

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➤ Contact SCD Nancy 1 : [theses.sante@scd.uhp-nancy.fr](mailto:theses.sante@scd.uhp-nancy.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1**

**2010**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**A LA DECOUVERTE DES PEPTIDES  
ANTIMICROBIENS**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

le 1<sup>er</sup> Décembre 2010

pour obtenir

**Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

Par **Anne-Sophie MICHEL épouse LAUSCH**

Née le 3 juin 1985 à Nancy (54)

Membres du jury

**Président :** **Mme Chantal FINANCE**, PU-PH, laboratoire de Virologie, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1, CHU Nancy

**Directeur :** **Mr Raphaël E. DUVAL**, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1

**Juges :** **Mr Marc MERTEN**, MCU-PH laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, UHP Nancy 1, CHU Nancy

**Melle Marion GRARE**, Assistante Hospitalo-Universitaire, Faculté de Médecine de Rangueil, Université Paul Sabatier, Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU de Toulouse

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2010-2011**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :**

Jean-Michel SIMON

**Pharmaceutique Hospitalier**

**DOYEN HONORAIRE**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France Pochon

Anne ROVEL

Maria Wellman-Rousseau

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND .....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Joël COULON .....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Roudayna DIAB.....	Nanotechnologies pharmaceutiques
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
<b>Béatrice FAIVRE .....</b>	<b>Hématologie</b> - Génie Biologique
Adel FAIZ.....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Caroline GAUCHER DI STASIO .....	Expertise biopharmacologique
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique

Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI .....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER.....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER .....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Marie SOCHA.....	Pharmacie clinique
Julien PERRIN .....	Hématologie

### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....	Sémiologie
--------------------------	------------

### **PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD .....	Anglais
--------------------------	---------

### **Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET .....	Directeur
---------------------------	-----------

# Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# Remerciements

A mon Président de thèse, le **Professeur Chantal FINANCE**,  
Pour me faire l'honneur de présider ce jury,  
Pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire,  
Je vous remercie chaleureusement.

A mon Directeur, le **Docteur Raphael Duval**,  
Pour m'avoir accueilli lors de mon stage de recherche en 4<sup>ème</sup> année,  
Pour m'avoir transmis cette passion de la recherche,  
Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse,  
Mais surtout pour m'avoir supporté et encouragé durant ces 3 dernières années,  
Trouvez ici ma reconnaissance la plus profonde et tout mon respect.

A Mademoiselle le **Docteur Marion Grare**,  
Pour ses précieux conseils et sa patience,  
Pour sa pédagogie dans la transmission de ses connaissances,  
Pour m'avoir recadré dans les moments de doutes  
Pour avoir relu et corrigé mes fautes,  
Pour sa gentillesse et son sourire,  
Son amitié inestimable,  
Voyez en cette thèse toute la gratitude que j'ai pour vous.

Et enfin, au **Docteur Marc MERTEN**,  
Pour avoir accepté de juger ce travail,  
Avec tous mes remerciements.

**A mes parents**, pour m'avoir soutenue tout au long de mes études, et surtout pour votre patience face à mon stress.

A Maman, qui me faisait réciter mes classifications de botanique et de champignons,

A Papa, pour sa présence et son exemple,

A vous deux, pour votre amour, votre confiance, votre présence dans les moments parfois difficiles et l'éducation que vous m'avez inculqué,

Recevez cette thèse en guise de remerciements et de témoignage de tout mon amour.

**A mes grands-parents** qui me font l'honneur d'être présents en ce jour,

Et dans tous les moments importants de ma vie.

**A mon grand frère**, juste pour te dire que ta petite sœur a fini ses études avant toi !

Du bonheur dans ta vie, continue à en profiter à fond comme tu sais si bien le faire !

Avec toute mon affection et ma tendresse.

**A mes beaux parents, Mélanie** ma belle-sœur et **Dédé** mon beau frère

**A Paco** : « Tata moto » va avoir encore plus de temps pour s'occuper de son neveu adoré et de son petit frère Gaby !

**A tous mes amis**, dont je ne ferai pas la liste de peur d'oublier quelqu'un : « Alors tu soutiens quand ta thèse ? » Et bien nous y sommes, et avec cela, plus d'excuses pour ne plus sortir les week-ends (sauf pour le roller) ! Merci pour votre amitié, vos sourires et nos parties de rires !

A toute l'équipe de la **pharmacie des Arcades**, pour ces années passées à vos côtés, les connaissances accumulées ... vous me manquez !

Enfin, le meilleur pour la fin : **à David**, mon mari, mon motard, mon Dragibus.

Tu es ma source de bonheur et de motivation, tu es ma force dans mes moments de doutes et de craintes.

Pour nos balades à motos, pour ton soutien inconditionnel et ta confiance, et pour tous nos projets présents et futurs,

Reçoit tout mon amour de petit Pimousse.

**Merci.**

*Je dédie cette thèse à ma meilleure amie bretonne  
Delphine et à sa maman Christine, partie bien trop tôt ;  
toutes mes pensées vont vers vous.*

## Les devises Shadok



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

# Sommaire

INTRODUCTION .....	7
1. Historique.....	10
2. Structure chimique des peptides .....	13
2.1 Définition d'un peptide .....	14
2.2 Structures primaire, secondaire et tertiaire.....	15
2.3 Relation structure-activité.....	18
3. Classification des peptides antibactériens.....	19
3.1 Introduction .....	20
3.2 Classification actuelle des peptides antimicrobiens .....	21
3.2.1 Les peptides antimicrobiens cationiques.....	21
a. Les peptides linéaires formant des hélices $\alpha$ .....	21
b. Les peptides linéaires riches en certains AA.....	23
c. Les peptides riches en cystéine .....	25
3.2.2 Les peptides anioniques.....	31
4. Les principales familles de peptides cationiques antimicrobiens .....	34
4.1 Les magainines.....	35
4.1.1 Historique .....	35
4.1.2 Biologie et source .....	35
4.1.3 Structure.....	36
4.1.4 Mode d'action des magainines .....	37
4.1.5 Spectre d'activité.....	37
4.1.6 Synthèse .....	38
4.2 Les défensines.....	39
4.2.1 Historique .....	39
4.2.2 Sources et structures.....	39
a. Chez les plantes.....	39
b. Chez les invertébrés.....	40
c. Chez les vertébrés.....	40

4.2.3	Histoire de gènes.....	45
4.2.4	Synthèse et maturation des défensines.....	46
4.3	Les cathélicidines.....	47
4.3.1	Classification et structure.....	47
4.3.2	Le LL-37 : la seule cathélicidine de l'Homme.....	48
a.	Structure, synthèse et maturation.....	48
b.	Source.....	49
c.	Activités du LL-37.....	50
4.3.3	Chez les autres espèces.....	50
4.3.4	Organisation du gène codant la cathélicidine.....	51
4.3.5	Régulation des cathélicidines.....	52
5.	Mécanismes d'action et spectres d'activité.....	54
5.1	Mécanismes d'action et spectre d'activité des PAM antibactériens.....	55
5.1.1	Caractéristiques des membranes cellulaires.....	55
a.	Les cellules procaryotes.....	55
b.	Les cellules eucaryotes.....	59
5.1.2	Caractéristiques et spécificités des PAM.....	60
a.	La charge des peptides antimicrobiens.....	60
b.	La conformation des peptides.....	61
c.	Amphiphilie des peptides.....	61
5.1.3	Mode d'action des peptides antimicrobiens cationiques.....	62
a.	Attraction.....	62
b.	Attachement, fixation à la surface de la bactérie.....	63
c.	Interactions peptide/membrane.....	64
d.	Les mécanismes de mort cellulaire.....	70
e.	Autres approches.....	72
5.1.4	Spectre d'activité antibactérien des peptides cationiques.....	76
5.2	Mécanismes d'action antivirales et spectre d'activité antiviral.....	77
5.2.1	Spectre d'activité des peptides.....	77

5.2.2	Relation structure-activité des PAM antiviraux .....	80
5.2.3	Mode d'action des peptides antiviraux.....	80
a.	Blocage de l'entrée du virus .....	81
b.	Blocage de la propagation du virus.....	81
c.	L'interaction directe avec l'enveloppe virale.....	82
d.	Les cibles intracellulaires .....	82
6.	Rôle des PAM dans diverses maladies .....	84
6.1	Au niveau pulmonaire .....	85
6.2	Au niveau cutané .....	86
6.3	Au niveau digestif .....	86
7.	Rôle des PAM dans l'immunité innée et adaptative .....	88
7.1	Quelques rappels sur l'immunité .....	89
7.1.1	L'immunité innée .....	89
7.1.2	L'immunité adaptative .....	90
7.2	Les PAM effecteurs de l'immunité .....	90
8.	Avantages et inconvénients des PAM.....	95
8.1	Avantages des PAM comparés aux traitements conventionnels antibiotiques....	96
8.2	Inconvénients de l'utilisation des PAM .....	98
9.	Mécanismes de résistance aux PAM .....	101
9.1	Petit rappel sur la résistance des bactéries aux antibiotiques.....	102
9.2	La résistance naturelle des PAM .....	103
9.3	La résistance acquise des PAM.....	103
9.3.1	Modification de la charge nette.....	103
9.3.2	Modification de la fluidité membranaire .....	104
9.3.3	Modification des protéines membranaires.....	105
9.3.4	La production d'enzymes protéolytiques .....	105
9.3.5	Mécanisme de résistance efflux-dépendant.....	105
9.3.6	La modification des cibles intracellulaires. ....	106
10.	Développement clinique en matière d'anti-infectieux.....	108
10.1	Introduction.....	109
10.2	Le Pexiganan .....	110

10.3 L'iseganan .....	114
10.4 Le Neuprex.....	114
DISCUSSION CONCLUSION .....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	120
REFERENCES WEB.....	135
Liste des figures.....	137
Liste des tableaux.....	140

## Abréviations

AA	Acides Aminés
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMP	AntiMicrobial Peptide
ARN	Acide Ribonucléique
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BPI	Bactericidal / Permeability Increasing Protein
Cellule NK	Cellule Natural Killer
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMV	CytoMégaloVirus
CRAMP	Cathelin Related Antimicrobial Peptide
CS $\alpha\beta$	Cysteine stabilized $\alpha$ -helix $\beta$ -sheet
CYP	Cytochrome P
ERG	Entérocoque Résistant aux Glycopeptides
ERV	Entérocoque Résistant à la Vancomycine
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Transformée de Fourier
GAG	GlycosAminoGlycane
HBD-	Human Betâ Defensin
hCAP-18	Human Cationic Antimicrobial Peptide 18
HD-	Human Defensin
HIF $\alpha$	Hypoxy Inductible Factor $\alpha$
HNP-	Human Neutrophil Peptide

HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
Ig	ImmunoGlobuline
IGF-I	Insuline Growth Factor I
IL	InterLeukine
L <sub>B</sub>	Lymphocyte B
LPS	LipoPolySaccharide
L <sub>T</sub>	Lymphocyte T
NAG	N-Acétyle-Glucosamine
NAM	N-Acétyle-Muramique
NFκB	Nuclear Factor κ B
PAM	Peptide AntiMicrobien
pGLa	peptide Glycine-Leucine-amide
PGS	Peptide Glycine-Sérine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
SRC 3	Co-Récepteur aux Stéroïdes 3
TGF α	Transforming Growth Factor α
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor - Receptor 1
UFC	Unité Formant Colonie
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XPF	Xenopsin Precursor Fragment

# **INTRODUCTION**

Pour se défendre face aux agressions des bactéries, fungi, virus ou autres parasites, l'Homme a développé des molécules capables de terrasser l'adversaire : ce sont les antibiotiques, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires. Mais la première ligne de défense, naturelle, est l'immunité. En effet, l'Homme possède un système immunitaire (inné puis adaptatif) permettant de lutter contre ces envahisseurs : ce sont les macrophages, les lymphocytes, les anticorps, etc. Mais les plantes, les insectes, ne disposent pas de cet arsenal. Comment font-ils alors pour se défendre ? Comment une graine arrive-t-elle à germer dans un milieu infesté de bactéries ou de fungi ? C'est sûrement en se posant ces questions que l'Homme a découvert l'existence des peptides antimicrobiens (PAM). Les PAM sont de petits peptides présents dans le règne animal et végétal, capable de défendre l'hôte face aux agressions des micro-organismes dangereux pour leur survie.

Dans cet exposé, nous nous intéresserons plus particulièrement aux PAM cationiques, et nous verrons que l'Homme possède ces molécules indispensables pour se défendre. Il existe, à l'heure actuelle, peu d'antibiotiques cationiques. La Polymyxine B et la Polymyxine E (ou encore Colistine) sont des polypeptides cycliques associés à un acide gras, qui agissent au niveau de la membrane par une action détergente, entraînant la formation de pores, donc la fuite des éléments vitaux de la bactérie. La Daptomycine est également rapprochée des PAM cationiques : en effet, c'est un lipopeptide cyclique, ayant une action sur les bactéries à Gram positif comme les Staphylocoques ou les Streptocoques. Cette molécule se lie à la membrane bactérienne en présence d'ions  $Ca^{2+}$ , et entraîne une dépolarisation membranaire, responsable de l'inhibition de la synthèse des protéines, se soldant par la mort de la bactérie.

Et nos PAM, qui sont-ils ? Comment agissent-ils et sur quoi ? Quels rôles ont-ils dans certaines maladies ? Pourront-ils devenir les antibiotiques de demain ?

C'est ce que nous allons tenter de découvrir au fil de ce travail en commençant par leur découverte, les essais de classification et leur mécanisme d'action ainsi que leur spectre d'activité. Nous nous pencherons sur quelques grandes familles plus en détails, ainsi que sur le rôle de ces PAM dans l'immunité. Enfin, nous verrons quelles sont les innovations en terme de thérapeutiques par les PAM. En effet l'intérêt de ces molécules n'est pas seulement une meilleure compréhension des mécanismes de défense chez l'Homme, les animaux ou les plantes. L'Homme a développé des molécules, les antibiotiques, pour lutter contre les nombreuses infections générées par les bactéries. Seulement, on parle de plus en plus fréquemment de résistance à ces antibiotiques, et d'impasses thérapeutiques lorsque

tout l'arsenal de molécules devient inefficace pour une infection. Ainsi, les recherches en matière d'anti-infectieux sont menées pour approvisionner cet arsenal en nouveaux médicaments, et trouver ainsi des solutions pour lutter contre les bactéries ayant développées des résistances aux antibiotiques conventionnels.

# **1. Historique**

*Faire un historique précis des découvertes des peptides antimicrobiens est assez complexe, les premières publications relatent en effet de substances pouvant s'apparenter à des peptides, mais pas toujours.*

C'est durant les quinze dernières années du 19<sup>ème</sup> siècle que des activités antimicrobiennes dans le sang, les sécrétions, les leucocytes et les tissus lymphatiques ont été découvertes [Skarnes *et al.* 1957]. Au début des années 1920, Flemming découvre une substance dans le blanc d'œuf, qui est capable en quelques minutes de tuer certaines bactéries. Cette substance sera nommée plus tard lysozyme (enzyme lysant les bactéries) [Manwaring 1942]. Le lysozyme est un peptide à propriétés enzymatiques que l'on retrouvera plus tard dans le mucus nasal et les sécrétions lacrymales. Son rôle est actuellement reconnu dans la destruction du peptidoglycane des bactéries à Gram positif. Entre 1920 et 1950, plusieurs composés antimicrobiens sont isolés dans les sécrétions bronchiques notamment, et présentent une activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Nous pouvons ainsi dire que des peptides antimicrobiens ont été découverts au même moment que les antibiotiques. C'est en effet en 1928 que Flemming constate que des colonies blanches cotonneuses, qui se révèlent être un champignon du genre *Penicillium*, ont envahi ses boîtes de Pétri, où il faisait « pousser » des *Staphylocoques*. Il conclut que ce champignon inhibe la croissance de ces bactéries. Il publie ses recherches en 1929, en appelant le composant sécrété par le champignon la pénicilline. Cette re-découverte de la pénicilline (mise en évidence par E. Duchesne en 1897) n'intéressa pas de suite les scientifiques, et ce n'est qu'au cours de la Seconde Guerre Mondiale que les recherches sur la pénicilline s'intensifient, permettant d'aboutir à sa synthèse pour soigner les infections des soldats blessés [Rob 1990].

Parallèlement, en 1939, Dubos constate qu'un bacille inconnu sécrète un composé antimicrobien permettant d'inhiber la croissance de bactéries à Gram positif. Il teste cette substance sur la prévention des infections à pneumocoques sur la souris, confirmant ainsi l'activité antibactérienne [Dubos 1939]. En 1942, avec l'aide d'Hotchkiss, il purifie et isole deux molécules, la Gramicidine et la Tyrocidine issues de *Bacillus brevis* [Okuda *et al.* 1963]. Ces deux molécules sont composées d'acides-aminés et possèdent bien une activité dirigée contre certaines bactéries, mais ne sont pas dépourvues de toxicité. A la fin de la Seconde Guerre, seuls les antibiotiques, dont la pénicilline, découverts sont exploités pour lutter contre les infections, et les peptides ne sont quant à eux que très peu utilisés.

Le champ d'étude des peptides antimicrobiens s'amplifie dans les années 50, avec la description de la présence d'une activité antimicrobienne à large spectre dans les cellules sanguines par Skarnes [Skarnes *et al.* 1957]. Ce champ se développe surtout au début des années 1970, avec notamment les travaux d'Erspamer sur la peau des amphibiens. En effet, au cours de ses recherches, il découvre que la peau de nombreux amphibiens est recouverte d'une substance très riche en peptides présentant des activités biologiques diverses : antibactériennes, antivirales et antifongiques [Erspamer *et al.* 1970]. Toujours dans les années 1970, d'autres sources de peptides antimicrobiens ont été mises en évidence, notamment chez les plantes [De Smet *et al.* 2005]. En 1972, Boman et ses collaborateurs vaccinent des *Drosophiles* adultes par une injection de bactéries atténuées, induisant une immunisation via les PAM, les protégeant ainsi d'une infection létale par *Pseudomonas aeruginosa* [Boman *et al.* 1972; Boman 2003].

Les années 1980 correspondent au plein essor de la découverte des peptides anti-infectieux. En effet, H. G. Boman, découvre en 1980 dans l'hémolymphe de la puppe de *Cecropia hyalophora* (un hyménoptère), les Cécropines, peptides antibactériens non hémolytiques [Hultmark *et al.* 1980]. En 1983, Lehrer et Selsted purifient deux peptides antimicrobiens dans les macrophages des poumons de lapins [Selsted *et al.* 1983]. Ces peptides seront nommés par la suite Défensines [Selsted *et al.* 1985]. Les premières Magainines sont découvertes en 1987 chez *Xenopus laevis*, en pratiquant une incision sur la peau de la grenouille et en plongeant cette dernière dans de l'eau contenant une concentration élevée en bactéries, virus et champignons. L'infection paraît inévitable, pourtant la plaie de la grenouille cicatrise sans problème, montrant ainsi qu'elle possède un moyen de défense contre les germes pathogènes. C'est ainsi que les Magainine-1 et 2 sont isolées [Giovannini *et al.* 1987; Zasloff 1987; Gottler *et al.* 2009].

A partir des années 1990, la recherche sur les peptides antimicrobiens s'accélère : on découvre de plus en plus d'organismes producteurs, dans le règne animal et végétal.

A l'heure actuelle, plus de 1500 peptides antimicrobiens d'origines différentes ont été identifiés ([Lai *et al.* 2009], Antimicrobial Peptide Database : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Cela inclut les peptides antimicrobiens produits dans des tissus et cellules très divers de plantes, d'invertébrés, d'animaux [Ganz *et al.* 1998; Zasloff 2002].

## **2. Structure chimique des peptides**

## 2.1 Définition d'un peptide

Les peptides sont, par convention, des protéines de petite taille : ils font moins de 100 acides aminés (AA) ; la plupart des peptides antimicrobiens ont moins de 50 AA.

La structure générale d'un acide aminé est la suivante (figure 1) :

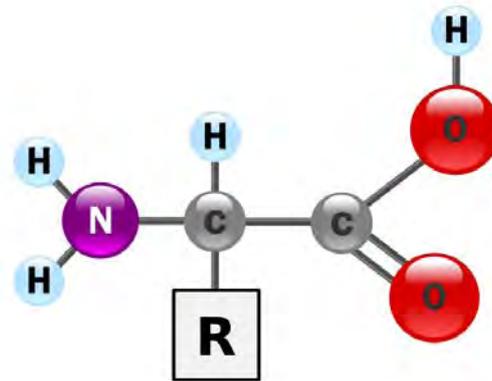


Figure 1 : Structure d'un acide aminé

**R** représente la chaîne latérale, et peut être :

- **Polaire** : sérine, thréonine, tyrosine, glutamine, asparagine, cystéine.
- **Non-polaire** : valine, alanine, leucine, phénylalanine, glycine, tryptophane, proline, isoleucine, méthionine.
- **Acide** : acide aspartique, acide glutamique.
- **Basique** : arginine, lysine, histidine.

D'après <http://www.science-et-vie.net>

Il existe une nomenclature internationale pour désigner chaque acide-aminé, présentée dans le tableau suivant (tableau I).

Tableau I : Nomenclature des acides-aminés

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre
Alanine	A
Arginine	R
Asparagine	N
Aspartate ou acide aspartique	D
Cystéine	C
Glutamate ou acide glutamique	E
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Méthionine	M
Phénylalanine	F
Proline	P
Sérine	S
Thréonine	T
Tryptophane	W
Tyrosine	Y
Valine	V

## 2.2 Structures primaire, secondaire et tertiaire

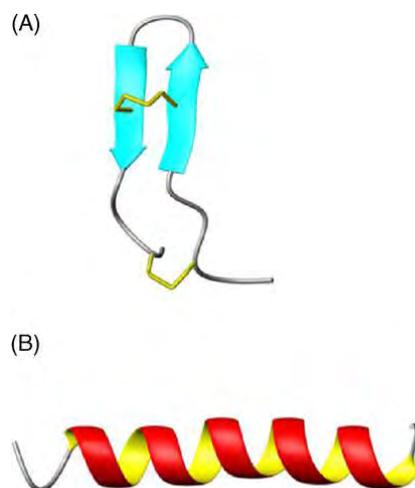
La structure primaire est la séquence en AA. Par convention, elle se définit de l'extrémité azotée N-terminal à l'extrémité carboxyl C-terminal. Cette séquence est linéaire, les AA la composant peuvent ainsi interagir entre eux et former des structures secondaires plus complexes.

