanii*. *J. Infect. Dis.* **1999**, *180* (2), 564–567. <https://doi.org/10.1086/314896>.
- (365) Dutcher, J. D.; William, G.; Pagano, J. F.; John, V. Amphotericin b, Its Production, and Its Salts. US2908611A, October 13, 1959.
- (366) Kumar Saha, A.; Mukherjee, T.; Bhaduri, A. Mechanism of Action of Amphotericin B on *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1986**, *19* (3), 195–200. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90001-0).
- (367) Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68* (2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.
- (368) Chattopadhyay, A.; Jafurulla, Md. A Novel Mechanism for an Old Drug: Amphotericin B in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *416* (1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.023>.
- (369) Wang, J.; Ma, Y.; Hou, S.; Miao, Z.; Ma, Q. Interaction of Amphotericin B and Saturated or Unsaturated Phospholipid Monolayers Containing Cholesterol or Ergosterol at the Air-Water Interface. *Biophys. Chem.* **2020**, *258*, 106317. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106317>.
- (370) Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.-C.; Barrett, M. P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A. W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulou, B. Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.
- (371) Alkhawajah Abdulaziz. Recent Trends in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Ann. Saudi Med.* **1998**, *18* (5), 412–416. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.1998.412>.
- (372) Hentzer, B.; Kobayasi, T. The Ultrastructural Changes of *Leishmania Tropica* after Treatment with Pentamidine. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1977**, *71* (2), 157–166. <https://doi.org/10.1080/00034983.1977.11687174>.
- (373) Amato, V. S.; Tuon, F. F.; Bacha, H. A.; Neto, V. A.; Nicodemo, A. C. Mucosal Leishmaniasis: Current Scenario and Prospects for Treatment. *Acta Trop.* **2008**, *105* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.003>.
- (374) Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356* (25), 2571–2581. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536>.
- (375) Sundar, S.; Agrawal, N.; Arora, R.; Agarwal, D.; Rai, M.; Chakravarty, J. Short-Course Paromomycin Treatment of Visceral Leishmaniasis in India: 14-Day vs 21-Day Treatment. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49* (6), 914–918. <https://doi.org/10.1086/605438>.
- (376) Chawla, B.; Jhingran, A.; Panigrahi, A.; Stuart, K. D.; Madhubala, R. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin –Susceptible –Resistant *Leishmania Donovanii*. *PLoS ONE* **2011**, *6* (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026660>.
- (377) Maarouf, M.; de Kouchkovsky, Y.; Brown, S.; Petit, P. X.; Robert-Gero, M. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity Of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* **1997**, *232* (2), 339–348. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3500>.
- (378) Sindermann, H.; Engel, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100* (Supplement_1), S17–S20. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.010>.
- (379) Rakotomanga, M.; Blanc, S.; Gaudin, K.; Chaminade, P.; Loiseau, P. M. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1425–1430. <https://doi.org/10.1128/AAC.01123-06>.
- (380) Lux, H.; Hart, D. T.; Parker, P. J.; Klenner, T. Ether Lipid Metabolism, GPI Anchor Biosynthesis, and Signal Transduction Are Putative Targets for Anti-Leishmanial Alkyl