La structure secondaire peut se décrire sous deux formes :

- l'hélice  $\alpha$  (figure 2 B), constituée d'une chaîne principale enroulée permettant des liaisons H entre les résidus d'AA [Pauling *et al.* 1951]. Le caractère amphiphile des peptides vient du fait que les résidus hydrophobes s'assemblent d'un côté et les résidus hydrophiles de l'autre. L'hélice  $\alpha$  est très polarisée du fait que toutes les liaisons hydrogènes sont parallèles : N-terminal anionique et C-terminal cationique [Zaslouff 1987] ;
- le feuillet  $\beta$  (figure 2 A) est une structure où la chaîne de résidus est repliée sur elle-même de façon parallèle ou antiparallèle, et stabilisée par des liaisons hydrogènes maintenant la structure. En raison des polarités, les assemblages antiparallèles sont plus stables.

La structure en coude peut s'apparenter à une structure secondaire particulière. Il s'agit en fait d'un repliement particulier du squelette carboné. Le plus souvent, le coude relie deux structures secondaires (hélices ou brins) [Bränden *et al.* 1996].

La structure secondaire des peptides antimicrobiens (PAM) est considérée comme un point important dans la compréhension du mode de fonctionnement de ces derniers [Gottler *et al.* 2009].



**Figure 2 : Différentes structures des peptides antimicrobiens**

A : la tachyplesine ; B : la magainine-2.

En jaune : les ponts disulfure

D'après Powers *et al.* 2003

La structure tertiaire correspond au repliement de la chaîne protéique. Ces repliements sont liés à l'existence de résidus encombrants ou chargés. Cette structure est stabilisée par :

- des liaisons hydrogènes entre les résidus d'acides aminés (exemple : serine --- lysine) ;
- des liaisons ioniques (exemple : glycine ---lysine) ;
- des liaisons hydrophobes (ou Van der Waals) entre les résidus apolaires ;
- des ponts disulfures entre les résidus de cystéine.

La structure tridimensionnelle d'un peptide est intimement liée à sa fonction : si la structure est cassée (par l'emploi d'un agent dénaturant par exemple), le peptide perd sa fonction, il est dénaturé.

L'analyse de la structure globale des PAM se fait surtout grâce à des techniques de basse résolution comme dichroïsme circulaire ou Transformée de Fourier (FTIR) [Powers *et al.* 2003; Gottler *et al.* 2009].

Certains peptides présentent des structures mixtes en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ , d'autres sont des peptides riches en certains AA, comme la glycine, la proline, ou encore l'arginine, qui ne peuvent pas former d'hélice  $\alpha$  [Dimarcq *et al.* 1998]. Ce sont les peptides en hélice  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$  qui sont les plus nombreux dans les peptides naturels.

Voici un tableau récapitulatif ([tableau II](#)) issu de l'Antimicrobial Peptide Database : au total, il y a 1593 peptides antimicrobiens dans la base de données à l'heure actuelle.

**Tableau II : Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens**

<b>Structure caractéristique</b>	<b>Nombre de peptides</b>	<b>Pourcentage</b>
Peptide à structure en hélice $\alpha$	250	15,64 %
Peptide à structure $\beta$	82	5,13 %
Peptide à structure mixte $\alpha \beta$	51	3,19 %
Peptide riche en un AA peu commun	80	5 %
Peptide à pont disulfure	373	23,34 %
Peptide à structure inconnue	757	47,37 %

## 2.3 Relation structure-activité

Les PAM sont considérés comme l'un des éléments clés du système immunitaire inné, servant à la défense des organismes multicellulaires [Hoffmann *et al.* 1999; Andres *et al.* 2007] (*voir chapitre 7 sur l'immunité*).

La structure même des peptides leur confère certaines caractéristiques essentielles pour leur action antimicrobienne : leur petite taille, 12 à 50 AA [Lai *et al.* 2009], le caractère amphiphile et cationique pour certains [Powers *et al.* 2003; Andres *et al.* 2007]. En effet, nous le verrons dans la classification, tous les peptides antimicrobiens ne sont pas cationiques. Il existe des dérivés de neuropeptides, des peptides aromatiques ou encore des peptides riches en acide aspartique, non-cationiques mais possédant des propriétés antimicrobiennes [Kowalska *et al.* 2002].

## **3. Classification des peptides antibactériens**

### 3.1 Introduction

Les PAM, ou encore AMP (« Antimicrobial peptide »), sont des peptides multifonctionnels jouant un rôle biologique fondamental, notamment dans l'élimination de micro-organismes pathogènes [Diamond *et al.* 2009].

Plusieurs classifications ont été établies, en suivant l'évolution des découvertes. En effet, il n'existe pas à ce jour de nomenclature universelle définie au niveau international. Ils ont tout d'abord été classés en fonction de leur origine. Les tous premiers peptides découverts portent ainsi le nom de l'être vivant dont ils sont issus : chez les bactéries, on les a nommés bactériocines [Jenssen *et al.* 2006; Diamond *et al.* 2009]. Chez *Drosophila melanogaster*, la drosomycine est l'un des premiers PAM découvert chez les insectes [Andres *et al.* 2007]. De même, chez les amphibiens, un peptide antimicrobien, à propriété hémolytique, a été mise en évidence en 1962 chez *Bombina variegata* (crapaud sonneur à ventre jaune), baptisé bombinine. La multiplication des découvertes, mais surtout la coexistence de peptides différents au sein d'une même espèce, a conduit la communauté scientifique à chercher une classification plus pertinente. Plusieurs noms de familles ont émergé, par exemple :

- Défensines
- Cathélicidines
- Histatines
- Cécropines
- Magainines

Seulement, des critères différents ont été choisis pour la dénomination de ces familles de peptides : les défensines pour leur action de défense de l'organisme, les cathélicidines pour leur structure (domaine cathelin, voir le chapitre 4.3), ou encore le nom de cécropines provenant du nom du papillon chez lequel il a été découvert. Cette classification n'a pas été retenue car trop hétérogène. Actuellement, la classification consensuelle des PAM repose sur leur charge globale et la diversité structurale (secondaire et tertiaire, la présence ou non de ponts disulfure) [Boman 1995; Gennaro *et al.* 2000; Shai 2002].

## 3.2 Classification actuelle des peptides antimicrobiens

Les **peptides cationiques** sont classés selon trois grandes familles [Boman 2003; Andres *et al.* 2007] :

- les peptides linéaires formant des hélices  $\alpha$
- les peptides contenant un pourcentage élevé en un seul AA
- les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure.

Parmi les **peptides non-cationiques**, nous distinguons les peptides anioniques et les peptides dérivés des protéines liées à l'oxygène.

Nous nous intéresserons principalement aux PAM cationiques, et nous n'évoquerons que très brièvement les non cationiques.

### 3.2.1 Les peptides antimicrobiens cationiques

Nous détaillerons les trois grandes familles de PAM cationiques présents dans de nombreuses espèces très différentes.

#### a. Les peptides linéaires formant des hélices $\alpha$

Plusieurs centaines de peptides sont regroupés dans cette famille, identifiés dans une grande variété d'organismes : plantes, invertébrés ou vertébrés [Castro *et al.* 2005; Lemaitre *et al.* 2007; Lai *et al.* 2009; Guani-Guerra *et al.* 2010].

Ces peptides sont caractérisés par :

- leur taille, inférieure à 40 AA ;
- leur caractère amphiphile marqué ;
- leur charge ;
- l'absence de résidus cystéine ;
- leur structure tertiaire qui forme des nœuds ou articulations [Diamond *et al.* 2009].

En solution aqueuse, la plupart de ces peptides sont déstructurés, et c'est au contact de la membrane bactérienne, ou de milieux mimant les membranes, qu'ils prennent une conformation en hélice  $\alpha$  amphipatique [Powers *et al.* 2003; Brogden 2005; Jenssen *et al.* 2006].

### i. Les insectes

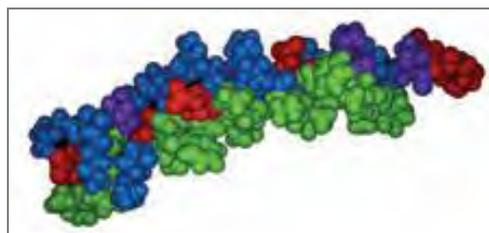
Chez les **insectes**, ces peptides sont très répandus, et sont produits par le corps gras, certains épithéliums et dans l'hémolymphe [Andres *et al.* 2007]. On y trouve par exemple les **Cécropines** chez la mite de la soie (*Hylophora cecropia*), ou encore chez l'anophèle (*Anophèles gambiae*) ainsi que la **Mélistine** dans le venin d'abeille [Fennell *et al.* 1968].

### ii. Les amphibiens

Chez les **amphibiens**, les PAM sont localisés dans les sécrétions cutanées, muqueuses ou encore dans l'épithélium intestinal [Simmaco *et al.* 1998]. Ainsi, on trouve des **Magainines** sur la peau de Xénope (*Xenopus laevi*), la **Bombinine** sur celle du crapaud sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata*) et la **Temporine** au niveau de la peau de la grenouille rouge d'Europe (*Rana temporaria*) [Zasloff 1987; Simmaco *et al.* 1996; Powers *et al.* 2003].

### iii. Les mammifères

Chez les **mammifères**, on retrouve les PAM dans les cellules phagocytaires, sur la peau et au niveau des muqueuses. Une seule famille de peptides linéaires en hélice  $\alpha$  est décrite chez les mammifères, il s'agit des **Cathélicidines**. La plus connue et plus étudiée est la cathélicidine humaine LL-37 (**figure 3**) [De Smet *et al.* 2005; Hancock *et al.* 2006; Lai *et al.* 2009]. On la retrouve dans les granules des neutrophiles, les mastocytes et les monocytes, mais également dans les kératinocytes au niveau de la peau [Guani-Guerra *et al.* 2010]. Elle est présente également dans la bouche, la langue, l'œsophage, le liquide broncho- alvéolaire lorsqu'il y a une inflammation, mais aussi au niveau du tractus génito-urinaire ou dans le liquide séminal [Boman 2003; Zaiou 2007; Diamond *et al.* 2009; Guani-Guerra *et al.*] (*voir chapitre 4.3 les cathélicidines*).



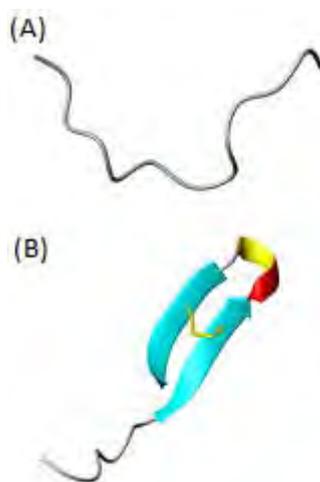
LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

**Figure 3 : Structure et séquence en AA de la Cathélicidine LL-37**

d'après Hancock *et al.* 2006

### ***b. Les peptides linéaires riches en certains AA***

Ce sont des peptides qui n'adoptent pas de structure secondaire en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ . En anglais, on les nomme « extended peptides » ce qui signifie « peptide étendu » (figure 4 A et B) [Lai *et al.* 2009] ; ils possèdent une séquence dont la composition est dominée par un certain type d'AA, et sont composés d'environ 44 résidus [Andres *et al.* 2007; Diamond *et al.* 2009].



**Figure 4 : Structure de peptides linéaires riches en certains AA**

A : l'indolicidine ; B : la thanatine.

D'après Powers *et al.* 2003

## i. Les insectes

Chez les **insectes**, plusieurs peptides riches en proline ont été identifiés, sous divisés en deux groupes : les peptides non substitués et les peptides O-glycosylés [Andreu *et al.* 1998].

Ces PAM possèdent entre 15 et 39 AA et la proline représente au moins 25%. Nous pouvons donner l'exemple :

- pour les peptides non substitués, des **Métalnikowines** et les **Metchnikowines** retrouvées chez les hyménoptères
- pour les peptides O-glycosylés, la **Drosocine** chez *Drosophila melanogaster* [Andres *et al.* 2007]. L'O-glycosylation paraît indispensable pour l'activité biologique des peptides riches en proline [Andreu *et al.* 1998; Andres *et al.* 2007].

On retrouve également des PAM riches en glycine, comme les **Attacines**, les **Diptéricines** synthétisés par le corps gras de *Drosophila melanogaster* [Andres *et al.* 2007].

## ii. Les mammifères

Chez les **mammifères**, on peut citer :

- l'**Histatine**, PAM riche en Histidine, retrouvée dans la salive des primates dont l'Homme [Lehrer *et al.* 1999; De Smet *et al.* 2005] ;
- l'**Indolicidine**, riche en tryptophane, découverte dans les neutrophiles des bovins (**figure 5**) [van Abel *et al.* 1995] ;
- la **PR-39**, peptide dérivé des cathélicidines, isolée chez le porc, contenant respectivement 49% et 24% de proline et d'arginine [Brogden 2005].



**Figure 5 : Structure et séquence en AA de l'indolicidine chez le bovin**

d'après Hancock *et al.* 2006

### c. Les peptides riches en cystéine

Ces peptides dits cycliques sont stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfure intramoléculaires formés grâce à la présence de cystéine [Brogden 2005; Andres *et al.* 2007]. Un des premiers peptides antimicrobiens cycliques découvert est la  $\theta$ -défensine chez le singe rhésus, qui aurait apparemment évolué en  $\alpha$ -défensine chez d'autres espèces par mutation au cours du temps [Lai *et al.* 2002; Bulet *et al.* 2004].

C'est un groupe très diversifié et le nombre de ponts disulfure conditionnent leur structure et leur activité : ces ponts disulfure peuvent être entre des feuilletts  $\beta$  (ex. des  $\alpha$ -défensines), entre des structures mixtes  $\alpha$  et  $\beta$  aussi appelées « open-ended » (ex. de la drosomycine), ou encore en épingle à cheveux (« hairpin-like ») [Bulet *et al.* 2004].

#### i. Peptides à un pont disulfure

**Les peptides avec un pont disulfure** sont très représentés chez les amphibiens, et se retrouvent au niveau de la peau essentiellement. Ils sont classés en 4 sous-groupes :

- les **Brévinines** chez la grenouille rouge d'Europe (*Rana esculenta*), **Gaégurines** chez la grenouille de Corée (*R. rugosa*), **Ranalexines** et **petites Esculentines** (contenant de 20 à 34 AA) ;
- les **grandes Esculentines** (36 à 46 AA) ;
- les **Ranatuérines** chez différentes espèces de grenouilles, comme *R. catesbeiana* et *R. temporaria* ;
- les **Tigérinines** chez la grenouille indienne (*R. tigrina*), constitués de 11 et 12 AA [Bulet *et al.* 2004].

Chez les mammifères, un seul représentant a été identifié, la **Bacténécine** (figure 6), un dodecapeptide cyclique isolé dans les neutrophiles de bovins [Romeo *et al.* 1988].



RLCRIVVIRVCR

Figure 6 : Structure et séquence en AA de la bacténécine

D'après <http://www.genscript.com>

## ii. Peptides à deux ponts disulfure

Concernant le groupe ayant **deux ponts disulfure**, on retrouve :

- chez les arthropodes, la **Gomesine** isolée de la tarentule (*Lycosa tarentula*), l'**Androctocine** retrouvée chez le scorpion (*Androctonus australis*) [Ehret-Sabatier *et al.* 1996] ou encore les **Tachyplésines** isolées du crabe fer à cheval (*Tachypleus tridentatus*) [Kawabata *et al.* 1999].
- chez les mammifères, les seuls représentants sont les **Protégrines**, constituées de 16 à 18 résidus, et isolées dans les leucocytes porcins [Bulet *et al.* 2004]. Notons que les **Protégrines** ont 17% d'homologie avec la Gomesine et 25% avec l'Androctocine, ce qui peut faire penser à l'existence d'un gène ancestral codant ces peptides.

### iii. Peptides à quatre ponts disulfure

Une seule famille prenant une conformation en épingle à cheveux avec **quatre ponts disulfure** a été mise en évidence à ce jour chez les vertébrés : il s'agit des **Hepcidines** (figure 7). On les trouve chez de nombreuses espèces de poissons au niveau des ouïes et du foie, ainsi que chez des mammifères, dont l'Homme, où elles sont présentes dans l'urine, le plasma et le foie. Deux hepcidines prédominent chez l'Homme, formées respectivement de 20 et 25 résidus, et il en existe une mineure, contenant 22 AA [Park *et al.* 2001; Shike *et al.* 2002].

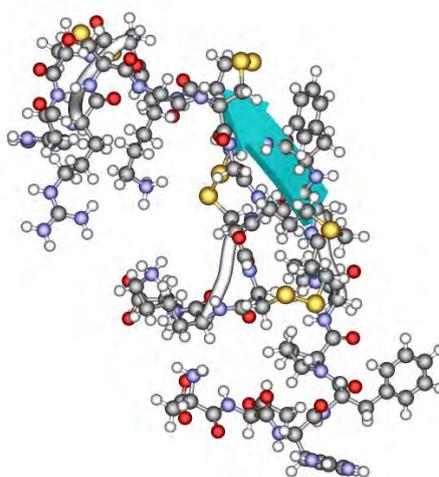


Figure 7 : Structure de l'hepcidine

d'après <http://www.pdb.org>

### iv. Peptides à 3 ou 4 ponts disulfure : les défensines

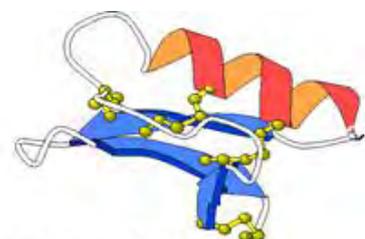
Une grande classe de PAM, retrouvée à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, et constituée de 3 ou 4 ponts disulfure : ces PAM sont de forme cyclique (« open-ended cyclic ») [Wong *et al.* 2007]. C'est un groupe de peptides très divers, appelés **Défensines** [Boman 2000]. Si on en croit l'hypothèse émise par S. Zhu, l'origine des défensines serait procaryotique [Zhu 2007].

### ➤ Les invertébrés

Chez les **invertébrés**, plus de 70 Défensines ont été isolées chez les arthropodes : insectes, scorpions, crustacés, tiques, mais également chez les mollusques [Lemaitre *et al.* 2007; van Dijk *et al.* 2008]. La division de ces peptides en sous-familles chez les invertébrés se fait en fonction de leurs propriétés biologiques : antibactériennes ou antifongiques. Les défensines antibactériennes sont les plus représentées. Seules quatre défensines sont strictement antifongiques, toutes produites chez les insectes :

- la Drosomycine (**figure 8**), constituée de 44 résidus et isolée de *Drosophila melanogaster* ;
- l'Heliomicine du ver du bourgeon du tabac (*Heliothis virescens*) ;
- la Termicine retrouvée chez une termite (*Pseudocanthothermes spiniger*) ;
- la Gallerimycine isolée dans la larve de mite (*Galleria mellonella*).

Ce nombre de peptides chez les invertébrés est sûrement sous-évalué et montre le manque d'investigations.



**Figure 8 : Structure de la drosomycine**

D'après Andres *et al.* 2007

La plupart des défensines sont présentes dans l'hémolymphe d'insectes infectés, tandis que chez les scorpions, termites, ou mollusques, ils sont produits au niveau des granules d'hémocytes [Diamond *et al.* 2009] (*voir chapitre 4.2 sur les défensines*).

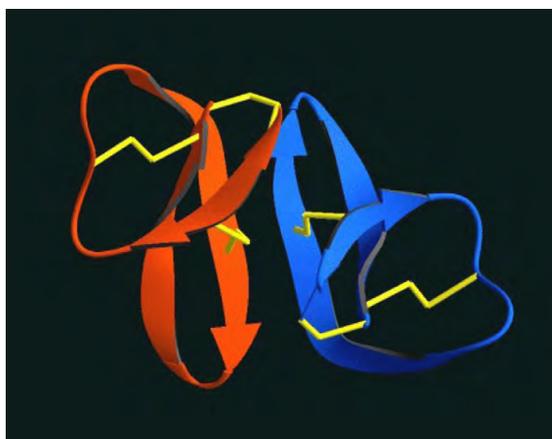
### ➤ Les vertébrés

Chez les **vertébrés**, on compte actuellement plus de 100 Défensines, principalement chez les mammifères et les oiseaux [Diamond *et al.* 2009]. Il existe trois sous-familles, selon leur gène précurseur :

- les  $\alpha$ -défensines
- les  $\beta$ -défensines
- les  $\theta$ -défensines

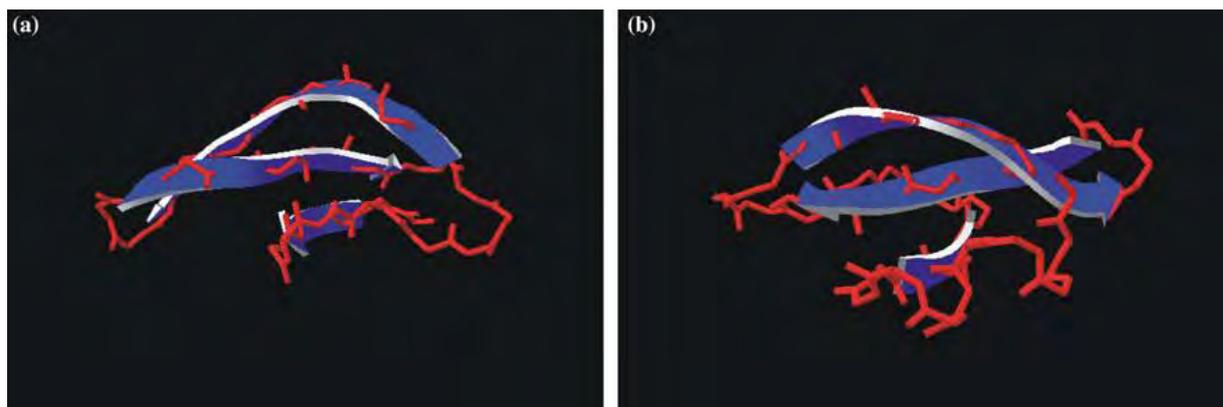
Les deux premières sous-familles auraient un gène ancestral commun [Diamond *et al.* 2009]. La structure de ces peptides est composée de trois feuillets  $\beta$ , incluant une boucle en épingle à cheveu et contenant trois ponts disulfure. C'est l'emplacement différent des ponts qui conditionne la sous-classification.

Les  **$\alpha$ -défensines** (figure 9 et 10a) sont largement présentes chez l'Homme, le singe, les rongeurs, et comportent 29 à 35 AA [Diamond *et al.* 2009]. On les retrouve dans les granules azurophiles des neutrophiles, dans les cellules intestinales de Paneth, mais également dans les macrophages.



**Figure 9 : Structure de deux molécules de l' $\alpha$ -défensine humaine HNP-3**

D'après Jonard *et al.*, 2006

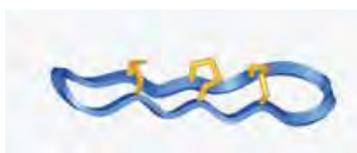


**Figure 10 : Structures tri-dimensionnelles d'une  $\alpha$ -défensine humaine HNP-3 (a) et d'une  $\beta$ -défensine humaine hBD-1 (b)**

D'après De Smet *et al.* 2005

Les  **$\beta$ -défensines** (figure 10 b) sont quant à elles constituées de 36 à 42 AA, présentent chez de nombreux vertébrés y compris chez les oiseaux, reptiles et marsupiaux. Elles sont produites au niveau des tissus épithéliaux dont la peau, les tractus respiratoire et génito-urinaire, ainsi que dans les polynucléaires [Diamond *et al.* 2009].

La troisième sous-famille de Défensines, les  **$\theta$ -défensines**, se trouve seulement chez les mammifères, plus précisément chez le singe (*Rhesus macaque*), et diffère des deux autres par sa structure [Selsted *et al.* 2005]. En effet, les  $\theta$ -défensines sont totalement cycliques (figure 11), et cette conformation est nécessaire pour maintenir l'activité en milieu salin [Bulet *et al.* 2004]. Trois molécules de 18 AA ont été identifiées dans les neutrophiles et les monocytes du singe.



**Figure 11 : Structure de la  $\theta$ -défensine RTD-1**

d'après Selsted *et al.* 2005

Nous reviendrons plus en détails sur cette grande famille des défensines dans un chapitre qui leur est consacré (*chapitre 4.2*).

### v. Peptides à cinq ponts disulfure

Parmi les peptides cycliques, il existe un peptide cationique isolé de la sangsue (*Theromyzon tessulatum*) et nommé **Théromacine**, de 75 AA dont 10 résidus cystéine formant ainsi cinq ponts disulfure (*figure 12*). Cette structure unique n'a été jusqu'à présent retrouvée dans aucune autre espèce, et joue un rôle important dans l'activité biologique de la molécule : la réduction du nombre de ponts disulfure entraîne la perte de son activité antibactérienne [Tasiemski *et al.* 2004].



**Figure 12 : Séquence en AA et représentation des ponts disulfure de la théromacine**  
d'après <http://lea.univ-lille1.fr>

### 3.2.2 Les peptides anioniques

Il existe, en plus des peptides cationiques, d'autres peptides possédant une activité antimicrobienne dans de nombreux organismes et notamment les peptides anioniques.

Les premiers peptides anioniques découverts en 1992 dans le liquide bronchoalvéolaire des ovins sont au nombre de trois, et requièrent la présence de zinc pour que leur activité soit maximale [Brogden *et al.* 2003].

Certains peptides dérivés des neuropeptides sont anioniques et ont été isolés des exsudats infectieux des bovins et de l'Homme : le **Peptide B** et l'**Enkélytine**. Ces peptides sont surtout actifs sur les bactéries à Gram négatif. Des molécules similaires ont été signalées chez des invertébrés [Marshall *et al.*, 2003]. D'autres peptides anioniques sont riches en acide aspartique. Isolés dans les poumons infectés des ruminants, ils ont des structures similaires aux propeptides des protéases, comme la trypsine. Ils semblent jouer un rôle de

régulateur dans le système enzymatique pulmonaire [Fales-Williams *et al.* 2002]. En général, ce sont de petites molécules, présentant des régions d'homopolymère d'acide aspartique qui leur donnent le caractère anionique. Ils sont présents au niveau d'extraits de surfactants, dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et dans les cellules épithéliales ciliées des voies aériennes. Produits en quantité millimolaire, ils requièrent la présence de Zinc comme co-facteur pour leur action biologique et sont actifs contre les bactéries à Gram positif et négatif [Brogden 2005]. Un de ces peptides, possédant 47 AA, a été identifié dans la sueur humaine : la [Dermcidine](#) [Schitteck *et al.* 2001]. Le premier peptide anionique des invertébrés a été trouvé chez la sangsue (*Theromyzon tessulatum*), la [Théromyzine](#), peptide de 86 AA [Tasiemski *et al.* 2004]. Chez les amphibiens, le premier peptide anionique a été découvert chez *Bombina maxima*, la [Maximin H5](#), contenant 3 résidus aspartiques et aucun AA basique [Lai *et al.* 2002].

### RESUME

Il existe de nombreuses familles de peptides antimicrobiens, que l'on classe actuellement de façon consensuelle en peptides cationiques et peptides non-cationiques.

Parmi les peptides cationiques, on distingue plusieurs sous-familles :

- peptides linéaires en hélices  $\alpha$
- peptides linaires riches en certains acides aminés peu communs
- peptides riches en cystéine à un ou plusieurs ponts disulfure

Après avoir vu les différentes familles de peptides antimicrobiens, nous allons étudier en détail les mécanismes d'action et les différents spectres d'activité des peptides cationiques antimicrobiens.

## **4. Les principales familles de peptides cationiques antimicrobiens**

## 4.1 Les magainines

### 4.1.1 Historique

A partir des années 1980, les ovaires de la grenouille africaine *Xenopus laevis* servent à étudier l'expression de l'ARN chez les eucaryotes. Zasloff prélève ces ovaires en pratiquant une incision sous anesthésie sur les grenouilles femelles, au niveau du péritoine. Après le prélèvement, la membrane musculaire et la peau sont suturées séparément. Bien que l'opération chirurgicale se fasse dans des conditions non stériles et que les grenouilles soient « renvoyées » dans un milieu humide rempli de bactéries, Zasloff constate que très peu de blessures s'infectent [Gottler *et al.* 2009]. De plus, il remarque que les grenouilles cicatrisent très vite. Il suppose donc que la peau du Xénope produit un agent antibactérien, capable d'agir rapidement et de façon non sélective vis-à-vis des nombreuses bactéries, empêchant ces dernières de pénétrer à l'intérieur de la plaie. Intrigué par ces remarquables capacités de lutte contre les bactéries, il étudie la peau du Xénope de plus près. Il utilise des extraits de peau pour démontrer l'activité antibactérienne, notamment sur *E. coli*. C'est ainsi qu'il isole en 1987 deux composants possédant un large spectre antibactérien, qu'il nomme magainine-1 et -2, mot provenant de l'hébreu *magain*, signifiant bouclier [Ge *et al.* 1999]. Le nom de PGS (Peptide Glycine-Sérine) a été donné par Giovannini et ses collaborateurs pour un peptide avec un résidu de glycine en position N-terminal et un résidu de sérine en position C-terminale [Bevins *et al.* 1990].

Ces peptides apparaissent comme des composants majeurs de la peau du Xénope, une seule grenouille pouvant fournir 2 mg de peptides [Zasloff 1987]. D'autres peptides ont été découverts chez les amphibiens, regroupés sous différentes familles comme les bombesines, dermorphines, xenipsines. La famille des magainines s'est agrandie avec la pGLa (peptide Glycine-Leucine-amide) ou encore le XPF (Xenopsin Precursor Fragment).

### 4.1.2 Biologie et source

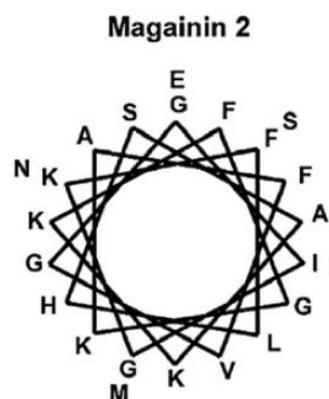
On retrouve les magainines (et d'autres peptides antibactériens) au niveau de structures granuleuses sur la peau [Flucher *et al.* 1986; Conlon *et al.*]. Ces glandes granuleuses sont, chez les amphibiens, de grandes cellules plurinucléées possédant un cytoplasme rempli de granules en grain de riz [Giovannini *et al.* 1987]. Ces cellules sont regroupées au niveau de

l'épiderme pour former des ampoules. Ces structures neuroépithéliales accumulent les peptides biologiquement actifs et les déversent par un pore à la surface de la peau. On retrouve leur équivalent chez les mammifères, au niveau des cellules neuroendocrines et des neurones peptinergiques [Erspamer *et al.* 1979; Bevins *et al.* 1990]. Ces glandes apparaissent en abondance durant la métamorphose, dérivant d'îlots subépithéliaux [Bovbjerg 1963].

Ces peptides sont libérés de leurs granules naturellement lors d'une blessure ou d'un stress, ou de façon artificielle par l'injection d'adrénaline, au niveau de la peau. Cela entraîne leur lyse osmotique au contact de l'eau, et l'apparition d'un gel hydrophobe tapissant la peau de ces amphibiens [Bevins *et al.* 1990].

### 4.1.3 Structure

Les magainines 1 et 2 (figure 13) sont des peptides de petite taille et de faible poids moléculaire (2 kDa), constitués d'une chaîne de 23 AA [Andres *et al.* 2007]. Ils appartiennent à la famille des PAM cationiques à structure en hélice  $\alpha$  amphipatique, dont ils représentent le parfait exemple et ils ne diffèrent que par deux résidus situés en position 10 et 22 de la chaîne [Zairi *et al.* 2009]. D'autres magainines ont été mises en évidence, possédant entre 21 et 26 AA et provenant de la peau ou l'intestin d'amphibiens.



**Figure 13 : Structure de la magainine 2**

d'après Gottler *et al.*, 2009

#### 4.1.4 Mode d'action des magainines

L'activité bactéricide des magainines est très rapide et n'est pas influencée par le pH et la température [Zasloff *et al.* 1988]. Les magainines se fixent sur la membrane des bactéries, riches en phospholipides, ce qui conduit à la formation de pores toroïdaux très stables, entraînant un mouvement de flip-flop des lipides de la membrane et une translocation des peptides sur la membrane cytoplasmique couplée à la perméabilisation membranaire [Andres *et al.* 2007; Imura *et al.* 2008]. Le fait de réduire la chaîne de résidus au niveau N-terminal de la magainine-2 entraîne une diminution de l'activité antibactérienne. Par contre, la réduction du nombre d'AA au niveau C-terminal n'affecte pas significativement l'activité de ce peptide. Ces résultats suggèrent l'importance d'une longueur minimale du peptide en relation avec le mécanisme d'action [Zasloff *et al.* 1988; Gottler *et al.* 2009].

#### 4.1.5 Spectre d'activité

Ces magainines possèdent un spectre d'activité très large (tableau VI), contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*E. coli*, *S. epidermidis*), les champignons (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) mais aussi les parasites (*Paramecieun caudatum*, *Amoeba proteus*), et sont dépourvus d'activité hémolytique [Zasloff 1987; Bevins *et al.* 1990]. Par contre, la magainine 2 est inactive sur *Proteus sp* et sur *Enterococcus faecalis* (pas de données sur *Enterococcus faecium*) [Zasloff 1987].

De plus, ces peptides facilitent la cicatrisation et la réduction de l'inflammation [Sai *et al.* 1995]. On peut noter que la magainine 1 est 10 fois moins active que la magainine 2 et que ces deux peptides ne montrent aucune synergie entre eux. A l'inverse, PGLa et la magainine 2 fonctionnent de façon synergique, notamment dans la lutte contre les bactéries (ex. *E. coli*) mais aussi en tant qu'anticancéreux [Westerhoff *et al.* 1995].

Tableau III : Activité antimicrobienne de la magainine 2

d'après Zasloff 1987

Organism	Minimal inhibitory concentration, μg/ml
<i>Escherichia coli</i> (D31)	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Pseudomonas putida</i>	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
<i>Citrobacter freundii</i>	30
<i>Enterobacter cloacae</i>	50
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	50
<i>Candida albicans</i>	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<i>Serratia marcescens</i>	100
<i>Proteus mirabilis</i>	>100
<i>Streptococcus fecalis</i>	>100

#### 4.1.6 Synthèse

Ces peptides sont synthétisés sous forme de prépropeptides et sont clivés en propeptides sous l'impulsion d'un signal puis emmagasinés sous forme de granules dans les glandes de la peau des amphibiens [Zairi *et al.* 2009].

Une séquence partielle de l'ADNc du précurseur des magainines a été identifiée, elle code pour une portion de protéine de 160 AA, contenant trois segments : un pour la magainine-1 et deux pour de magainine-2 [Zasloff *et al.* 1988]. La magainine-1 est codée par les nucléotides 94 à 162 et la magainine-2 par les nucléotides 370 à 437. S'en suit un clivage protéolytique au niveau d'une arginine en position N-terminale et lysine-arginine en position C-terminale, conduisant à la formation des trois magainines [Zasloff 1987; Bevins *et al.* 1990].

## 4.2 Les défensines

### 4.2.1 Historique

En 1983, Lehrer et Selsted purifient deux PAM à partir des macrophages de poumons provenant de lapins ; on nomma ces peptides plus tard les défensines [Selsted *et al.* 1983]. C'est en 1985 que Ganz et Selsted découvrent que ces peptides existent également chez l'Homme, dans les neutrophiles [Ganz *et al.* 1985]. A partir de cette date, un nombre important de défensines sont isolées, chez de multiples espèces : vertébrés, invertébrés, plantes mais aussi micro-organismes [Boman 2003; Stotz *et al.* 2009].

### 4.2.2 Sources et structures

Les défensines sont des peptides cationiques de poids moléculaire compris entre 3 et 5 kDa, molécules résistantes aux protéases et contenant trois ou quatre ponts disulfure [Hoffmann *et al.* 1999]. C'est une famille très complexe de PAM cationiques, subdivisée en de nombreuses sous-familles, suivant leur origine [Guani-Guerra *et al.* 2010].

#### a. Chez les plantes

Egalement appelées  $\gamma$ -thionines, c'est l'une des premières classes de PAM découverts, et donc très étudiée. D'un poids moléculaire d'environ 5 kDa, elles comportent entre 45 et 54 AA et contiennent 4, 6 ou 8 résidus cystéine. Ce sont pour ces caractéristiques similaires aux thionines que ces défensines prennent le nom de  $\gamma$ -thionines [Stotz *et al.* 2009]. Ce n'est d'ailleurs qu'en 1995 que ces peptides prennent le nom de défensines, grâce aux études menées par Terras et ses collaborateurs. En effet, ces chercheurs isolent deux peptides antifongiques (Rs-AFP1 et Rs-AFP2), et notent des similitudes de structure et des propriétés fonctionnelles avec les défensines d'insectes et d'animaux [Broekaert *et al.* 1995]. Ces peptides se structurent en motif en trois dimensions, stabilisés par quatre ponts disulfure. Cette stabilisation est due au motif CS $\alpha$  $\beta$  (cysteine-stabilized  $\alpha$ -helix  $\beta$ -sheet) [Cornet *et al.* 1995]. La première défensine de fleur a été caractérisée par RMN et isolée de *Nicotiana glauca* : la NaD1 [Lay *et al.* 2005]. Depuis, de nombreux autres peptides ont été

identifiés dans les plantes, et isolés dans de nombreux tissus, comme les graines, les racines, les tissus vasculaires, les feuilles ou encore l'écorce [Moreno *et al.* 1994; Park *et al.* 2002; Silverstein *et al.* 2007].

### **b. Chez les invertébrés**

Comme nous l'avons vu dans la classification, il existe plus de 70 défensines chez les invertébrés. La plupart de ces défensines sont présentes dans l'hémolymphe d'insectes, tandis que chez les scorpions, termites, ou mollusques, ils sont produits au niveau des granules d'hémocytes (chez les invertébrés, correspondent à l'équivalent des cellules phagocytaires des vertébrés) chez les animaux non-infectés [Diamond *et al.* 2009]. On retrouve également une production de PAM au niveau du corps gras (équivalent du foie chez l'Homme) chez la Drosophile (*Drosophila melanogaster*) [Andres *et al.* 2007].

La division des peptides en sous-familles chez les invertébrés se fait en fonction de leurs propriétés biologiques : antibactériennes ou antifongiques. Les défensines antibactériennes sont les plus représentées. Et comme nous l'avons vu précédemment, seules quatre défensines sont strictement antifongiques, toutes produites chez les insectes :

- la drosomycine, constituée de 44 résidus et isolée chez la mouche (*Drosophila melanogaster*)
- l'heliomicine du ver du bourgeon du tabac (*Heliothis virescens*)
- la termicine retrouvée chez une termite (*Pseudacanthohermes spiniger*)
- la gallerimycine isolée dans la larve de mite (*Galleria mellonella*).

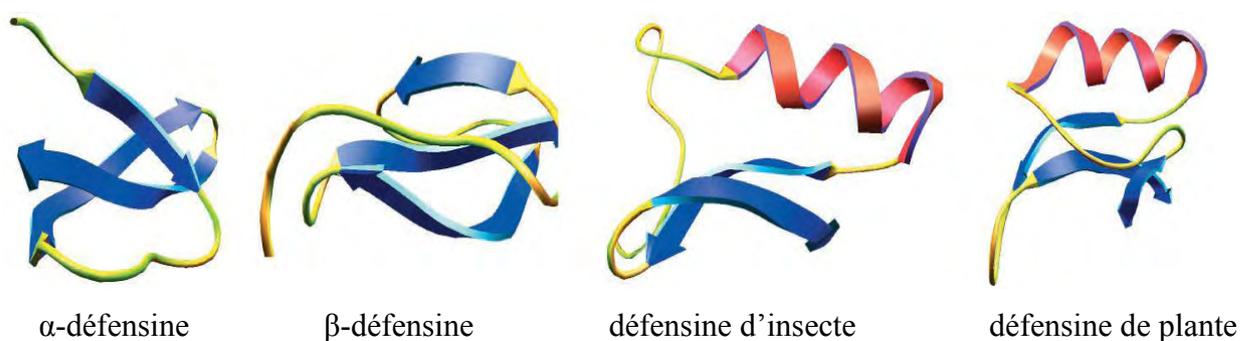
Ce nombre de peptides antifongiques chez les invertébrés est sûrement sous-évalué et montre le manque d'investigations.

### **c. Chez les vertébrés**

Chez les **vertébrés**, plus de 100 défensines ont été identifiées, notamment chez les mammifères et les oiseaux. Ces peptides sont composés de trois feuilletts  $\beta$ , incluant une boucle en épingle à cheveu.

Seules les  $\alpha$  et  $\beta$ -défensines sont présentes chez l'Homme [Izadpanah *et al.* 2005] et sont très étudiées. Ces défensines sont riches en arginine et possèdent six résidus de cystéine conservés, formant ainsi trois ponts disulfure intramoléculaires [Chen *et al.* 2006; Guani-Guerra *et al.* 2010].

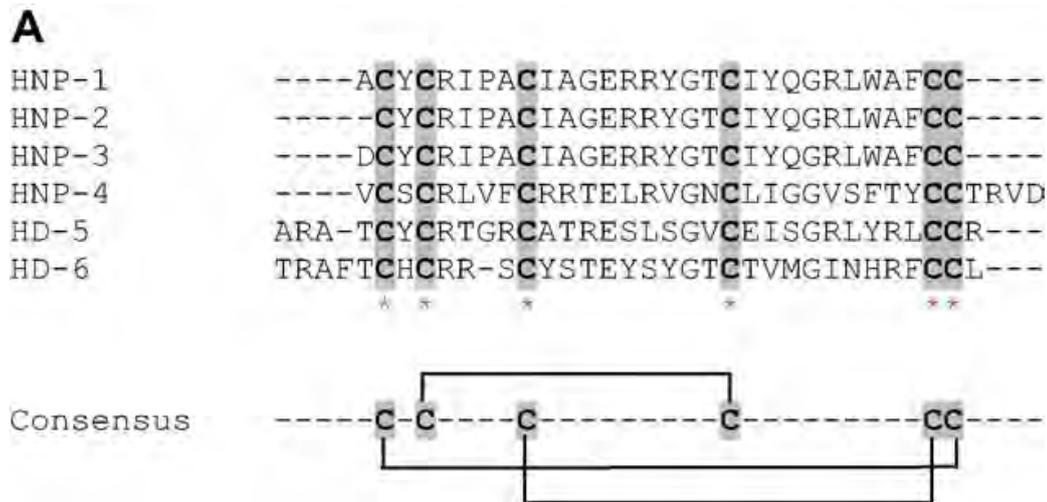
Les structures tertiaires des  $\alpha$  et des  $\beta$ -défensines sont très proches (figure 14). Chez les insectes et les plantes, la présence des trois ponts disulfure permet de stabiliser et de conserver la structure tridimensionnelle des trois feuillets  $\beta$  antiparallèles et de l'hélice  $\alpha$  [Chen *et al.* 2006]. Pour être actives, ces défensines se rassemblent en octamères [Hoover *et al.* 2000]. En revanche, la structure des  $\alpha$  et des  $\beta$ -défensines humaines ne comportent que trois feuillets  $\beta$  reliés par les ponts disulfure [Hoffmann *et al.* 1999].



**Figure 14 : Structures tridimensionnelles des défensines**  
d'après Hoffmann *et al.* 1999

### i. Les $\alpha$ -défensines

Les  $\alpha$ -défensines sont largement présentes chez l'Homme, le singe, les rongeurs. Ce sont de petites molécules comportant 29 à 35 AA [Diamond *et al.* 2009]. Ce groupe est caractérisé par la présence de ponts disulfure entre les résidus 1 et 6, 2 et 4, et 3 et 5 (figure 15).



**Figure 15 : Alignement des  $\alpha$ -défensines humaines et positionnement des ponts disulfure**  
d'après Jonard *et al.*, 2006

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux défensines humaines (*concernant la structure de ces PAM, voir chapitre 3*).

Chez l'Homme, six  $\alpha$ -défensines ont été mises en évidence. Quatre de ces peptides se nomment peptides neutrophiles humains (HNP) car ils ont été découverts dans les neutrophiles : HNP-1, -2, -3, -4 [Braff *et al.* 2005]. Ces PAM se trouvent dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles [Guani-Guerra *et al.* 2010], mais également dans les lymphocytes B, les cellules NK (natural killer) et les monocytes [Selsted *et al.* 2005]. De plus, il a été rapporté que la concentration est plus importante en HNP-1, -2 et -3 dans ces cellules, que celle en HNP-4 [Ganz *et al.* 1990]. HNP-1, HNP-2 et HNP-3 sont excrétées en réponse à une stimulation bactérienne [Jonard *et al.* 2006].

Les deux autres  $\alpha$ -défensines se nomment défensines humaines 5 et 6 (HD-5 et HD-6). Elles ont été découvertes par Jones et Bevins dans les années 1990 [Jones *et al.* 1992]. Elles sont exprimées en grande concentration dans les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle, mais aussi dans les cellules épithéliales du tractus génital de la femme [Quayle *et al.* 1998; Valore *et al.* 1998; Garcia *et al.* 2001; Ouellette 2004; Jenssen *et al.* 2006]. Dans l'intestin, HD-5 doit être activée par la trypsine présente pour exprimer son activité antibactérienne [Ghosh *et al.* 2002].

Actuellement, environ 50  $\alpha$ -défensines ont été identifiées chez les mammifères [Lai *et al.* 2009].