- Phospholipid Analogues. In *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2*; Nigam, S., Kunkel, G., Prescott, S. M., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1996; Vol. 416, pp 201–211. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0179-8_33.
- (381) Luque-Ortega, J. R.; Rivas, L. Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) Inhibits Cytochrome c Oxidase in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1327–1332. <https://doi.org/10.1128/AAC.01415-06>.
- (382) Paris, C.; Loiseau, P. M.; Bories, C.; Bréard, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (3), 852–859. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.852-859.2004>.
- (383) Verma, N. K.; Dey, C. S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania Donovanii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (8), 3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>.
- (384) Wadhone, P.; Maiti, M.; Agarwal, R.; Kamat, V.; Martin, S.; Saha, B. Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *J. Immunol.* **2009**, *182* (11), 7146–7154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803859>.
- (385) Stage-Specific Binding of *Leishmania Donovanii* to the Sand Fly Vector Midgut Is Regulated by Conformational Changes in the Abundant Surface Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **1995**, *181* (2), 685–697.
- (386) Pimenta, P. F. P.; Saraiva, E. M. B.; Sacks, D. L. The Comparative Fine Structure and Surface Glycoconjugate Expression of Three Life Stages of *Leishmania Major*. *Exp. Parasitol.* **1991**, *72* (2), 191–204. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90137-L](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90137-L).
- (387) Cabezas, Y.; Legentil, L.; Robert-Gangneux, F.; Daligault, F.; Belaz, S.; Nugier-Chauvin, C.; Tranchimand, S.; Tellier, C.; Gangneux, J.-P.; Ferrières, V. *Leishmania* Cell Wall as a Potent Target for Antiparasitic Drugs. A Focus on the Glycoconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (31), 8393–8404. <https://doi.org/10.1039/C5OB00563A>.
- (388) Turco, S. J.; Descoteaux, A. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46* (1), 65–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.000433>.
- (389) Forestier, C.-L.; Gao, Q.; Boons, G.-J. *Leishmania* Lipophosphoglycan: How to Establish Structure-Activity Relationships for This Highly Complex and Multifunctional Glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 193. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>.
- (390) Descoteaux, A.; Turco, S. J. Functional Aspects of the *Leishmania Donovanii* Lipophosphoglycan during Macrophage Infection. *Microbes Infect.* **2002**, *4* (9), 975–981. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01624-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01624-6).
- (391) Descoteaux, A.; Turco, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* Infectivity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455* (2), 341–352. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(99\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00065-4).
- (392) Novozhilova, N. M.; Bovin, N. V. Structure, Functions, and Biosynthesis of Glycoconjugates of *Leishmania* Spp. Cell Surface. *Biochem. Mosc.* **2010**, *75* (6), 686–694. <https://doi.org/10.1134/S0006297910060027>.
- (393) Barron, T. L.; Turco, S. J. Quantitation of *Leishmania* Lipophosphoglycan Repeat Units by Capillary Electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2006**, *1760* (4), 710–714. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.10.007>.
- (394) Ilg, T. Lipophosphoglycan of the Protozoan Parasite *Leishmania*: Stage- and Species-Specific Importance for Colonization of the Sandfly Vector, Transmission and Virulence to Mammals. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **2001**, *190* (1–2), 13–17. <https://doi.org/10.1007/s004300100071>.
- (395) Franco, L. H.; Beverley, S. M.; Zamboni, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. *J. Parasitol. Res.* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/165126>.

- (396) Späth, G. F.; Garraway, L. A.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. The Role(s) of Lipophosphoglycan (LPG) in the Establishment of Leishmania Major Infections in Mammalian Hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (16), 9536–9541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530604100>.
- (397) Moradin, N.; Descoteaux, A. Leishmania Promastigotes: Building a Safe Niche within Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121>.
- (398) McConville, M. J.; Collidge, T. A.; Ferguson, M. A.; Schneider, P. The Glycoinositol Phospholipids of Leishmania Mexicana Promastigotes. Evidence for the Presence of Three Distinct Pathways of Glycolipid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (21), 15595–15604.
- (399) Assis, R. R.; Ibraim, I. C.; Noronha, F. S.; Turco, S. J.; Soares, R. P. Glycoinositolphospholipids from Leishmania Braziliensis and L. Infantum: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (2), e1543. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001543>.
- (400) Paranaíba, L. F.; de Assis, R. R.; Nogueira, P. M.; Torrecilhas, A. C.; Campos, J. H.; Silveira, A. C. de O.; Martins-Filho, O. A.; Pessoa, N. L.; Campos, M. A.; Parreiras, P. M.; Melo, M. N.; Gontijo, N. de F.; Soares, R. P. P. Leishmania Enriettii: Biochemical Characterisation of Lipophosphoglycans (LPGs) and Glycoinositolphospholipids (GIPLs) and Infectivity to Cavia Porcellus. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0633-8>.
- (401) Zawadzki, J.; Scholz, C.; Currie, G.; Coombs, G. H.; McConville, M. J. The Glycoinositolphospholipids from Leishmania Panamensis Contain Unusual Glycan and Lipid Moieties. Edited by I. B. Holland. *J. Mol. Biol.* **1998**, *282* (2), 287–299. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2014>.
- (402) Chawla, M.; Vishwakarma, R. A. Alkylacylglycerolipid Domain of GPI Molecules of Leishmania Is Responsible for Inhibition of PKC-Mediated c-Fos Expression. *J. Lipid Res.* **2003**, *44* (3), 594–600. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200296-JLR200>.
- (403) Yao, C.; Donelson, J. E.; Wilson, M. E. The Major Surface Protease (MSP or GP63) of Leishmania Sp. Biosynthesis, Regulation of Expression, and Function. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *132* (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00211-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00211-1).
- (404) Bouvier, J.; Schneider, P.; Etges, R.; Bordier, C. Peptide Substrate Specificity of the Membrane-Bound Metalloprotease of Leishmania. *Biochemistry* **1990**, *29* (43), 10113–10119. <https://doi.org/10.1021/bi00495a015>.
- (405) Hallé, M.; Gomez, M. A.; Stuble, M.; Shimizu, H.; McMaster, W. R.; Olivier, M.; Tremblay, M. L. The Leishmania Surface Protease GP63 Cleaves Multiple Intracellular Proteins and Actively Participates in P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (11), 6893–6908. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805861200>.
- (406) Kulkarni, M. M.; Jones, E. A.; McMaster, W. R.; McGwire, B. S. Fibronectin Binding and Proteolytic Degradation by Leishmania and Effects on Macrophage Activation. *Infect. Immun.* **2008**, *76* (4), 1738–1747. <https://doi.org/10.1128/IAI.01274-07>.
- (407) Isnard, A.; Shio, M. T.; Olivier, M. Impact of Leishmania Metalloprotease GP63 on Macrophage Signaling. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 72. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>.
- (408) Ilg, T. Proteophosphoglycans of Leishmania. *Parasitol. Today* **2000**, *16* (11), 489–497. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01791-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01791-9).
- (409) Piani, A.; Ilg, T.; Elefanty, A. G.; Curtis, J.; Handman, E. Leishmania Major Proteophosphoglycan Is Expressed by Amastigotes and Has an Immunomodulatory Effect on Macrophage Function. *Microbes Infect.* **1999**, *1* (8), 589–599. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80058-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80058-6).
- (410) Rogers, M. E.; Ilg, T.; Nikolaev, A. V.; Ferguson, M. A. J.; Bates, P. A. Transmission