La première  $\beta$ -défensine humaine HBD-1 a été isolée de l'hémofiltrat des patients dialysés en 1995. Elle a ensuite été retrouvée dans le plasma, au niveau des poumons, de la glande mammaire, de l'appareil reproducteur féminin, de la prostate, des glandes salivaires ou encore du pancréas ou de la langue [De Smet *et al.* 2005].

HBD-2 a été isolée pour la première fois en 1997 au niveau des callosités des malades atteints de psoriasis, puis dans les leucocytes et dans la moelle épinière, au niveau du prépuce, des poumons, de la trachée, de la muqueuse vaginale et de l'utérus [Jonard *et al.* 2006 ; Raj *et al.* 2002; De Smet *et al.* 2005]. D'un poids moléculaire de 4 kDa, ce peptide se lie à l'héparine, sa production est inductible par les bactéries, mais le mécanisme est encore mal connu [Harder *et al.* 1997].

HBD-1 est exprimée de façon constitutive dans les épithéliums, tandis que HBD-2 doit subir une activation, notamment lors d'inflammation [Braff *et al.* 2005].

La  $\beta$ -défensine HBD-3, découverte en 2000, est un peptide de 5 kDa, hautement basique, découvert dans les extraits de lésions psoriasiques également [Harder *et al.* 2001]. L'ARN messager de ce peptide est exprimé dans les épithéliums de nombreux organes. Ainsi, cette défensine est retrouvée en concentration élevée dans la salive et les fluides cervico-vaginaux, mais aussi la peau, les amygdales, les cellules épithéliales des voies respiratoires, le cœur, l'appareil reproducteur féminin, les muscles squelettiques, le placenta, ou encore l'œsophage [Ghosh *et al.* 2007]. C'est la plus cationique des défensines. Tout comme HBD-2, HBD-3 est un peptide inductible, notamment suite à une activation par le TNF- $\alpha$  et l'interféron  $\gamma$  [Garcia *et al.* 2001; Harder *et al.* 2001]. HBD-4 a été découverte en 2001. Cette défensine est présente dans les testicules, l'estomac et l'utérus, l'épithélium pulmonaire, ainsi que dans la thyroïde, les reins et les polynucléaires neutrophiles [Garcia *et al.* 2001; De Smet *et al.* 2005]. La faible concentration basale au niveau pulmonaire indique qu'il faut une activation par contact avec des bactéries, ou un activateur de la protéine kinase C comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) [De Smet *et al.* 2005]. Quant aux  $\beta$ -défensines HBD-5 et 6 isolées en 2002, elles sont spécifiques de l'homme ; on les retrouve notamment dans l'épididyme [Yamaguchi *et al.* 2002].

Ces  $\beta$ -défensines peuvent être subdivisées en 2 sous-groupes [Yamaguchi *et al.* 2002] :

- les isoformes spécifiques de l'épididyme : HBD-4 à -6 ;
- et les autres isoformes : HBD-1, -2 et -3.

Pour finir, les sous-types HBD-25 à 29, sont prédominants au niveau du tractus génital masculin [De Smet *et al.* 2005].

Ainsi on compte plus de 90  $\beta$ -défensines chez l'Homme [Lai *et al.* 2009].

### iii. Les $\theta$ -défensines

Ces défensines ont été isolées des singes rhésus (*Rhesus macaque*) et diffèrent des deux groupes décrits précédemment. En effet, contrairement aux défensines  $\alpha$  et  $\beta$ , la structure des  $\theta$ -défensines est totalement cyclique, ne laissant pas apparaître d'extrémité libre. Cette conformation est nécessaire pour maintenir l'activité en milieu salin [Bulet *et al.* 2004]. De plus, ces défensines sont beaucoup plus petites : les trois molécules découvertes, RTD-1, -2 et -3, composées de 18 AA, ont été identifiées dans les neutrophiles et les monocytes du singe (figure 17) [Tang *et al.* 1999].

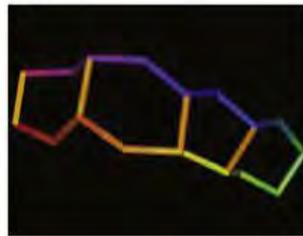


Figure 17 : Structure de la  $\theta$ -défensine

d'après Lai *et al.*, 2009

#### 4.2.3 Histoire de gènes...

Au cours de l'évolution, les défensines sont apparues très tôt, et sont très conservées : c'est pour cette raison qu'on retrouve cette classe de peptides chez de nombreuses espèces très éloignées comme les végétaux, les insectes, les poissons, les amphibiens et les mammifères [Jonard *et al.* 2006].

Les  $\alpha$  et  $\beta$  défensines sont deux sous-familles ayant un gène commun ancestral. Chez les mammifères, il apparaît que l'évolution de certaines  $\alpha$ -défensines divergent de la famille des  $\beta$ -défensines [Diamond *et al.* 2009]. Les gènes codant certaines  $\alpha$  et  $\beta$  défensines humaines se situent sur le chromosome 8, au niveau du locus p23 [Linzmeier *et al.* 1999].

Les trois précurseurs des  $\theta$ -défensines identifiés sont des paralogues (*lien évolutif entre 2 gènes d'une même espèce*) des défensines  $\alpha$ , tronquées par un codon stop [Selsted *et al.* 2005].

Les  $\theta$ -défensines ne se retrouvent que chez les singes de l'ancien monde, comme les orangs-outans ou les gibbons. Le gène DEFT codant les  $\theta$ -défensines est également présent chez l'Homme, notamment au niveau de la moelle épinière, mais à l'état de pseudogènes transcrits, ce qui ne permet pas la synthèse d'une protéine active [Tran *et al.* 2002; Lehrer 2004].

#### 4.2.4 Synthèse et maturation des défensines

Les gènes des  $\alpha$  et  $\beta$  défensines (figure 18 A et B) se situent au niveau du chromosome 8 locus p23.

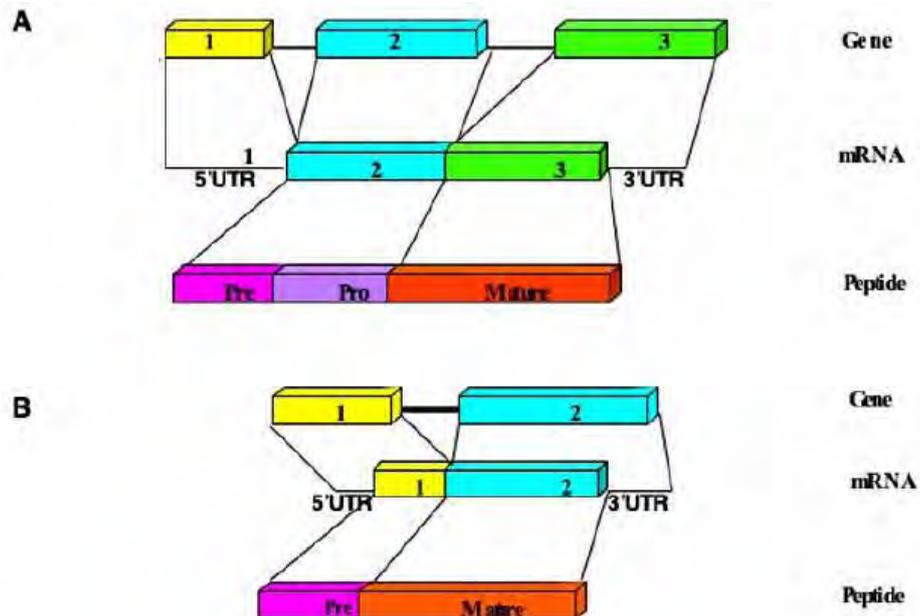


Figure 18 : Structure génétique des  $\alpha$  (A) et  $\beta$  (B) défensines humaines

D'après Diamond *et al.* 2009

L'expression de ces peptides est régulée à un niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. HDB-1 est exprimée de façon constitutionnelle tandis que HDB-2, 3 et 4

sont inductibles [Guani-Guerra *et al.* 2010]. Dans les cultures de cellules épithéliales, l'expression de HDB-2 est stimulée par des interleukines IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , le TNF-  $\alpha$ , l'interféron IFN  $\gamma$  ou encore les bactéries à Gram positif et négatif, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, ou le LPS [Mendez-Samperio *et al.* 2007; Lai *et al.* 2009]. L'expression d'HDB-2 est augmentée en présence de bactéries, suite à la reconnaissance par les récepteurs Toll-like (TLR) 2 ou 4 [Mendez-Samperio *et al.* 2007].

TLR 2 reconnaît les protéoglycanes des bactéries tandis que TLR 4 reconnaît les lipoprotéines et les acides lipoteichoïques [Amlie-Lefond *et al.* 2005]. Des études récentes ont montré que les IL-17 et IL-22 sont des cytokines régulatrices importantes de l'expression d'HBD 2 et 3.

Beaucoup de PAM sont codés en groupe dans le génome. Par exemple, les défensines humaines HNP-1 et 4 et HD-5 et -6 ( $\alpha$  défensines), ainsi que les  $\beta$  défensines HBD-1 et -2 sont toutes localisées sur le même chromosome 8p23. Leur expression doit être régulée à la fois aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels, et la régulation transcriptionnelle coordonnée des gènes des PAM peut mener à l'expression de multiples PAM sur un seul site [Lai *et al.* 2009].

Les PAM sont exprimés sous forme de propeptides qui suivent un processus protéolytique pour être libéré sous forme de peptide actif, la régulation de leur fonction est dépendante de l'expression de protéases appropriées [Lai *et al.* 2009].

## 4.3 Les cathélicidines

### 4.3.1 Classification et structure

Les cathélicidines sont des PAM cationiques, décrits à la fois chez des espèces invertébrées et vertébrées dont les oiseaux, les poissons, les serpents et les mammifères. Chez ces derniers, on retrouve ces PAM chez la souris, les bovins, le porc et le lapin [Lai *et al.* 2009]. C'est également une famille de peptides antimicrobiens que l'on retrouve chez l'Homme, où la seule cathélicidine humaine découverte jusqu'à présent est retrouvée essentiellement dans les granules azurophiles des cellules neutrophiles, et nommée LL-37 [Bowdish *et al.* 2005]. *Nous reviendrons sur ce PAM humain dans le paragraphe 4.3.2.*

Les cathélicidines dérivent en fait d'une protéine précurseur, caractérisée par un peptide signal, un pro-domaine hautement conservé ressemblant à la cathéline (inhibiteur de la cathepsine L) appelé domaine cathéline. C'est de cette structure que provient le nom de cathélicidines [Lai *et al.* 2009]. Le peptide signal et le domaine cathéline se trouvent au niveau N-terminal, région hautement conservée. La partie C-terminal contient quant à elle une séquence très variable au niveau intra et inter-espèce [Guani-Guerra *et al.* 2010]. La structure conditionnant l'activité des cathélicidines varie suivant les espèces [Tjabringa *et al.* 2005]. En effet, les peptides de la famille des cathélicidines ont une faible similarité entre les espèces. Cette similarité existe seulement parce que la protéine précurseur contient un domaine cathéline commun [Lai *et al.* 2009].

La structure des cathélicidines varie autant à l'intérieur d'une même espèce qu'entre espèces ; cela est dû à cette très faible homologie au-delà de la partie N-terminale du domaine cathéline. Dans les espèces comme le porc, de multiples gènes codent des peptides ayant une structure linéaire et riche en certains AA comme le tryptophane, la proline ou l'arginine, ou des peptides ayant un pont disulfure et tendant à former des structures en feuillet  $\beta$  ou encore des peptides adoptant une conformation en hélice  $\alpha$ .

Nous allons surtout nous intéresser au peptide synthétisé chez l'Homme, le LL-37, qui est actuellement l'un des PAM les plus étudiés.

### 4.3.2 Le LL-37 : la seule cathélicidine de l'Homme

#### a. Structure, synthèse et maturation

Chez l'Homme, le seul gène codant une cathélicidine est localisé sur le chromosome 3p21, nommé CAMP (*cathelicidin antimicrobial peptide*) [Yang *et al.* 2004]. Ce gène code une protéine précurseur inactive, appelé *human cationic antimicrobial peptide -18* (hCAP18), dont la longueur totale est de 170 AA et le poids moléculaire d'environ 18 kDa [Cowland *et al.* 1995]. Cette protéine contient 2 ponts disulfure entre les résidus cystéines 85-96 et 107-124. Son nom provient, comme nous l'avons vu, de sa capacité à inhiber la protéase cathepsine L [Lai *et al.* 2009].

L'expression de hCAP18 est détectée pour la première fois dans les cellules de la moelle épinière, ainsi que dans les kératinocytes au niveau des sites inflammatoires [Agerberth *et*

*al.* 1995]. La protéine hCAP18 est emmagasinée essentiellement dans les granules des neutrophiles à la concentration moyenne de 40  $\mu\text{M}$  par cellule, mais est aussi produite dans d'autres granules, dans les cellules NK et les mastocytes [Cowland *et al.* 1995]. L'extrémité C-terminale de hCAP18 est formée d'un domaine hautement cationique, contenant le peptide qui porte l'activité antibactérienne [Schroder *et al.* 2006]. Un processus de clivage est essentiel pour l'activation de cette activité antibactérienne *in vivo*, et est réalisé par des sérine-protéases au niveau des kératinocytes comme les kallikréines, ou encore comme la protéase 3 [Sorensen *et al.* 1997; Cole *et al.* 2001]. Cette dernière enzyme a été identifiée comme la principale sérine-protéase responsable du clivage extracellulaire de hCAP-18 excrétée des neutrophiles [Sorensen *et al.* 1997]. Le clivage va alors permettre la libération d'un peptide composé de 37 AA et de 2 résidus leucine au niveau N-terminal, prenant ainsi le nom de LL-37 chez l'Homme [Tjabringa *et al.* 2005].

Le LL-37 a une structure linéaire (figure 19) car ne contient pas de résidu cystéine. Ce peptide adopte des conformations aléatoires en rouleaux dans les environnements hydrophiles et des structures en hélice- $\alpha$  dans les solutions ioniques ayant une composition proche du plasma humain, des fluides intracellulaires ou interstitiels [Lai *et al.* 2009].



**Figure 19 : Structure de la LL-37**

D'après <http://www.rcsb.org>

### **b. Source**

La cathélicidine humaine est produite dans de nombreux types cellulaires, mais se retrouve surtout dans les précurseurs myéloïdes, les neutrophiles, les mastocytes et les monocytes, où le peptide reste emmagasiné dans les granules ; ce peptide est également exprimé dans les entérocytes, les cellules épithéliales du tractus respiratoire et urinaire, et dans les kératinocytes, ainsi que dans les glandes mammaires [Di Nardo *et al.* 2003; Zasloff 2006; Lai *et al.* 2009].

La protéinase 3 dérivée des neutrophiles a été identifiée comme la principale sérine protéinase responsable du clivage extracellulaire de hCAP-18 excrétée des neutrophiles [Sorensen *et al.* 1997].

Des études récentes sur le précurseur hCAP-18 montrent qu'il a été retrouvé en grande concentration dans le liquide séminal, montrant ainsi que cette molécule est également exprimée dans l'épididyme [Tjabringa *et al.* 2005]. Toutefois, certaines de ces études ont démontré que le LL-37 ne serait peut-être pas la seule cathélicidine humaine. En effet, hCAP-18, peut être clivé par une sérine protéase produite par la prostate (la gastricsine) [Sorensen *et al.* 2003]. Le clivage par la gastricsine va engendrer le relargage de ALL-38, un produit alternatif issu de hCAP-18, qui diffère du LL-37 par l'addition d'un résidu alanine en position N-terminale. Les peptides LL-37 et ALL-38 auraient une activité antibactérienne similaire [Tjabringa *et al.* 2005].

### **c. Activités du LL-37**

Le LL-37, une fois mature, est donc libéré de la partie C-terminale de hCAP18. Il a une action rapide, puissante et un large spectre d'activité antibactérien [Zanetti 2004]. Il est particulièrement actif sur *Shigella spp*, *S. aureus*, *E. coli* ou encore *Streptococcus pyogenes* et *agalactiae* [Guani-Guerra *et al.* 2010].

### **4.3.3 Chez les autres espèces**

Chez la vache et le porc, le clivage des cathélicidines en peptides actifs se fait par l'intermédiaire de l'élastase. La grande variabilité du domaine C-terminal entre les membres de la famille des cathélicidines résulte de la grande hétérogénéité des groupes de peptides ainsi que leur grande variété de fonctions. La cathélicidine du porc, le PR-39, est un PAM riche en proline et en arginine, montrant une grande variété d'activité, dans la cicatrisation, l'inflammation, les métastases des tumeurs, ou encore l'angiogenèse. Tout comme l'Homme, la souris ne possède qu'un seul gène codant le précurseur CRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*), dont le peptide issu du clivage protéolytique prend une conformation en hélice  $\alpha$  amphipatique, de la même façon que le LL-37 [Tjabringa *et al.* 2005]. Grâce à des expériences sur les souris ayant une déficience en

CRAMP, des études ont prouvé l'importance des cathélicidines dans l'immunité innée, permettant ainsi une meilleure compréhension du rôle du LL-37 [Tjabringa *et al.* 2005].

#### 4.3.4 Organisation du gène codant la cathélicidine

Le gène de la cathélicidine humaine LL-37 est localisé sur le chromosome 3p21 et se compose de quatre exons et de trois introns (figure 20). Les trois premiers exons codent le peptide signal et le domaine catheline, ayant une forte homologie entre espèces, tandis que le quatrième exon code le peptide mature, variable selon les espèces [Yang *et al.* 2004; Lai *et al.* 2009].

Les séquences d'ADN entre les espèces sont assez similaires jusqu'à l'intron 3, ce qui permet d'affirmer l'existence un gène ancestral commun avec une évolution par brassage génétique [Gilbert *et al.* 1997]. Ainsi, chez le porc, les gènes contenant les peptides protégrines et prophénines sont étroitement liés au gène de PR-39. Les trois polypeptides se situent sur un site homologue au niveau du chromosome 13 du porc [Boman 2003].

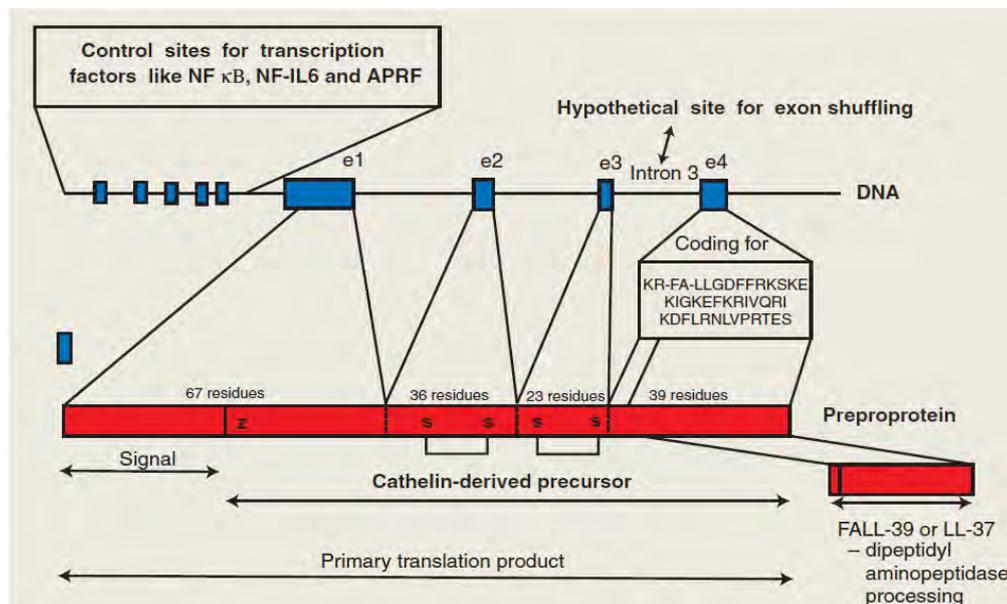


Figure 20 : Arrangement du gène de la cathélicidine humaine LL-37

d'après Boman, 2003

### 4.3.5 Régulation des cathélicidines

La production cellulaire de LL-37 est régulée par de multiples facteurs exogènes comme les infections bactériennes ou l'exposition au soleil... ; et endogènes avec la production de cytokines pro-inflammatoires ou encore la disponibilité en oxygène [Bucki *et al.* 2010]. Ces mécanismes de régulation ne sont pas encore totalement élucidés, mais de nombreux travaux ont permis d'établir le rôle de la vitamine D3 et de la voie de réponse à l'hypoxie au niveau respectivement des kératinocytes et des leucocytes, dans la production de LL-37 [Diamond *et al.* 2009].

La vitamine D3 est produite naturellement au niveau de la peau lors de l'exposition au soleil, et est activée par des hydroxylases CYP27A1 et CYP27B1 (cytochrome P450). Cette activation aboutit à la forme hydroxylée 1,25-dihydroxyvitamine D3 biologiquement active (1,25-vitD3). Cette forme va se fixer sur le récepteur intracellulaire à la vitamine D (VDR) et réguler l'expression des gènes [Nijnik *et al.* 2009]. Le promoteur du gène hCAP18 contient de multiples éléments de réponses pour VDR, et la stimulation de 1,25-vitD3 *ex vivo* améliore l'expression de hCAP18 dans les kératinocytes, monocytes et neutrophiles [Wang *et al.* 2004]. De plus, l'induction de LL-37 par la vitamine D3 active exige en plus de la présence des récepteurs VDR, un récepteur co-activateur aux stéroïdes (SRC3) ainsi que l'acétylation des histones [Schauber *et al.* 2008].

Le facteur inductible de transcription à l'hypoxie (HIF  $\alpha$ ) est un médiateur essentiel de la voie de réponse à l'hypoxie, dans les cellules des mammifères, ayant un rôle crucial dans l'angiogenèse, la tumorigenèse mais aussi dans les réponses immunitaires et inflammatoires [Nijnik *et al.* 2009]. De plus, HIF  $\alpha$  joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la cathélicidine [Bucki *et al.* 2010]. En effet, l'inactivation de HIF  $\alpha$  dans les kératinocytes et les cellules myéloïdes entraîne une diminution significative de la production de cathélicidine. Chez l'Homme, la conséquence est non négligeable au niveau cutané notamment, avec la suppression de l'immunité contre les infections à *Streptococcus pyogenes* [Nijnik *et al.* 2009].

Enfin, les cytokines ont également un effet sur la production de cathélicidines. L'induction de l'expression de hCAP18 dans les kératinocytes requiert l'intervention de l'IGF-I (insuline like growth factor I) et du TGF  $\alpha$  [Schroder *et al.* 2006]. Le gène de la cathélicidine humaine CAMP contient plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription, comme NF- $\kappa$ B, IL-6 et IL-1 induisant l'expression de LL-37.

### RESUME

Comme nous avons pu le constater dans ce chapitre, chaque famille de PAM a des caractéristiques qui lui sont propres. Les magainines se retrouvent essentiellement au niveau de la peau pour une défense optimale des agressions directes de l'extérieur, les défensines ont un rôle important dans les phénomènes inflammatoires, la cathélicidine humaine se distinguant par sa présence dans un large panel de cellules.

Nous aurions pu décrire d'autres familles comme les cécropines ou encore les histatines, mais leur intérêt médical étant plus limité, nous nous sommes concentrés sur ces trois grandes familles.

## **5. Mécanismes d'action et spectres d'activité**

Les PAM possèdent diverses activités, dont la principale est l'élimination de micro-organismes, permettant ainsi la défense de l'organisme hôte. En effet, les PAM sont antibactériens, antiviraux, antifongiques, mais aussi antiparasitaires. Ce document n'a pas pour but de décrire chacun de ces mécanismes, c'est pourquoi nous nous intéresserons en détail à l'activité antibactérienne, et nous décrivons un peu plus succinctement l'activité antivirale. En ce qui concerne les activités antifongiques et antiparasitaires, peu d'études ont été menées et les mécanismes d'action sont encore mal élucidés, c'est pour cette raison que nous n'aborderons pas ces deux items.

## 5.1 Mécanismes d'action et spectre d'activité des PAM antibactériens

*In vitro*, la plupart des PAM sont actifs contre différents types d'organismes, comme les bactéries à Gram positif et négatif, les protozoaires, les champignons filamenteux mais aussi certains virus enveloppés [Zasloff 2002; Powers *et al.* 2003; Lai *et al.* 2009]. Les PAM ont donc un spectre d'activité antimicrobienne très large.

Les caractéristiques de ces peptides déterminant leur action sont la conformation, la charge mais également l'amphiphilie. Présents dans la plupart des tissus, les PAM sont capables de faire la distinction entre la cellule hôte et les agents pathogènes : il y a reconnaissance du soi et du non-soi [Yeaman *et al.* 2003].

### 5.1.1 Caractéristiques des membranes cellulaires

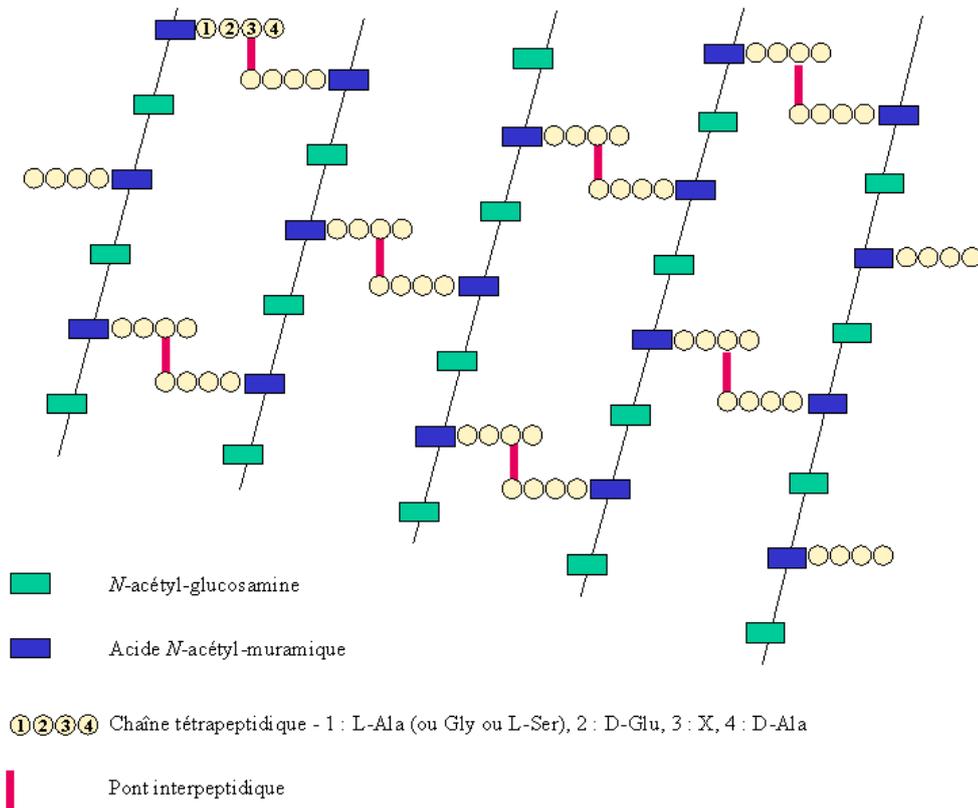
#### a. Les cellules procaryotes

Commençons par un petit rappel sur la structure des parois bactériennes. On définit la paroi comme l'ensemble des structures externes qui entourent la cellule bactérienne à l'exception de la membrane plasmique [[http://stl\\_bjb.ac-dijon.fr](http://stl_bjb.ac-dijon.fr)]. Les bactéries à Gram positif et négatif possèdent toutes une structure commune qui forme un réseau autour de la membrane plasmique : c'est le peptidoglycane.

Comme son nom l'indique, le peptidoglycane est constitué :

- d'une **partie glucidique** : il s'agit d'une alternance de N-Acétyl-Glucosamine (NAG) et d'acide N-Acétyl-Muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques  $\beta$ 1-4.
- et d'une **partie peptidique** : 4 AA qui sont reliés par une liaison amide au niveau du NAM.

Le peptidoglycane est formé par de longues chaînes répétitives montrant une alternance NAG-NAM. Les macromolécules ainsi formées sont réunies au niveau des tétrapeptides pour former une structure solide (figure 21).



**Figure 21 : Structure du peptidoglycane**

D'après <http://www.bacterio.cict.fr>

### i. Paroi des bactéries à Gram positif

Les bactéries à Gram positif (figure 22) contiennent un peptidoglycane pouvant aller jusqu'à 80 nm d'épaisseur, qui constitue 90% de la surface de la paroi. Des acides téchoïques (polymère à base de ribitol et glycérol phosphate) traversent ce peptidoglycane. Certains sont ancrés directement dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une partie lipidique et portent le nom d'acides lipoteichoïques.

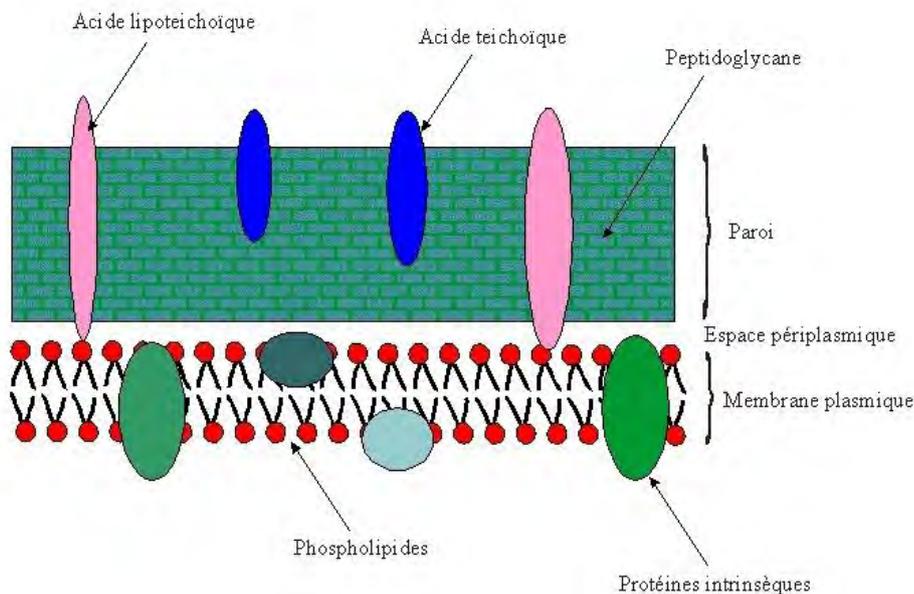


Figure 22 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif

D'après <http://www.ecosociosystemes.fr>

### ii. Paroi des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram négatif se caractérise par un peptidoglycane plus fin (quelques nanomètres), représentant 5 à 20% des constituants, mais possède en plus une membrane externe entourant toute la cellule (figure 23). Cette membrane externe est formée d'une double couche de phospholipides et possède une molécule particulière encastrée dans cette double couche lipidique : le lipopolysaccharide (LPS),

chargé négativement et spécifique aux bactéries à Gram négatif. Le LPS, également porteur d'une activité endotoxine est composé :

- d'une **partie lipidique hydrophobe**, le lipide A, responsable du pouvoir toxique du LPS
- et d'une **partie polysaccharidique**, constituée d'un core (=noyau) lié d'un côté au lipide A et de l'autre à une chaîne polysaccharidique terminale, aussi appelé chaîne O spécifique, responsable de la reconnaissance antigénique et de l'antigénicité.

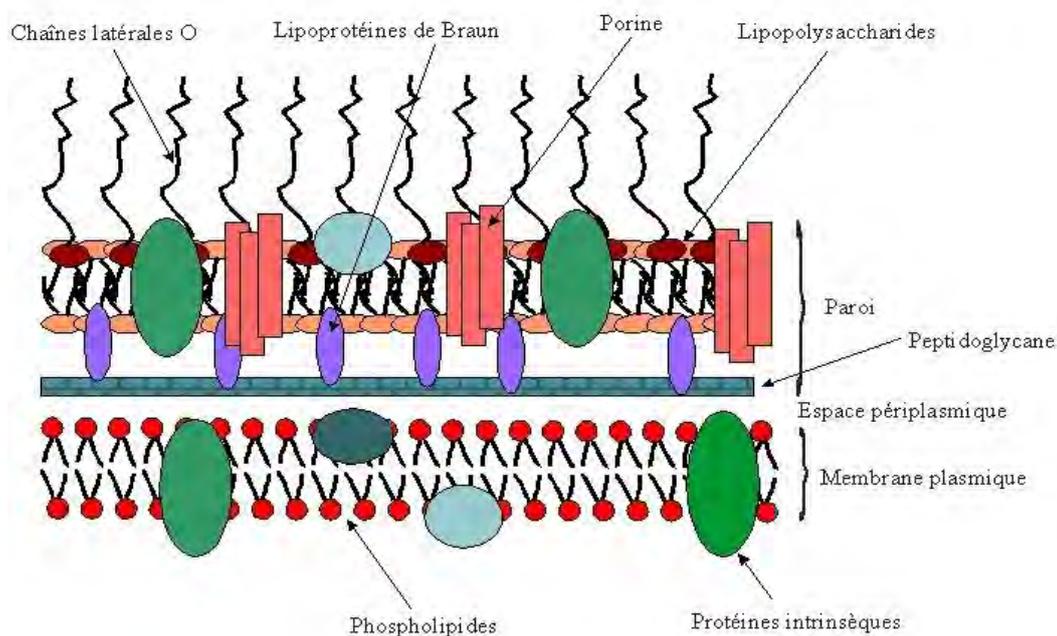


Figure 23 : Description de la paroi des bactéries à Gram négatif

D'après <http://www.ecosociosystemes.fr>

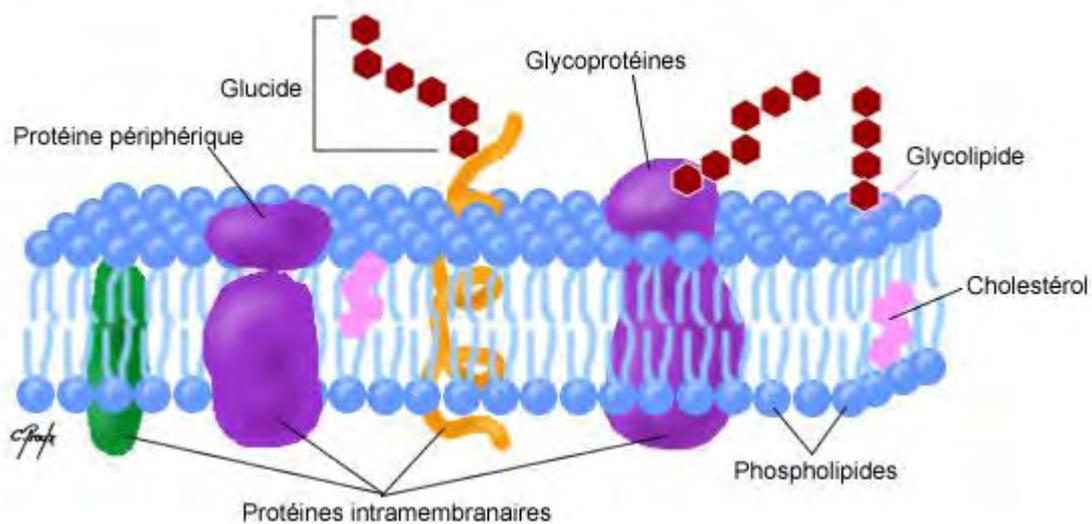
### iii. La membrane plasmique

L'élément essentiel de la membrane plasmique est la double couche lipidique (figure 24) : elle est constituée de phospholipides qui présentent un caractère amphiphile, avec un pôle hydrophile orienté vers l'extérieur et un domaine hydrophobe, orienté vers l'intérieur. Cette répartition des phospholipides entre face externe et interne, et la proportion des

autres composants de celle-ci diffèrent entre les cellules procaryotes et eucaryotes [Yeaman *et al.* 2003].

Chez les procaryotes, on trouve très rarement des stérols induisant cette charge neutre.

Les membranes composées de façon prédominante en phosphatidylglycérol, cardiolipides ou phosphatidylsérine tendent vers une charge de surface très anionique ; ces compositions se retrouvent chez de nombreuses bactéries.



**Figure 24 : Schéma d'une membrane plasmique de bactérie**

D'après <http://www.colvir.net>

### **b. Les cellules eucaryotes**

Les phospholipides formant la membrane des cellules eucaryotes sont distribués de façon asymétrique [Shai 2002]. La membrane est composée de phosphatidylcholine et de sphingomyéline ainsi que de stérols ayant une charge globale neutre [Yeaman *et al.* 2003]. Cette richesse en phospholipides neutres et la présence de cholestérol comme élément stabilisateur entraînent peu d'interactions vis-à-vis des peptides cationiques antibactériens [Andres *et al.* 2007].

Les doubles membranes riches en phospholipides zwitterioniques (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine), présents dans les membranes

cytoplasmiques des mammifères, ont généralement une charge neutre [Yeaman *et al.* 2003].

Ces caractéristiques de charge sont essentielles pour la compréhension des mécanismes d'action des PAM, notamment le fait qu'ils ne s'attaquent pas aux cellules eucaryotes.

### 5.1.2 Caractéristiques et spécificités des PAM

De nombreuses études ont été menées sur la relation entre la structure des PAM et leurs activités antimicrobiennes, mais il existe peu de données sur les bases moléculaires régissant la spécificité propre de chaque peptide [Gennaro *et al.* 2000; Tossi *et al.* 2000; Powers *et al.* 2003]. En effet, chaque peptide a un spectre d'activité distinct. Ainsi, la taille, la charge, la séquence en AA, l'hydrophobicité, l'amphiphilie ou encore le degré de structuration sont des facteurs spécifiques à chaque peptide [Boman *et al.* 1987; Gennaro *et al.* 2000]. La modification d'un de ces paramètres entraîne des changements plus ou moins significatifs de l'activité antimicrobienne mais aussi de l'activité hémolytique de ces PAM, notamment en hélice  $\alpha$  [Dathe *et al.* 2002]. La présence d'une activité hémolytique est un inconvénient majeur pour la notion de bénéfice/risque.

De même, la composition de la surface des micro-organismes est importante, un PAM agissant parfois contre un microorganisme donné [Matsuzaki *et al.* 1995]. En effet, certaines bactéries ont une résistance naturelle à certains PAM. La structure et la composition du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ou la composition du peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont deux propriétés pouvant jouer sur la résistance aux PAM (*voir chapitre 9 sur les mécanismes de résistances*).

#### a. La charge des peptides antimicrobiens

Le caractère cationique des PAM explique leur rapidité d'action et leur affinité pour les membranes anioniques des bactéries : plus la charge est importante, plus les interactions augmentent. Une étude menée sur 2 analogues des magainines démontre ce phénomène. L'augmentation de la charge cationique conduit à une augmentation de l'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif. Cependant, il existe une limite au-delà de laquelle

l'augmentation de la charge positive n'induit plus d'augmentation d'activité. Cela induit au contraire, une diminution de cette activité antibactérienne et une augmentation de l'activité hémolytique [Dathe *et al.* 2001].

### **b. La conformation des peptides**

En milieu neutre, les peptides n'ont pas de structure précise. C'est en se fixant à la membrane bactérienne que les PAM vont prendre des structures spécifiques. Comme nous l'avons vu, plus le peptide est chargé, plus il se fixera aisément.

Chez les insectes et les amphibiens, les structures linéaires en hélice  $\alpha$  sont fréquemment rencontrées. N'étant pas stable dans tous les milieux, le peptide va passer de la forme linéaire à hélicoïdale lorsqu'il se trouve en contact avec la paroi bactérienne [Matsuzaki *et al.* 1991; Bechinger *et al.* 1993].

A l'inverse, les peptides en feuillets  $\beta$ , contenant en plus des ponts disulfure, prennent des conformations beaucoup plus stables, possédant des surfaces hydrophobes et hydrophiles bien distinctes et montrent une interaction plus importante avec la paroi bactérienne.

Les formes cycliques sont plus rigides que les formes linéaires, et ont une efficacité moindre lors de la fixation initiale à la paroi bactérienne ; mais à concentration équivalente, elles présentent la même efficacité de perméabilisation membranaire. Ces conformations rigides cycliques n'étant pas affectées par l'interaction avec la membrane, leur activité peut être liée à une modification de leur structure tertiaire.

Il a été démontré que des peptides ont la capacité de se lier entre eux, en orientant leur domaine hydrophobe et hydrophile de façon à s'assembler. Cette aptitude à se lier est à l'origine de la formation des pores dans les membranes des bactéries, virus et fungi [Yeaman *et al.* 2003].

### **c. Amphiphilie des peptides**

L'ensemble des PAM possèdent des groupements hydrophiles et hydrophobes, formant ainsi une structure amphiphile. L'augmentation de l'amphiphilie, qui peut se faire par l'augmentation du nombre d'hélices, accroît l'activité du peptide sur les membranes

anioniques des micro-organismes, mais augmentent également les interactions avec les membranes neutres des cellules eucaryotes, rendant le peptide plus hémolytique [Yeaman *et al.* 2003].

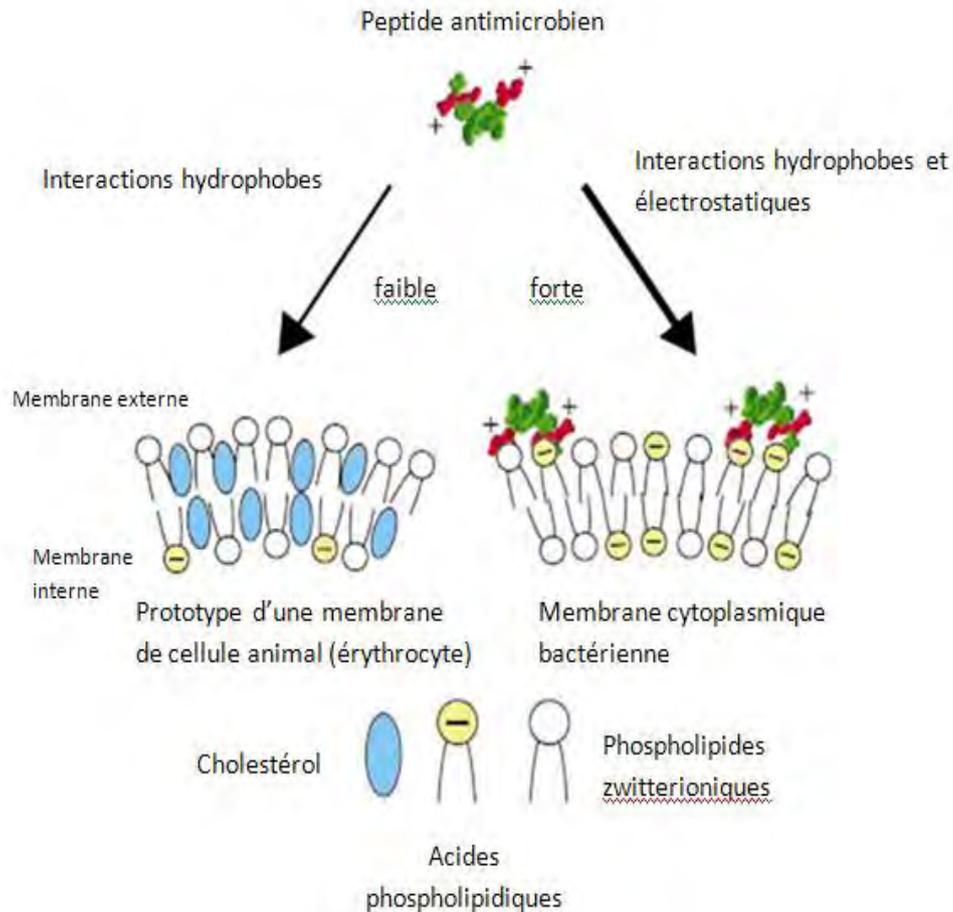
### 5.1.3 Mode d'action des peptides antimicrobiens cationiques

La plupart des PAM cationiques ont une action directe sur la membrane des bactéries, mais certains agissent au niveau intra-cytoplasmique. Le mode d'action des PAM est surtout connu pour les peptides en hélice  $\alpha$ , notamment les magainines et les cécropines, qui ont été beaucoup étudiés [Andres *et al.* 2007]. La composition particulière de la paroi bactérienne et sa charge globale nette négative (*versus* une charge globale neutre pour les cellules eucaryotes) en font une cible idéale pour les PAM [Zaslouff 2002]. Plusieurs modèles de systèmes membranaires ont été étudiés. Les mécanismes par lesquels les peptides perméabilisent et traversent les membranes bactériennes ne sont encore pas complètement élucidés, et varient selon les peptides [Yeaman *et al.* 2003].

Mais pour commencer, nous allons voir le mode d'action général de ces PAM, qui se déroule en plusieurs étapes. Nous détaillerons, à certaines étapes, les différents types de mécanisme qui ont été proposés.

#### a. Attraction

Le mécanisme d'action des peptides dépend en tout premier lieu de l'**interaction** du peptide avec la paroi bactérienne (figure 25). Cette **attraction** initiale se fait par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre le peptide cationique et les phospholipides chargés négativement au niveau de la membrane externe de la bactérie à Gram négatif [Jenssen *et al.* 2006]. Chez les bactéries à Gram positif, l'attraction a lieu entre le PAM et les composants du peptidoglycane. C'est le mode d'attraction supposé pour la plupart des PAM. En effet, de nombreuses études ont démontré une forte corrélation entre la charge du peptide et l'attachement à la membrane [Bessalle *et al.* 1992; Vaz Gomes *et al.* 1993; Dathe *et al.* 2001].