- of Cutaneous Leishmaniasis by Sand Flies Is Enhanced by Regurgitation of FPPG. *Nature* **2004**, *430* (6998), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature02675>.
- (411) Rogers, M. E. The Role of Leishmania Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223>.
- (412) Olivier, M.; Atayde, V. D.; Isnard, A.; Hassani, K.; Shio, M. T. Leishmania Virulence Factors: Focus on the Metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* **2012**, *14* (15), 1377–1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>.
- (413) Barbiéri, C. L.; Doine, A. I.; Freymuller, E. Lysosomal Depletion in Macrophages from Spleen and Foot Lesions of Leishmania-Infected Hamster. *Exp. Parasitol.* **1990**, *71* (2), 218–228. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90024-7).
- (414) Fernandes, A. C. S.; Soares, D. C.; Saraiva, E. M.; Meyer-Fernandes, J. R.; Souto-Padrón, T. Different Secreted Phosphatase Activities in Leishmania Amazonensis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *340* (2), 117–128. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12080>.
- (415) Kleczka, B.; Lamerz, A.-C.; van Zandbergen, G.; Wenzel, A.; Gerardy-Schahn, R.; Wiese, M.; Routier, F. H. Targeted Gene Deletion of Leishmania Major UDP-Galactopyranose Mutase Leads to Attenuated Virulence. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (14), 10498–10505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700023200>.
- (416) Tefsen, B.; Ram, A. F. J.; van Die, I.; Routier, F. H. Galactofuranose in Eukaryotes: Aspects of Biosynthesis and Functional Impact. *Glycobiology* **2012**, *22* (4), 456–469. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr144>.
- (417) de Lederkremer, R. M.; Colli, W. Galactofuranose-Containing Glycoconjugates in Trypanosomatids. *Glycobiology* **1995**, *5* (6), 547–552. <https://doi.org/10.1093/glycob/5.6.547>.
- (418) Späth, G. F.; Epstein, L.; Leader, B.; Singer, S. M.; Avila, H. A.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. Lipophosphoglycan Is a Virulence Factor Distinct from Related Glycoconjugates in the Protozoan Parasite Leishmania Major. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (16), 9258–9263.
- (419) Ory, K. Activité et Évaluation Thérapeutique de Dérivés Furanosidiques Sur Le Parasite Leishmania Donovanii. These de doctorat, Rennes 1, 2019.
- (420) O’Hagan, D. Understanding Organofluorine Chemistry. An Introduction to the C-F Bond. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 308–319. <https://doi.org/10.1039/b711844a>.
- (421) Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in Medicinal Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 320–330. <https://doi.org/10.1039/b610213c>.
- (422) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5822–5880. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788>.
- (423) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315–8359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>.
- (424) Wyllie, S.; Brand, S.; Thomas, M.; De Rycker, M.; Chung, C.; Pena, I.; Bingham, R. P.; Bueren-Calabuig, J. A.; Cantizani, J.; Cebrian, D.; Craggs, P. D.; Ferguson, L.; Goswami, P.; Hobrath, J.; Howe, J.; Jeacock, L.; Ko, E.-J.; Korczynska, J.; MacLean, L.; Manthri, S.; Martinez, M. S.; Mata-Cantero, L.; Moniz, S.; Nühs, A.; Osuna-Cabello, M.; Pinto, E.; Riley, J.; Robinson, S.; Rowland, P.; Simeons, F. R. C.; Shishikura, Y.; Spinks, D.; Stojanovski, L.; Thomas, J.; Thompson, S.; Viayna Gaza, E.; Wall, R. J.; Zuccotto, F.; Horn, D.; Ferguson, M. A. J.; Fairlamb, A. H.; Fiandor, J. M.; Martin, J.; Gray, D. W.; Miles, T. J.; Gilbert, I. H.; Read, K. D.; Marco, M.; Wyatt, P. G. Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis That Acts through Proteasome Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116* (19), 9318–9323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820175116>.
- (425) Pitcher III, W. H.; Huestis, W. H. Preparation and Analysis of Small Unilamellar Phospholipid Vesicles of a Uniform Size. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296* (5),