**Figure 25 : Mécanisme d'attraction**

d'après Zasloff, 2002

### ***b. Attachement, fixation à la surface de la bactérie***

Vient ensuite l'étape **d'attachement à la membrane externe** pour les bactéries à Gram négatif ou **au peptidoglycane** pour les bactéries à Gram positif. Cette fixation se fait grâce aux groupements phosphates qui sont situés au niveau :

- du LPS pour les bactéries à Gram négatif
- des acides lipoteichoïques présents à la surface des bactéries à Gram positif.

L'importante proportion de lipides chargés négativement à la surface de la paroi des bactéries permet aux PAM de sélectionner les bactéries et non les cellules de l'hôte.

### **c. Interactions peptide/membrane**

Après fixation, les peptides vont entraîner des perturbations et/ou une modification de la membrane externe ou plasmique ; cela aboutit à une modification de la perméabilité membranaire. Le ou les mécanismes par lesquels les peptides exercent leur action font l'objet de plusieurs hypothèses:

- une privilégiant une action directement à la surface de la bactérie (3 modèles ont été proposés) : modèles de perméabilisation membranaire
- une seconde indiquant une action intracellulaire provoquant la mort de la bactérie (un modèle décrit) : modèle de cible intracellulaire.

#### **i. Les peptides perméabilisant les membranes**

Les contraintes provoquées sur la bicouche lipidique (que ce soit la membrane externe des bactéries à Gram négatif ou la membrane plasmique des bactéries à Gram positif et négatif) entraînent une déstabilisation de la structure, formant ainsi des pores qui engendrent l'osmolyse de la cellule [Brogden 2005].

Il a été montré que les PAM peuvent avoir des états de fixation différents sur la membrane lipidique. En effet, il existe un état de surface, nommé « état S » et un « état I », lors de la formation de pores [Huang 2000].

« L'état S » correspond à un état inactif, où les peptides sont à plat sur la membrane de la bactérie, provoquant ainsi un amincissement de celle-ci [Chen *et al.* 2003]. Les peptides prennent cet état S, avec une orientation parallèle à la membrane lorsqu'il y a un faible ratio peptides/lipides [Yang *et al.* 2001].

Lorsque ce ratio augmente, les peptides vont s'orienter perpendiculairement à la membrane, et s'y insérer : ils vont ainsi former des pores transmembranaires, et sont alors dans un « état I ». Pour créer un pore, il faut l'action simultanée de plusieurs peptides.

Pour comprendre et expliquer la perméabilisation de la membrane par les peptides antimicrobiens, plusieurs modèles ont été proposés [Brogden 2005].

### ➤ **Le modèle « barrel stave »**

Ce terme de « barrel-stave » signifiant douves de tonneau, fut le premier décrit ([figure 26](#)), et explique l'organisation des peptides lors de la perméabilisation des membranes. Dans ce modèle, un nombre variable de canaux sont formés par les peptides qui se positionnent en cercle formant un pore aqueux [Yeaman *et al.* 2003]. Les peptides s'insèrent ainsi dans la bicouche, les « lattes » du tonneau étant constituées de peptides en hélice  $\alpha$  [Ehrenstein *et al.* 1977; Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.* 2003].

Plus précisément, la formation des pores implique plusieurs étapes. En premier lieu, les monomères en hélice  $\alpha$  doivent s'associer à la surface membranaire. Une fois attachés, ces peptides vont subir des changements de conformation, les résidus hydrophobes des hélices vont être en contact avec la partie hydrophobe de la membrane, les résidus hydrophiles des peptides constituant la lumière du pore [Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.* 2003].

Enfin, un recrutement progressif de peptides au niveau de la membrane permet d'agrandir la taille des pores. La translocation des phospholipides et l'agrandissement des pores entraînent le transport des peptides à l'intérieur de la membrane cytoplasmique par le biais du gradient de concentration induit par les peptides liés à la surface. Tout ceci conduit à la fuite du contenu cytoplasmique par le pore ainsi formé et à la mort de la bactérie.

Ce mécanisme d'action a été très étudié pour un peptide : l'alaméthicine [Yeaman *et al.* 2003].

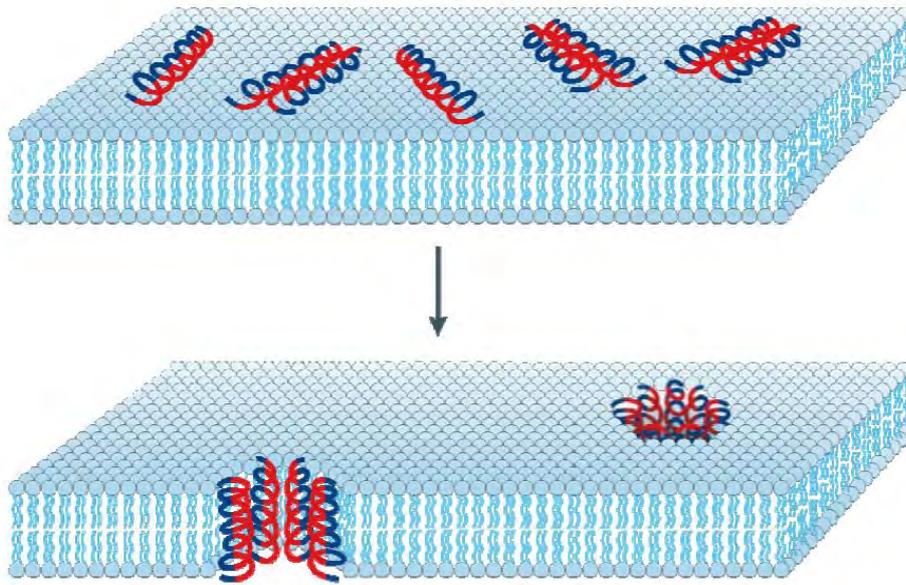


Figure 26 : Modèle en "douve de tonneaux"

d'après Brodgen 2005

➤ **Un second modèle : les pores toroïdaux (ou toroidal-pore)**

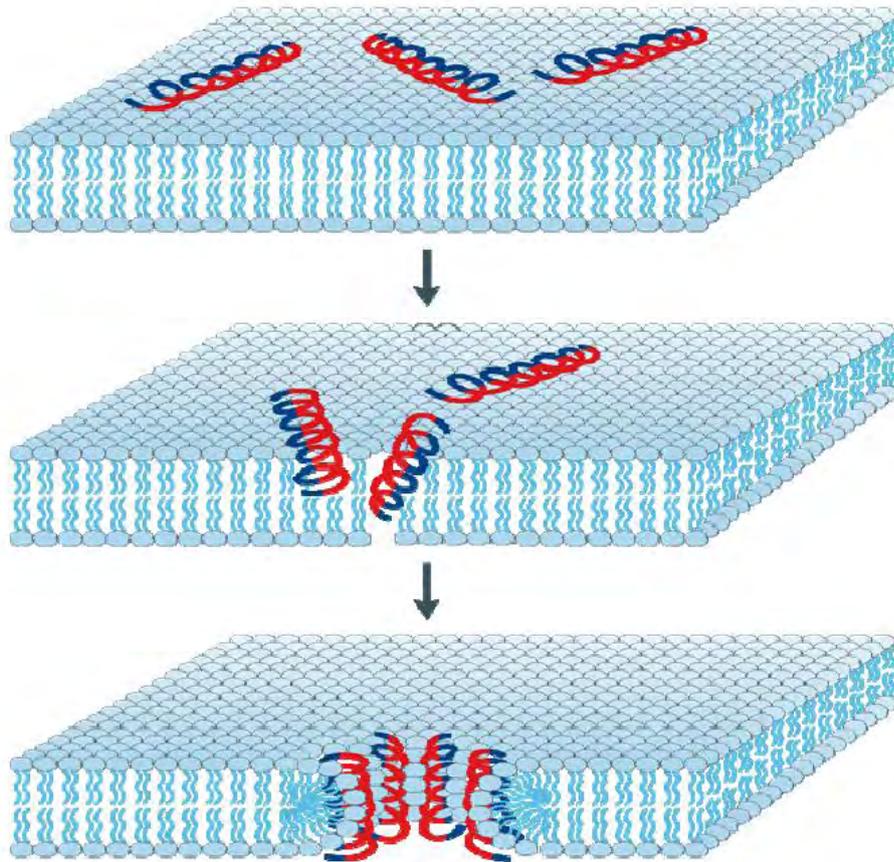
Encore appelé mécanisme de galerie (figure 27), ce modèle ressemble au précédent car les peptides vont également former des pores, induisant la lyse osmotique de la bactérie.

La différence réside dans le fait que les lipides membranaires sont intercalés avec les peptides dans le canal transmembranaire [Yeaman *et al.* 2003; Jenssen *et al.* 2006]. En effet, dans le modèle en douve de tonneaux, il n'y a pas de déformation de la double couche lipidique : les peptides s'insèrent en « forant » la membrane.

Dans le modèle des pores toroïdaux, les peptides vont rester fixés à la tête polaire de la monocouche lipidique, même une fois qu'ils sont insérés perpendiculairement dans la bicouche [Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001]. Grâce à des études par RMN (résonance magnétique nucléaire), dichroïsme circulaire et d'extinction de fluorescence (fluorescence quenching), ce mécanisme a pu être décrit [Hara *et al.* 2001]. Les hélices sont initialement orientées parallèlement à la surface membranaire, puis s'insèrent dans la monocouche extérieure, induisant une distorsion de la membrane. La courbure de cette dernière permet au pore d'être bordé à la fois par la face polaire des peptides et les têtes polaires des lipides membranaires [Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001; Yeaman *et al.*

2003]. Ainsi, l'invagination des lipides entraîne la jonction des deux feuillets lipidiques, formant un trou toroïdal.

Ce type de pores transmembranaires a été étudié et décrit notamment pour les magainines, les protégrines ou encore la méllitine [Matsuzaki *et al.* 1996; Yang *et al.* 2001].



**Figure 27 : Modèle des "pores toroïdaux"**

d'après Brodgen, 2005

➤ **Le modèle « carpet » ou modèle en tapis**

Enfin, un troisième modèle (figure 28) a été décrit pour la première fois concernant le mode d'action de la dermaseptine S [Pouny *et al.* 1992; He *et al.* 1996]. Dans ce modèle, les peptides sont en contact avec les têtes polaires des lipides durant tout le processus de perméabilisation, mais ne s'insèrent à aucun moment dans le cœur hydrophobe de la membrane. En effet, les peptides vont se fixer à haute concentration à la surface de la membrane par des interactions électrostatiques [Shai *et al.* 2001], et vont former un tapis. Fixés sur les phospholipides, les peptides s'organisent et provoquent l'effondrement de la membrane une fois la concentration seuil atteinte, créant ainsi un effet détergent, perforant la membrane, laissant ainsi le contenu cytoplasmique s'échapper [Ehrenstein *et al.* 1977]. Pour que ce mécanisme fonctionne, il est nécessaire que les peptides recouvrent toute la surface de la membrane, et qu'ils se trouvent en concentration efficace pour agir.

Ce modèle diffère des deux précédents pour deux raisons. Premièrement, nous l'avons dit, les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane lipidique comme le modèle en douve de tonneau ou encore le modèle de pores toroïdaux. Deuxièmement, il n'est pas nécessaire que les peptides adoptent une structure en hélice  $\alpha$  dans ce mode d'action.

Ce mécanisme d'action a ensuite été décrit pour la cécropine P1 retrouvée dans l'hémolymphe du papillon de nuit [Gazit *et al.* 1995; Yeaman *et al.* 2003], mais également pour la cathélicidine humaine LL-37 [Oren *et al.* 1999].

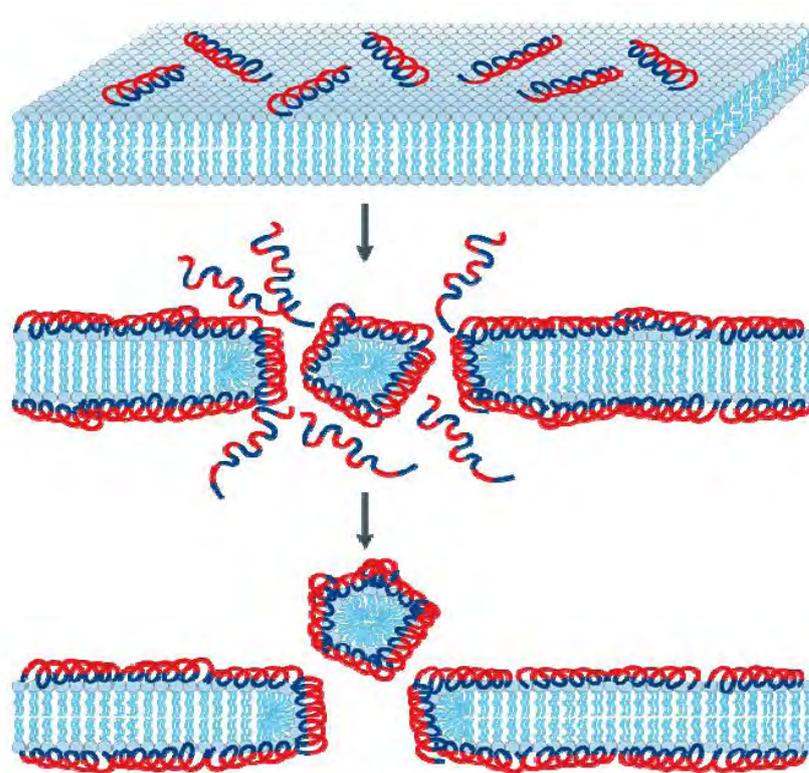
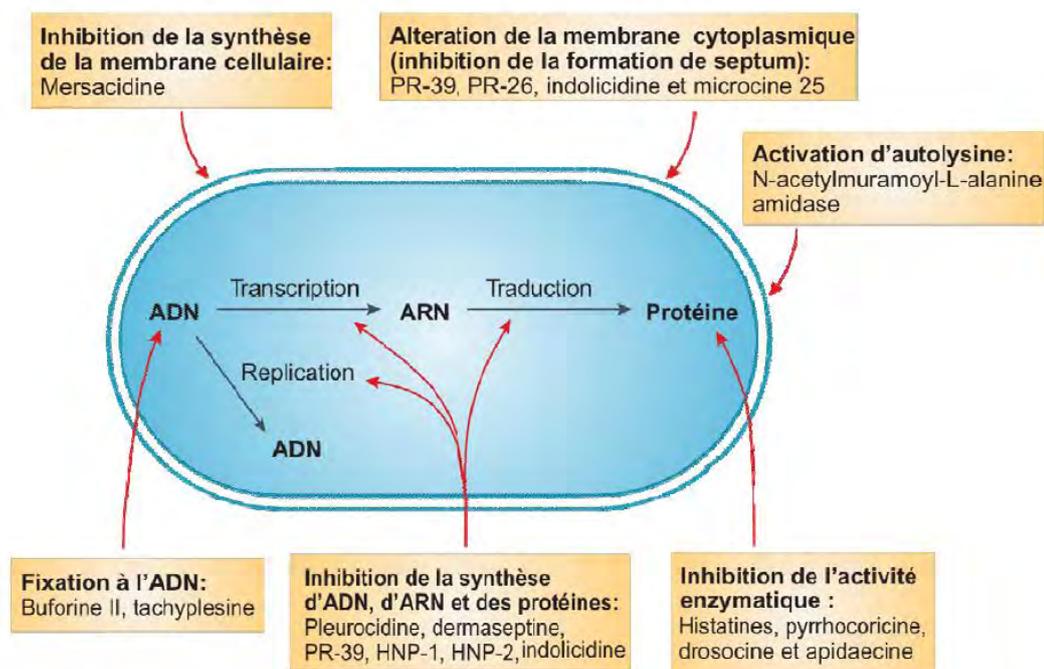


Figure 28 : Modèle en tapis

d'après Brodgen, 2005

## ii. Les peptides agissant au niveau intracellulaire

Les modes d'action les plus connus sont indéniablement les ruptures de membranes et la formation de pores. Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'action, **intracellulaires** cette fois (figure 29). En effet, grâce à des études sur la translocation, il a été montré que des peptides riches en arginine peuvent à la fois être transportés à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, mais également à travers la membrane plasmique, que ce soit pour les bactéries à Gram négatif ou à Gram positif [Powers *et al.* 2003]. Ces peptides passent donc la membrane plasmique, puis interagissent avec l'ADN, l'ARN et/ou des protéines, et peuvent inhiber différentes voies de synthèses [Powers *et al.* 2003; Jenssen *et al.* 2006]. Les histatines agissent, par exemple en inhibant l'activité enzymatique indispensable à la survie de la cellule [Brodgen 2005].



**Figure 29 : Mode d'action intracellulaire des PAM**

d'après Brogden, 2005

#### **d. Les mécanismes de mort cellulaire**

La mort de la bactérie est causée par de multiples défauts provoqués par les peptides au niveau de la membrane. La formation de pores entraîne ainsi la fuite des ions et des métabolites, puis la dépolarisation membranaire, l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, et finit par entraîner la mort de la bactérie [Yeaman *et al.* 2003].

En plus des attaques membranaires, d'autres processus sont mis en jeu pour provoquer la mort de la bactérie.

##### **i. Les dysfonctions membranaires**

La membrane plasmique et la membrane externe sont responsables de nombreuses fonctions essentielles pour la vie de la bactérie, notamment la perméabilité sélective, le maintien du gradient de concentration, la synthèse du peptidoglycane et d'autres polymères. Ainsi, les dysfonctions de la membrane externe et/ou de la membrane

plasmique causés par les PAM interfèrent avec une ou plusieurs de ces fonctions, entraînant la mort directement ou indirectement [Yeaman *et al.* 2003].

Les études portant sur ces mécanismes indiquent qu'en présence de la plupart des peptides, la mort des bactéries est rapide, entre 2 et 3 minutes après un contact avec le peptide [Lehrer *et al.* 1989; Tossi *et al.* 1997]. Cette mort rapide de la bactérie est attribuée à la rapide modification de la perméabilité de la membrane, à la perte en ions et en métabolites, et à l'arrêt de fonctions essentielles comme la respiration [Blondelle *et al.* 1999; Hancock *et al.* 1999].

Pour les bactéries à Gram négatif, les PAM interagissent probablement indépendamment avec la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane plasmique. Par exemple, les défensines humaines peuvent perméabiliser consécutivement les membranes externe et plasmique. L'action dans un premier temps sur la membrane externe puis dans un second temps sur la membrane plasmique entraîne la mort de la bactérie.

Chez les bactéries à Gram positif, il n'existe pas dans la littérature à notre connaissance de données expliquant le passage du PAM dans le peptidoglycane, dont le maillage est beaucoup plus épais et serré que chez les bactéries à Gram négatif, mais le résultat obtenu est le même : la mort de la bactérie.

Toutefois, il apparaît que la seule perturbation de la membrane n'est pas suffisante pour entraîner la mort de la bactérie par les PAM. En effet une étude a montré que la perméabilisation de la paroi par les PAM ne peut tuer, à elle seule les Staphylocoques [Yeaman *et al.* 2003].

L'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et d'autres macromolécules est un important mécanisme d'action des PAM. Les précurseurs du peptidoglycane sont activés et transportés à travers la membrane plasmique. Les PAM peuvent donc perturber la synthèse du peptidoglycane mais aussi sa translocation, ou encore son organisation (création de liaisons intermoléculaires). Les bactéries à Gram positif sont donc particulièrement sensibles à ce mode d'action [Yeaman *et al.* 2003].

## **ii. Inhibition des fonctions intracellulaires.**

De nombreux peptides n'agissent pas par perméabilisation des membranes. En effet, ces peptides subissent une translocation à l'intérieur du cytoplasme des bactéries, et s'y

accumulent, induisant l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, des protéines, et des certaines activités enzymatiques, empêchant la bactérie de produire les éléments essentiels à sa survie [Jenssen *et al.* 2006].

Le **tableau IV** fait un rapide récapitulatif des différents modes d'action.

**Tableau IV : Récapitulatif des différents modes d'action antimicrobiens**

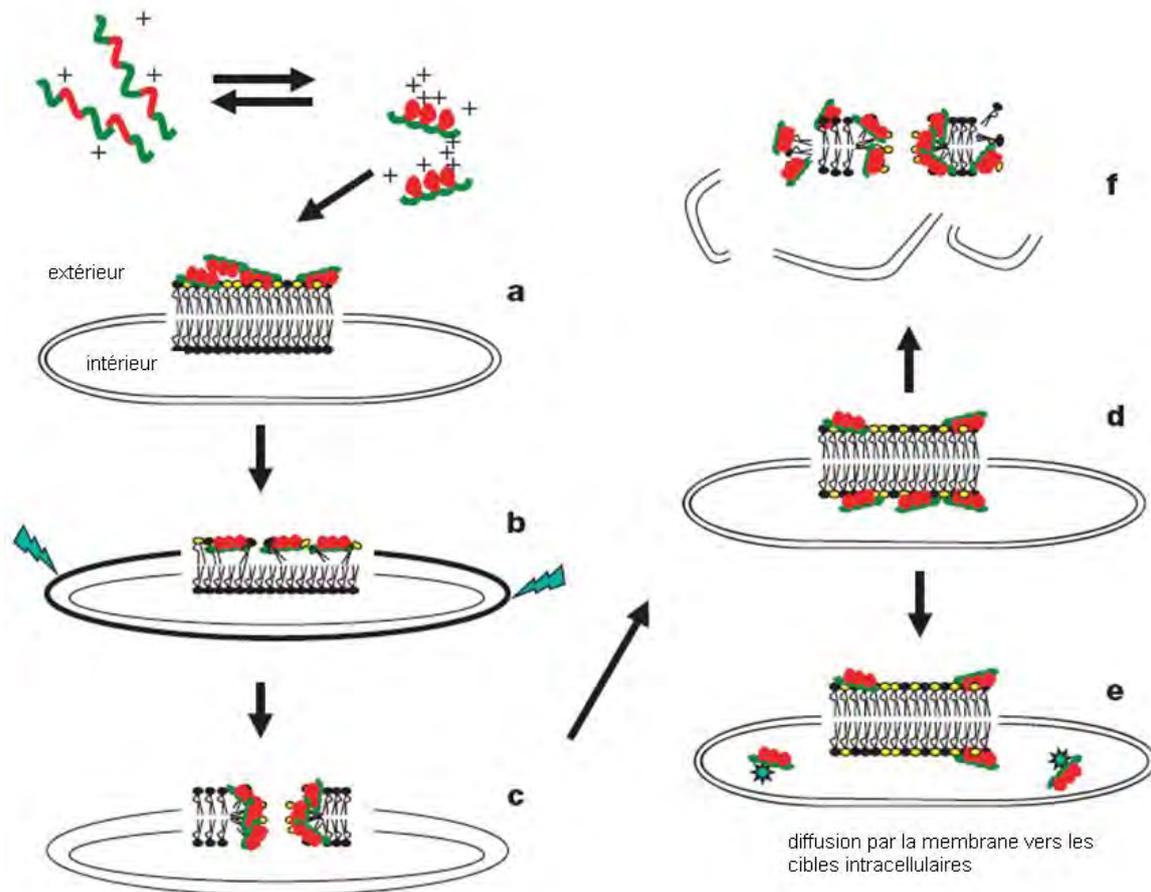
d'après Brodgen, 2005

<b>Modèle d'activité antimicrobienne</b>	<b>Exemples</b>
<b>Mécanismes formant des pores transmembranaires</b>	
modèle des pores torroïdaux	maginine-2, protegrin-1, mellitine, LL-37, MSI-78
modèle en tapis	dermaseptine S, cécropine, mellitine, ovispirin, caerine 1.1
modèle en douves de tonneau	alamethicine
<b>Mécanismes à cibles intracellulaires</b>	
altération de la membrane plasmique	PR-39, PR-26, indolicidine, micromicine 25
inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	mersacidine
inhibition de la synthèse des protéines	pleurocidine, dermaseptine, PR-39, HNP-1 et -2, indolicidine
inhibition de la synthèse des acides nucléiques	pleurocidine, dermaseptine, PR-39, HNP-1 et -2, indolicidine
inhibition de l'activité enzymatique	histatine, pyrrocoricine, drosocine, apidaecine
floculation des composants intracellulaires	peptides anioniques

### **e. Autres approches**

Le mode d'action des PAM sur les bactéries a donc fait l'objet de nombreuses études, conduisant à plusieurs propositions de modèles [Brodgen 2005]. Toutefois, il est probable que tous ces modes d'action soient liés. Ainsi, il a été suggéré que les canaux ioniques, les pores membranaires, mais plus généralement la rupture de la membrane n'indiquent pas trois modèles distincts, mais qu'ils évoluent les uns après les autres [Dathe *et al.* 1999].

C'est en ce sens que Shai-Matsuzaki et Huang ont proposé un modèle regroupant les hypothèses émises jusqu'à présent sur le mécanisme d'action des PAM cationiques [Zasloff 2002].



**Figure 30 : Modèle proposé par Shai-Matsuzaki-Huang**

d'après Zasloff, 2002

Ce modèle a été démontré pour un peptide en hélice  $\alpha$  (figure 30).

- Les peptides chargés positivement sont attirés par des forces électrostatiques aux phospholipides chargés négativement, formant ainsi un tapis sur la membrane bactérienne.
- Cela engendre une interaction des peptides avec la membrane, et provoque des contraintes au niveau de la bicouche, provoquant sa micellisation.
- La déstabilisation de la membrane induite par les peptides conduit ensuite à la formation de pores, ayant pour conséquence la fuite des composants intracellulaires.

- d. L'hypothèse de ce modèle est que si le mécanisme précédent ne suffit pas à entraîner la mort de la bactérie, il y a déplacement des peptides et des lipides au niveau de la bicouche lipidique, provoquant l'une ou l'autre des réactions suivantes :
- e. Soit la diffusion du peptide jusqu'à des cibles intracellulaires ;
- f. Soit la désorganisation générale de la membrane, conduisant à sa désintégration et à la formation de fragments de décomposition [Zaslouff 2002].

Enfin, un modèle a été proposé plus récemment, à partir de peptides courts synthétiques, grâce à une simulation informatique (figure 31). Dans ce mécanisme, la membrane est rendue perméable sans entraîner sa destruction. Une fois insérés dans l'épaisseur de la membrane, les peptides amphiphiles restent fixés aux têtes polaires des phospholipides. Au delà d'une certaine concentration en peptides au sein de la membrane, les molécules d'eau et autres éléments hydratés présents dans le milieu extérieur traversent cette membrane en passant de peptide en peptide, passant d'un domaine hydrophile à un autre. Cela entraîne une dilution des éléments cytoplasmiques, augmente la pression à l'intérieur de la bactérie et engendre son « explosion » [Lopez *et al.* 2006].

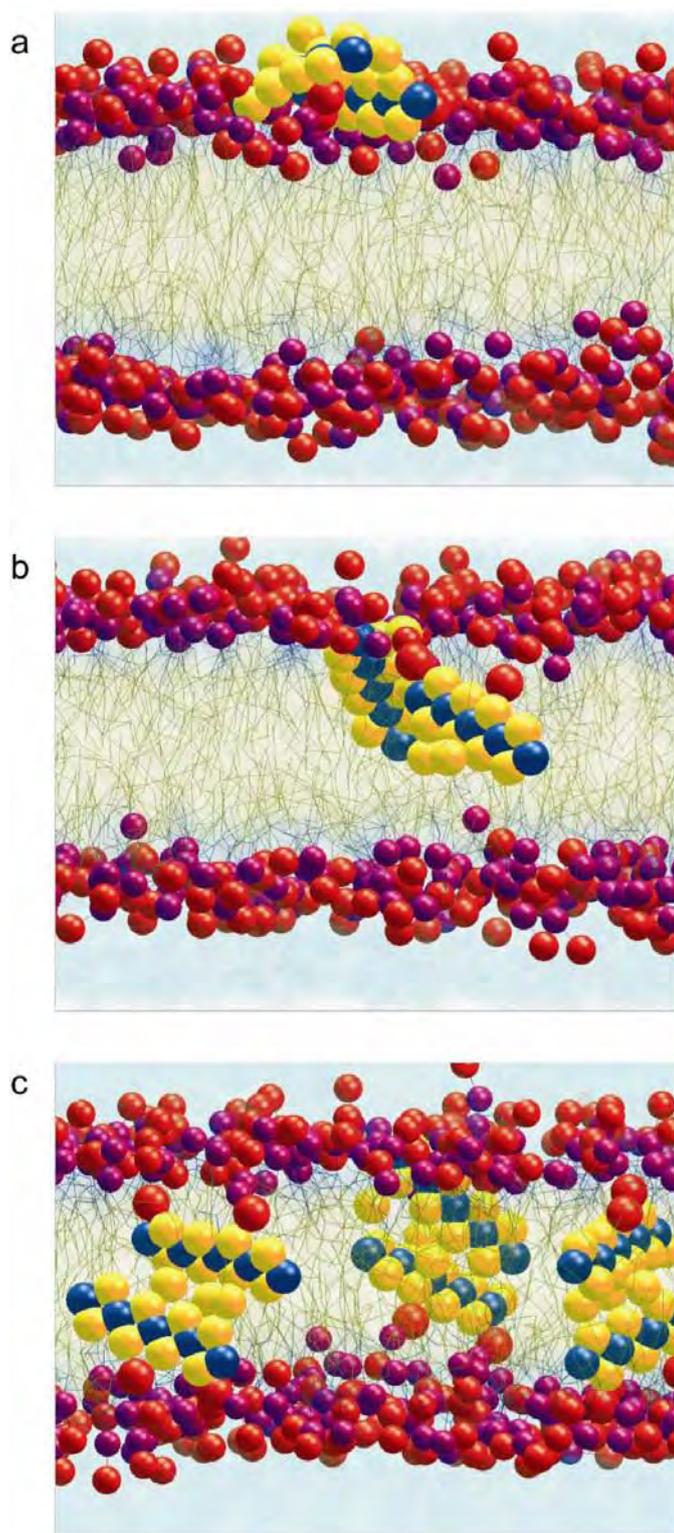


Figure 31 : Mécanisme hypothétique d'apprêtement et de pénétration d'un PAM  
d'après Lopez *et al.* 2006

### 5.1.4 Spectre d'activité antibactérien des peptides cationiques

La plupart des PAM sont actifs sur de nombreuses espèces de bactéries, notamment les souches pathogènes pour l'Homme [Andres *et al.* 2007]. Ainsi, la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont sensibles à l'action des PAM. Voici quelques exemples, la liste n'est pas exhaustive (tableau V).

**Tableau V : Spectre d'action des défensines envers les bactéries**

d'après Jonard *et al.* 2006

Micro-organismes	Exemples de défensines actives
<b>Bactéries Gram+</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	HNP-1, HD-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	HNP-1, HBD-3, HBD-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HNP-1
<i>Streptococcus mutans</i>	HBD-2, HBD-3
<i>Streptococcus sanguis</i>	HBD-2, HBD-3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	HBD-1, HBD-2, HBD-3
<b>Bactéries Gram-</b>	
<i>Escherichia coli</i>	HNP-1 à 4, HD-5, HBD-1 à 3
<i>Proteus mirabilis</i>	HNP-1
<i>Proteus vulgaris</i>	HNP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HNP-1, HBD-2 à 4
<i>Salmonella typhimurium</i>	HNP-1, HD-5
<i>Helicobacter pylori</i>	HBD-2
<i>Campylobacter jejuni</i>	HBD-1 à 3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	HBD-2, HBD-3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	HBD-2, HBD-3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	HBD-1, HBD-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HBD-2, HBD-3
<i>Chlamydia trachomatis</i>	HD-5, HNP-1 à 3
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HD-5, HNP-1 à 3

Chez le porc, l'expression de PR-39 est utile pour la lutte contre les infections à Streptocoques du Groupe A (*Streptococcus pyogenes*) [Zaiou 2007].

Le peptide plectasin, appartenant à la famille des défensines, possède une activité contre *Streptococcus pneumoniae*, dont les souches résistantes aux antibiotiques conventionnels, comme les pénicillines ou les macrolides [Mygind *et al.* 2005].

Les défensines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\theta$  sont bactéricides à des concentrations de l'ordre de 0,5 à 5  $\mu\text{M}$  [Selsted *et al.* 2005]. La  $\beta$ -défensine HBD-2 a une action contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, ou encore *Klebsiella pneumoniae* [Jonard *et al.* 2006].

La cathélicidine humaine LL-37 est active sur les *Streptococcus pyogenes* et *agalactiae*, sur *Staphylococcus aureus* et également sur *E. coli* [Guani-Guerra *et al.* 2010].

Ainsi, il est difficile de faire une liste exhaustive : chaque PAM a un spectre d'activité qui lui est propre. Par exemple, on sait que le LPS de *P. aeruginosa* possède plus de groupements phosphate que d'autres LPS, sa charge négative est donc plus importante. Nous pourrions alors nous poser la question de savoir si les PAM sont plus efficaces sur cette bactérie, du fait d'une interaction plus forte. Cette sélectivité est également valable pour les antibiotiques. En effet, certaines  $\beta$ -lactamines sont moins efficaces sur certaines entérobactéries car ces dernières ont une composition de la paroi légèrement différente au niveau du LPS ou des protéines.

## 5.2 Mécanismes d'action antivirales et spectre d'activité antiviral

### 5.2.1 Spectre d'activité des peptides

Les principaux virus affectant les mammifères sont des virus nus à ADN ou ARN, comme le virus de la grippe (famille des *Orthomyxoviridae*), ou encore le VIH (famille des *Retroviridae*), et certains PAM sont capables de lutter contre ces pathogènes. Une activité antivirale a été démontrée sur les virus suivants : les adénovirus [Bastian *et al.* 2001; Horne *et al.* 2005], les calicivirus des félins et des Hommes [McCann *et al.* 2003] et l'échovirus 6 [Pietrantoni *et al.* 2006]. Les défensines humaines seraient ainsi impliquées dans la lutte contre les adénovirus présents au niveau pulmonaire lors de pneumopathies [Bastian *et al.* 2001]. L'activité antivirale des PAM se fait par adsorption sur le virus ou par une activité directe sur l'enveloppe du virus [Robinson *et al.* 1998].

L'activité antivirale dépend beaucoup du PAM considéré (tableau VI). Par exemple, les **peptides en hélice  $\alpha$**  comme les cécropines, les clavanins ou la cathélicidine LL-37 ont une activité minime voire nulle sur l'inactivation du virus *Herpes simplex* (HSV) [Ourth *et*

*al.* 1994; Yasin *et al.* 2000; Benincasa *et al.* 2003], tandis que les magainines, la dermaseptine ou la mélittine qui ont également une structure en hélice  $\alpha$  présentent une activité puissante contre le HSV mais également contre le VIH [Aboudy *et al.* 1994; Belaid *et al.* 2002; Albiol Matanic *et al.* 2004].

Les **peptides ayant un feuillet  $\beta$**  comme les défensines ou les protégrines ont démontré une activité importante sur le HSV [Lehrer *et al.* 1985; Daher *et al.* 1986; Andersen *et al.* 2003; Jenssen *et al.* 2004].

Il faut noter que l'activité antivirale varie énormément au sein même d'une classe de PAM. Par exemple, des analogues des protégrines possédant un ou deux ponts disulfure en moins, passent de très actifs à complètement inactifs contre les infections à HSV [Yasin *et al.* 2000].

Tableau VI : Spectre d'activité antivirale des PAM

d'après Jenssen *et al.* 2006

Peptides	Structure	Source(s)	Virus	Mécanisme antiviral proposé
Magainines	hélice $\alpha$	Grenouilles	HSV VIH	cible cellulaire suppression expression du gène viral
Cécropines	hélice $\alpha$	Insectes	virus Junin HSV VIH	suppression synthèse protéine virale cible cellulaire suppression expression du gène viral
Mellitine	hélice $\alpha$	Abeilles	virus Junin HSV	cible cellulaire cible cellulaire
LL-37	hélice $\alpha$	Hommes	HSV	faible inactivation virale
Brevinine-1	hélice $\alpha$	Grenouilles	HSV	inactivation virale
$\theta$ -défensine	feuillet cyclique $\beta$	Primates, Hommes	VIH HSV	<i>binds glycosylated gp120</i> <i>binds gB and blocks viral attachment</i>
Défensines	feuillet $\beta$	Hommes, Lapins	HSV  IAV HCMV VSV VIH Adenovirus	interaction avec la membrane (glycoprotéine) du HSV et la cible cellulaire, mais pas héparane sulfate  inactivation de la particule virale inactivation de la particule virale inactivation de la particule virale cible cellulaire inconnu
Dermaseptine	feuillet $\beta$	Grenouilles	VIH HSV	destruction de la membrane virale activité au niveau de l'interface virus cellule
Tachyplesine	feuillet $\beta$	Crabe fer à cheval	VIH HSV VSV IAV	fusion cellule-virus  inactivation virale enveloppe virale enveloppe virale
Protegrine	feuillet $\beta$	Hommes, porcs	VIH HSV	inconnu inactivation virale
Polyphemusine	feuillet $\beta$	Crabe fer à cheval	VIH	<i>binds gp120 et CD4</i>
Lactoferricine	coude $\beta$	Bovins, Hommes	HCMV VIH HSV Papillomavirus	activité au niveau de l'interface virus-cellule  inconnu <i>bloque l'héparane sulfate, mais un effet secondaire est indiqué</i> activité au niveau de l'interface virus-cellule
Indolicidine	forme étendue	Bovins	VIH HSV	inhibition de l'intégrase cible membrane virale/glycoprotéine

### 5.2.2 Relation structure-activité des PAM antiviraux

De nombreux analogues de PAM sont synthétisés dans le but de comprendre l'importance des relations structure-activité.

#### ➤ **Hydrophobie**

Le caractère hydrophobe a été testé sur des peptides hybrides de cécropine A et de magainine-2, et la substitution d'AA a été étudiée sur les  $\theta$ -défensines. Il a été démontré que la substitution d'une serine par un AA hydrophobe comme la valine, la phénylalanine ou le tryptophane provoquait une augmentation importante de l'activité antivirale [Lee *et al.* 2004].

#### ➤ **Charges**

Il semble que la position spatiale des AA chargés soit plus importante que la charge nette réelle [Jenssen *et al.* 2004].

#### ➤ **Structure secondaire**

De nombreuses études sur l'influence de la structure secondaire sur l'activité anti-HSV ont démontré que l'hélice  $\alpha$  du peptide n'est pas responsable de l'activité antivirale, mais que la présentation des résidus chargés est d'une importance cruciale [Jenssen *et al.* 2004].

Une étude menée sur des peptides dérivés des lactoferricines bovines conclut que la présence de résidus hydrophobes et chargés positivement est un critère nécessaire mais pas suffisant pour avoir une activité antivirale, et que ce sont les différentes conformations adoptées par les peptides qui détermine cette activité [Giansanti *et al.* 2005].

Malheureusement il est impossible de prédire l'activité antivirale en se basant uniquement sur la structure secondaire des peptides, compte-tenu de nos connaissances actuelles.

### 5.2.3 Mode d'action des peptides antiviraux

Il existe plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'action des PAM pour leur activité antivirale. Nous allons décrire brièvement les plus marquantes dans les paragraphes suivants.

### **a. Blocage de l'entrée du virus**

Tout d'abord, l'entrée du virus dans la cellule peut être bloquée par une interaction avec l'héparane sulfate (ou sulfate d'héparane). Ces glycosaminoglycanes (GAG) ou plus précisément ces protéoglycanes sont des molécules polysaccharidiques retrouvées dans de nombreux types de tissus, dans la matrice extracellulaire mais également à la surface des cellules. L'héparane sulfate est l'un des composés les plus anioniques présent à la surface des cellules mammifères. Cette charge négative lui permet de se lier aux petits cations, aux protéines, lipoprotéines mais aussi à certains virus. Ainsi, bloquer de l'héparane sulfate peut réduire l'infectivité. Les charges positives des PAM interagissent avec les charges négatives de l'héparane sulfate situé à la surface des cellules, les « protégeant » ainsi d'une invasion par un virus. Ainsi, il a été notamment montré que la lactoferricine est capable de bloquer une infection par HSV, et que ce PAM a également une activité antivirale contre le CMV, le Papillomavirus, ainsi que le VIH [Jenssen *et al.* 2006].

De plus, les PAM pourraient interagir directement avec les récepteurs spécifiques de la cellule hôte pour le virus. Le PAM se lierait au récepteur en question, empêchant la fixation du virus à la cellule, bloquant donc son entrée.

Enfin, une hypothèse a été proposée, expliquant que le processus d'entrée du virus dans la cellule peut être influencé par des interactions entre le PAM et les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Une étude parle de l'interaction d'une défensine sur le HSV au niveau de la glycoprotéine B, empêchant ainsi la fixation du virus sur la cellule hôte. Le PAM agirait donc comme une lectine [Jenssen *et al.* 2006].

### **b. Blocage de la propagation du virus**

Les PAM antiviraux sont capables de bloquer la propagation du virus d'une cellule à une cellule voisine par des « tight junctions ». C'est notamment le cas pour les peptides en hélice  $\alpha$  concernant la propagation du HSV, ainsi que la lactoferricine bovine [Jenssen *et al.* 2006].

### ***c. L'interaction directe avec l'enveloppe virale.***

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les PAM antibactériens, les PAM sont capables d'interagir avec les membranes lipidiques, entraînant leur déstabilisation et la formation de pores. Il est donc vraisemblable que l'enveloppe des virus soit une cible potentielle pour une interaction directe, dont le médiateur cellulaire n'a pas encore été identifié. Ainsi, la dermaseptine et l'indolicidine ont démontré qu'elles exercent une activité anti-VIH avant l'entrée du virus dans la cellule, grâce à une interaction directe avec la particule virale [Jenssen *et al.* 2006].

### ***d. Les cibles intracellulaires***

Nous savons que certains PAM sont constitutivement localisées dans les vacuoles des cellules hôtes. De ce fait, il est probable que lors de la réplication du virus dans la cellule, les PAM présents seraient en mesure de bloquer l'expression des gènes viraux, ou la synthèse de protéines virales ou encore d'activer des mécanismes antiviraux de la cellule hôte [Jenssen *et al.* 2006].

## RESUME

Les mécanismes d'action des PAM antibactériens ont été les plus étudiés, et plusieurs modèles ont été proposés :

- les PAM perméabilisant les membranes avec :
  - o le modèle en douves de tonneau
  - o le modèle des pores toroïdaux
  - o les modèles en tapis
- les PAM agissant au niveau intracellulaire
- les PAM ayant les deux fonctions précédentes.

Concernant les mécanismes d'action antiviraux, de nombreuses hypothèses ont été émises, mais actuellement peu d'études les explicitent.

## **6. Rôle des PAM dans diverses maladies**

Dans ce chapitre, nous n'évoquerons que brièvement les différentes maladies dans lesquelles les PAM sont impliqués, sans entrer dans le détail des processus. Les PAM sont impliqués dans des maladies complexes, comme la parodontite, le processus d'athérosclérose ou encore les cancers, mais les mécanismes sont encore mal élucidés [Zaiou 2007]. Nous parlerons ici de l'action des PAM au niveau pulmonaire, cutané et digestif, en ciblant une voire deux maladies à chaque fois.

## 6.1 Au niveau pulmonaire

Les infections respiratoires sont une cause majeure de morbidité, notamment chez les prématurés et les patients souffrant de mucoviscidose. Cette pathologie se caractérise par une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies respiratoires et digestives. Elle est due à une mutation génétique (maladie autosomique récessive) d'un gène sur le chromosome 7. Cliniquement, les atteintes respiratoires sont responsables de la morbi-mortalité : c'est une inflammation pulmonaire chronique avec surinfection bactérienne qui se développe dans ce mucus.

Benincasa et collaborateurs ont mené une étude sur des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont étudié l'effet des polysaccharides produits par des bactéries à tropisme pulmonaire, comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sur l'activité antibactérienne de la cathélicidine humaine (LL-37) et la  $\beta$ -défensine humaine hBD-3. Les résultats ont confirmé le rôle important des PAM dans la protection du tractus respiratoire vis-à-vis de ces bactéries [Benincasa *et al.* 2009]. En effet, les PAM sont sécrétés dans les voies respiratoires et contribuent à la première ligne de défense contre les pathogènes inhalés. L'épithélium pulmonaire réagit lors d'une agression bactérienne, par la production de défensines en très grandes concentrations [Jonard *et al.* 2006]. Dans une autre étude menée chez des patients atteints de mucoviscidose, il a été démontré que les défensines synthétisées par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires perdraient leur activité antimicrobienne à cause de fortes concentrations salines. C'est ce qui provoque les surinfections bactériennes, les défensines étant incapables de jouer leur rôle sur les bactéries [Goldman *et al.* 1997].

## 6.2 Au niveau cutané

Les PAM agissent aussi au niveau cutané, en protégeant la peau des infections bactériennes et de l'inflammation [Schroder *et al.* 2006]. Par analogie avec le tractus respiratoire, les PAM sont produits au niveau de la peau par les cellules épithéliales principalement, ainsi que les fibroblastes [Selsted *et al.* 2005]. Les  $\beta$ -défensines sont produites par des kératinocytes et sont présentes constitutivement ou excrétées suite à la présence d'un micro-organisme [Jonard *et al.* 2006].