1352–1355. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02092-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02092-2).

(426) Falke, S.; Betzel, C. Dynamic Light Scattering (DLS). In *Radiation in Bioanalysis: Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods*; Pereira, A. S., Tavares, P., Limão-Vieira, P., Eds.; Bioanalysis; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 173–193. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6.

(427) Mo, H.; Harwood, J. S.; Yang, D.; Post, C. B. A Simple Method for NMR T1 Noise Suppression. *J. Magn. Reson.* **2017**, *276*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2016.12.014>.

(428) Johnson, B. A. Using NMRView to Visualize and Analyze the NMR Spectra of Macromolecules. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2004**, *278*, 313–352. <https://doi.org/10.1385/1-59259-809-9:313>.

(429) Rampersad, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* **2012**, *12* (9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>.

(430) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.

(431) Kulshrestha, A.; Bhandari, V.; Mukhopadhyay, R.; Ramesh, V.; Sundar, S.; Maes, L.; Dujardin, J. C.; Roy, S.; Salotra, P. Validation of a Simple Resazurin-Based Promastigote Assay for the Routine Monitoring of Miltefosine Susceptibility in Clinical Isolates of *Leishmania Donovanii*. *Parasitol. Res.* **2013**, *112* (2), 825–828. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3212-3>.

Annexe – Liste des actions de diffusion et des productions scientifiques

Présentations de poster

STRUCTURE OF A CYCLOLIPOPEPTIDE IN INTERACTION WITH A LIPOPOLYSACCHARIDE : Congrès international de l'EUROMAR du 1 au 5 juillet 2018 à la Cité des Congrès de Nantes. **Auteurs du poster** : Abderrafek El Harras, Matthieu Simon, Florie Desriac, Martine Pugniere, Patrice Got, Delphine Destoumieux-Garzon, Yannick Fleury, Arnaud Bondon.

STRUCTURE OF A CYCLOLIPOPEPTIDE IN INTERACTION WITH A LIPOPOLYSACCHARIDE : Workshop on structural biophysics du 21 au 26 octobre 2018 à Bordeaux. **Auteurs du poster** : Abderrafek El Harras, Matthieu Simon, Florie Desriac, Martine Pugniere, Patrice Got, Delphine Destoumieux-Garzon, Yannick Fleury, Arnaud Bondon.

Communications à des colloques/congrès avec actes

STRUCTURE OF A CYCLOLIPOPEPTIDE IN INTERACTION WITH A LIPOPOLYSACCHARIDE : 8èmes Rencontres Biologie-Physique du Grand-Ouest (RBPGO) - 27 et 28 septembre 2018 à Vannes. **Auteur** : Abderrafek El Harras.

STRUCTURE OF A CYCLOLIPOPEPTIDE IN INTERACTION WITH A LIPOPOLYSACCHARIDE : MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens (MuFoPAM) – 11 et 12 octobre 2018 à Paris. **Auteur** : Abderrafek El Harras.

Publications dans des journaux avec comité de lecture

Jeane Vaugenot, **Abderrafek El Harras**, Olivier Tasseau, Rémi Marchal, Laurent Legentil, Boris Le Guennic, Thierry Benvegna, Vincent Ferrières. 6-Deoxy-6-fluoro galactofuranosides : regioselective glycosylation, unexpected reactivity, and anti-leishmanial activity. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18 (7), 1462–1475. <https://doi.org/10.1039/C9OB02596K>.

Florie Desriac, **Abderrafek El Harras**, Matthieu Simon, Arnaud Bondon, Benjamin Brillet, Patrick Le Chevalier, Martine Pugnère, Patrice Got, Delphine Destoumieux-Garzon, Yannick Fleury. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (12). <https://doi.org/10.3390/md18120630>.