Chez les grands brûlés, le principal risque est l'infection. Il existe des greffes de peau ainsi que des substituts cutanés, mais n'étant pas vascularisés, ils sont très sensibles aux infections bactériennes. Les PAM, et notamment les défensines, jouent un rôle crucial dans la protection du greffon, même si la concentration en PAM n'est pas suffisante pour éradiquer les bactéries à elle seule [Supp *et al.* 2004].

Le déficit en PAM, observés chez les patients atteints d'eczéma atopique, serait à l'origine d'infections chroniques à *Staphylococcus aureus* [Ong *et al.* 2002]. A l'inverse, une surexpression de ces PAM surprotège contre les infections cutanées ; ainsi, les patients atteints de psoriasis, maladie auto-immune, présentent rarement des infections liées à la peau [Schroder *et al.* 2006].

## 6.3 Au niveau digestif

Les peptides ont une importance aussi au niveau de la sphère digestive. Prenons l'exemple de la maladie de Crohn. Cette pathologie inflammatoire touche tout le tractus intestinal de façon chronique et se caractérise par de multiples infections bactériennes difficiles à traiter. Chez les patients atteints de cette maladie, il a été observé une concentration inférieure à celles observées chez les patients sains en défensines hBD-2 et hBD-3. De même, l'expression déficiente des  $\alpha$ -défensines HD-5 et HD-6 dans les cellules de Paneth expliquerait aussi cette maladie [Guani-Guerra *et al.* 2010].

### RESUME

Les PAM sont impliqués dans de nombreuses maladies, par leur déficit mais aussi par leur surexpression. Ainsi, des maladies complexes comme la maladie de Crohn, la parodontite, l'athérosclérose, mais aussi certains cancers mettent en jeu des mécanismes jusqu'à présents mal connus faisant intervenir les PAM. Leur présence est le plus souvent indispensable, les PAM jouent un rôle protecteur contre les infections bactériennes, notamment dans la mucoviscidose, la maladie de Crohn, ou encore dans la protection du greffon de peau chez les grands brûlés.

L'homéostasie du corps humain tient parfois à de toutes petites molécules...

## **7. Rôle des PAM dans l'immunité innée et adaptative**

## 7.1 Quelques rappels sur l'immunité

Le système immunitaire présent chez les animaux, possède deux fonctions majeures. La première est la fonction de surveillance, permettant la reconnaissance du « soi » et du « non-soi ». La seconde, liée à la première, est la fonction de défense, qui permet d'éliminer les pathogènes.

Le système immunitaire des vertébrés est constitué de deux piliers :

- L'immunité innée
- L'immunité spécifique ou adaptative.

### 7.1.1 L'immunité innée

Tout d'abord, commençons par l'immunité innée. En premier lieu, elle fait appel aux barrières physico-chimiques, comme la coquille, le squelette externe ou le mucus chez les invertébrés, et à la peau et aux muqueuses chez les vertébrés. Elle est également constituée de molécules présentes dans le corps notamment chez les vertébrés, de manière spontanée donc avant toute première rencontre avec un agent pathogène : ce sont les polynucléaires, les macrophages responsable de la phagocytose. La reconnaissance se fait par la présence de récepteurs spécifiques, comme les récepteurs Toll-like (TLR). L'attachement du ligand sur ces récepteurs entraîne une cascade de réactions complexes (appelée voie TLR), conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires [Leulier 2003].

Le système immunitaire inné se déclenche face à une menace, en distinguant les éléments du soi et du non-soi. Ces derniers sont reconnus comme étrangers, entraînant une réponse rapide par un mécanisme non spécifique. C'est la réponse inflammatoire, première ligne de défense de l'organisme. La réponse est dite non-adaptative, car elle fait appel à des récepteurs invariants, ayant une capacité de reconnaissance limitée. En effet, les récepteurs sont capables de reconnaître des motifs communs aux micro-organismes comme par exemple, le LPS des bactéries à Gram négatif ou les acides lipotéichoïques des bactéries à Gram positif [Medzhitov *et al.* 2000].

Ce mécanisme de réponse immunitaire innée n'entraîne pas un phénomène de mémorisation de l'agression, et n'est pas dépendant d'un antigène.

### 7.1.2 L'immunité adaptative

La réponse adaptative met en jeu quant à elle les lymphocytes B et T, et ne se retrouve que chez les vertébrés. Les lymphocytes B et T vont sélectionner des clones capables de cibler les éléments du non-soi. En effet, chaque lymphocyte porte un récepteur lui permettant d'identifier un motif chimique. L'ensemble de ces récepteurs définit ainsi un répertoire immunologique pour un organisme. La réponse adaptative est donc une immunité spécifique, dépendante des anticorps et possédant une cinétique d'action lente, mais douée de mémoire. Ainsi, après un premier contact avec l'antigène, l'organisme est capable de reconnaître cet antigène, et d'induire l'expansion clonale des lymphocytes possédant le ou les récepteurs spécifiques à l'antigène. Nous pouvons diviser cette immunité adaptative en deux familles :

- **L'immunité adaptative humorale** supportée par les anticorps, produits par les plasmocytes (lymphocytes B différenciés). Ces anticorps sont des immunoglobulines (Ig) : les Ig M, Ig G ou encore Ig E et Ig A. Les Ig M sont les premières produites lors d'une infection ;
- **L'immunité adaptative cellulaire** qui met en jeu les lymphocytes T. Il existe deux types de lymphocytes T ( $L_T$ ). Tout d'abord, les  $L_T CD8^+$  capables de reconnaître les antigènes portés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I). Le CMH I (et II) sont des structures polypeptidiques portées par les CPA. Ensuite, les  $L_T CD4^+$  qui reconnaissent les antigènes portés par le CMH II.

Mais quel est le rapport avec nos PAM ? C'est ce que nous allons voir dans le paragraphe qui suit.

## 7.2 Les PAM effecteurs de l'immunité

Souvent très oubliés dans les cours d'immunologie, les PAM font partie intégrante de l'immunité. Les études menées sur la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ont permis de comprendre la régulation de l'expression des PAM. Ainsi, une infection induit l'expression de gènes, ces derniers étant régulés par deux voies : la voie Toll et la voie Imd. On retrouve ces deux voies chez les mammifères, activant des facteurs de transcription ayant un rôle important dans les réponses immunitaires innées [Boman 2003]. Ainsi, chez l'Homme, un

corollaire peut être fait : la voie Toll correspondant à la voie TLR, et la voie Imd à la voie TNF-R1 (Tumor factor necrosis-receptor 1) (figure 32) [Leulier 2003].

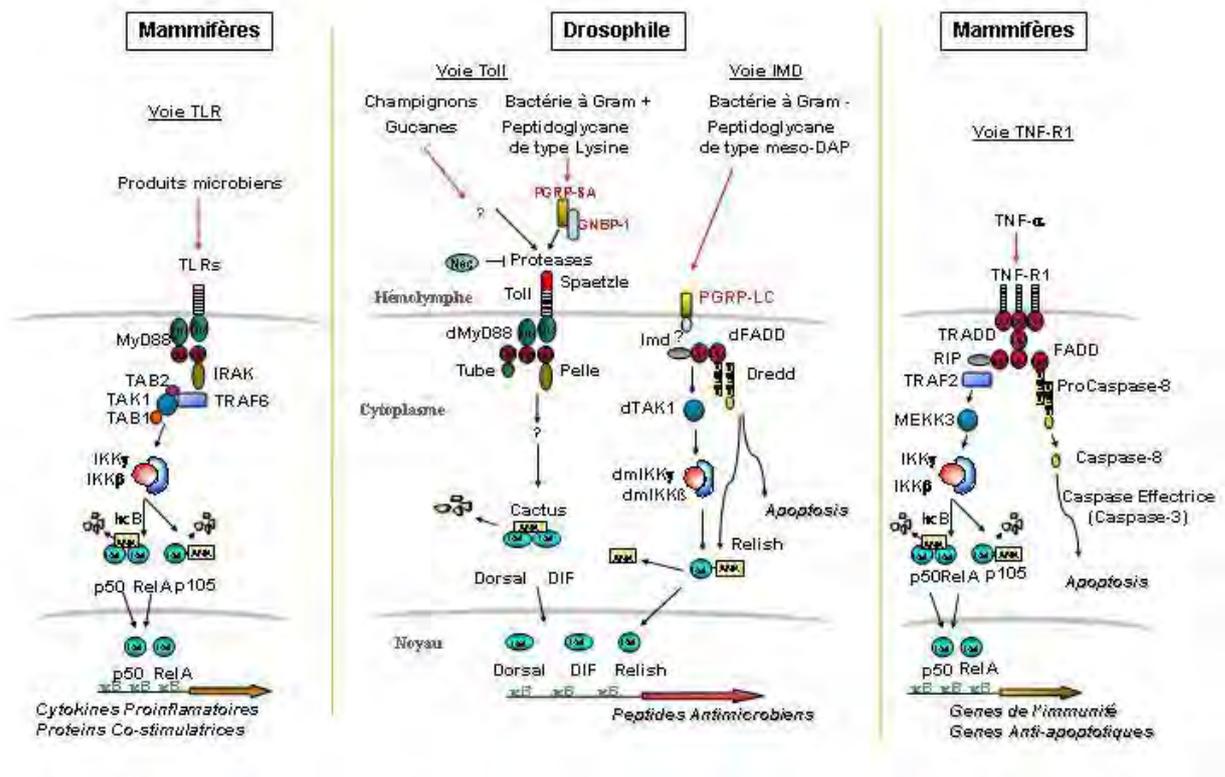


Figure 32 : Comparaison des voies Toll, Imd, TLR et TNF-R1

D'après Leulier 2003.

Les PAM sont donc des éléments clés du système immunitaire inné. Ils sont la principale ligne de défense de cette immunité, et sont présents dans la plupart des organismes pluricellulaires [Andres *et al.* 2007]. Comme tout bon effecteur de l'immunité innée, ils agissent rapidement pour tuer le pathogène (voir chapitre 5 sur les mécanismes d'action). Mais les PAM sont aussi capables de modifier la réponse inflammatoire locale et d'activer les mécanismes d'immunité cellulaire et humorale [Braff *et al.* 2005]. Une étude datant de 1989 menée par Territo et ses collaborateurs montre cette implication dans l'immunité innée. En effet, ils démontrent pour la première fois que des  $\alpha$ -défensines ont une activité chimiotactique favorisant le recrutement de monocytes humains sur le site de l'infection

[Territo *et al.* 1989]. Mais ces propriétés n'ont pu être vérifiées que des années plus tard, lorsque d'autres laboratoires se sont mis à étudier les PAM et à réaliser que ces derniers avaient des propriétés supplémentaires associées à l'immunité innée et adaptative [Diamond *et al.* 2009]. Ainsi, une étude a été menée sur un peptide de 13 AA sur un modèle murin portant une infection bactérienne. Alors que le peptide montrait une activité antibactérienne faible, les chercheurs se sont rendu compte que le peptide permettait de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires tout en favorisant le recrutement de monocytes [Scott *et al.* 2007]. Les PAM ont donc un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire innée (figure 33) et dans l'inflammation.

Mais il faut aussi souligner qu'ils agissent aussi dans les mécanismes de l'immunité adaptative. En effet, les PAM sont aussi considérés comme des activateurs des voies de l'immunité adaptative, en augmentant la production d'anticorps mais aussi en favorisant la mémoire immunologique [Zaiou 2007].

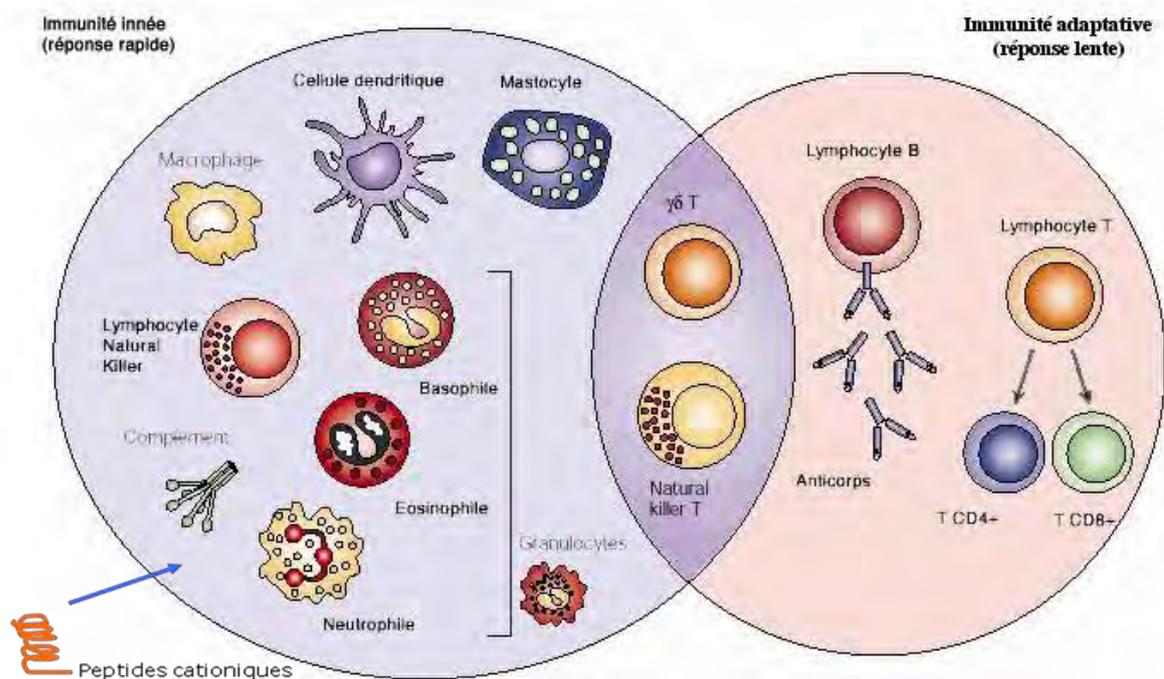


Figure 33 : Immunité innée et adaptative

Les PAM ont donc de multiples fonctions. Ils sont capables de modifier l'expression des gènes, induisant ainsi la production de cytokines, chimiokines, et de promouvoir le recrutement des leucocytes vers le site de l'infection. Ils sont également capables de bloquer ou d'activer la voie de signalisation Toll, ainsi que la différenciation cellulaire [Lai et al. 2009].

Outre ces activités, les PAM ont un rôle dans la cicatrisation : le LL-37 a été étudié pour sa capacité à induire la prolifération des cellules épithéliales [Shaykhiev et al. 2005].

## RESUME

Il existe chez les vertébrés deux types d'immunité :

- L'immunité innée, à déclenchement immédiat, rapide et faisant intervenir des mécanismes non-spécifique
- L'immunité adaptative, spécifique, avec une cinétique lente mais douée de mémoire

Les PAM agissent comme des immunomodulateurs dans les réponses immunitaires innées, conduisant à la protection contre l'infection, permettant un contrôle sélectif de l'inflammation, de la cicatrisation et de l'initiation des réponses immunitaires adaptatives.

## **8. Avantages et inconvénients des PAM**

## 8.1 Avantages des PAM comparés aux traitements conventionnels antibiotiques

Les PAM possèdent de nombreux avantages, résidant principalement dans leur diversité d'application. En effet, en plus d'être étudiés pour leur action anti-infectieuse, les PAM sont également étudiés pour leur effet immunomodulateur ou comme composants neutralisants les endotoxines.

Afin d'étoffer l'arsenal de thérapeutiques en matière d'anti-infectieux, les chercheurs se penchent sur de nouvelles molécules, et les PAM sont des candidats très prometteurs. En effet, leur action antibactérienne est très étudiée pour développer de nouveaux médicaments. Un des avantages est leur large spectre d'activité contre de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif, mais également contre les champignons et certains virus enveloppés.

Comparés aux antibiotiques conventionnels, les PAM entraînent la mort des bactéries extrêmement rapidement et impliquent de nombreuses cibles (*voir chapitre 5 sur les mécanismes d'action*) [Brogden 2005]. Le plus souvent, les CMI et CMB coïncident, indiquant que l'action des PAM est généralement bactéricide, c'est-à-dire qu'ils tuent les bactéries responsables des infections (contrairement aux médicaments bactériostatiques, qui inhibent la multiplication des bactéries).

Mais l'avantage majeur des PAM réside dans leur action sur des souches bactériennes résistantes, voire multi-résistantes. En effet, le nombre de résistances aux antibiotiques explose depuis un certain nombre d'années, dû à une utilisation massive et non documentée de ces anti-infectieux. L'émergence de bactéries multi-résistantes pose un problème dans le traitement des infections : ces bactéries sont définies comme résistantes à au moins trois familles d'antibiotiques différentes, ayant des mécanismes d'action distincts. Les PAM pourraient devenir une alternative aux antibiotiques courants : seuls ou en synergie avec d'autres peptides, voire même avec des antibiotiques, les PAM agissent de la même façon sur les souches « sauvages » et résistantes [Zaslouff 2002]. Par exemple, certains PAM ont une activité tout à fait excellente envers les *Staphylococcus aureus* méticillino-résistants (SARM) et le *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant, comme le montre le [tableau VII](#) avec un PAM synthétique dérivé d'un invertébré marin (*Ciona intestinalis*) [Zhang *et al.* 2005]. En outre, seul un très petit nombre de bactéries est naturellement résistant aux PAM, nous pouvons citer les *Proteus*, *Serratia* et *Burkholderia*.

**Tableau VII : Activité du PAM Ci-MAM-A24 contre des bactéries multi-résistantes**  
d'après Fedders *et al.* 2010

Strain	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	LD <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
MRSA strains		
ATCC 33593	3.125	0.78
ATCC 43300	3.125	0.78
Clinical isolate no. 344	3.125	1.56
Clinical isolate no. 355	3.125	1.56
Clinical isolate no. 358	3.125	1.56
Clinical isolate no. 595	3.125	0.78
Clinical isolate no. 596	3.125	1.56
Clinical isolate no. 597	3.125	1.56
Clinical isolate no. 598	3.125	1.56
Clinical isolate no. 599	6.25	3.125
Multiresistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains		
Clinical isolate no. CF 453 mr	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 479 mr	1.56	0.78
Clinical isolate no. CF 509 mr	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 629 mr	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 640 mr	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 601 mr mukoid	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 602 mr mukoid	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 643 mr mukoid	3.125	0.78
Clinical isolate no. CF 644 mr mukoid	3.125	1.56
Clinical isolate no. CF 646 mr mukoid	3.125	3.125
Control strain		
<i>Escherichia coli</i> K-12 D31	1.56/3.125	0.78/1.56

MBC, minimal bactericidal concentration; LD<sub>90</sub>, 90% lethal dose; MRSA, meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*; VRE, vancomycin-resistant enterococci; ESBL extended-spectrum  $\beta$ -lactamase.

La question prédominante dans toute recherche de nouvelles classes en thérapeutique antibactérienne est de savoir si une résistance peut être acquise par les bactéries envers ces PAM. Le développement d'une résistance à un peptide cationique paraît pour le moment peu probable. En effet, l'obligation d'interaction des PAM avec la paroi bactérienne mais surtout la faculté de ces peptides à avoir plusieurs cibles va dans ce sens. Même si la bactérie réussit à modifier une de ses cibles, cela n'a que peu de conséquence sur l'action globale du peptide qui continuera d'agir. Il paraît assez improbable qu'une bactérie modifie totalement sa membrane pour empêcher l'action des PAM : en effet, de trop

grandes modifications pourraient avoir des conséquences sur l'équilibre osmotique, les apports nutritionnels et donc tuer la bactérie.

Quelques mécanismes de résistance ont toutefois été décrits (*voir chapitre 9 sur les mécanismes de résistances aux PAM*) [Nizet 2006]. Des études sur *Pseudomonas aeruginosa* ont montré qu'après 30 passages en présence de concentrations sub-CMI de peptides, la CMI augmente de 2 à 4 fois [Zhang *et al.* 2005]. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'étude a été menée sur la gentamicine, un aminoglycoside, montrant que la CMI augmente de 190 fois [Steinberg *et al.* 1997]. Ceci nous montre bien que la résistance des bactéries face aux PAM est bien moins importante que celle aux antibiotiques.

Pouvons-nous alors envisager, qu'à terme, une thérapeutique basée sur l'utilisation de PAM puisse promouvoir l'émergence d'une résistance à ces PAM, rendant alors inefficaces les peptides du système immunitaire vis-à-vis d'une bactérie [Bell *et al.* 2003] ? Cette hypothèse n'a pas été démontrée. De plus, quelques peptides sont déjà utilisés de façon libre notamment comme médicaments (polymyxine B, gramicidine S) mais aussi pour la conservation de la nourriture (nisine), et aucun impact sur la capacité des peptides à combattre les infections bactériennes n'a été rapporté [Hancock 2003].

Enfin, les PAM ont la capacité de neutraliser certaines toxines, ce qui est un avantage par rapport aux antibiotiques. En effet, lorsque certains antibiotiques entrent en action, la destruction des bactéries peut entraîner la libération massive de toxines, provoquant un choc toxémique grave. Les PAM, en neutralisant ces toxines, pourraient empêcher ce genre de complication.

De plus, certains peptides ont démontré avoir divers rôles chez les mammifères, comme la capacité à stimuler la réponse immunitaire innée de l'hôte, diminuant ainsi une potentielle réponse inflammatoire nocive (*voir chapitre 7 sur l'immunité*) [Finlay *et al.* 2004].

## 8.2 Inconvénients de l'utilisation des PAM

Le prix très élevé de la fabrication de ces peptides est indéniablement le principal problème dans l'utilisation clinique de ces molécules. C'est pourquoi il y a un besoin grandissant à l'échelle commerciale de mettre en place des plateformes de production.

La société Novozyme Inc., en 2005, découvre le plectasin, un peptide antifongique produit par les champignons noirs (*Pseudoplectania nigrella*) qui poussent au pied des conifères en Europe du nord [<http://www.investindk.com>]. Depuis, ils produisent un recombinant du peptide, ayant le niveau de pureté requise pour une administration thérapeutique. Le plectasin est un nouveau PAM prometteur, toléré à hautes doses et ayant démontré son utilité dans les modèles animaux de péritonites et pneumonie [Mygind *et al.* 2005].

Bien que les peptides montrent une activité significative contre les bactéries *in vitro*, il apparaît que beaucoup de peptides perdent cette activité lorsque les conditions physiologiques au niveau du sérum et de la concentration en sel ne sont pas optimales.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inactivation d'une  $\beta$ -défensine humaine par une concentration trop élevée en sel dans le liquide broncho pulmonaire des malades atteints de mucoviscidose, annihile la capacité de ces peptides à tuer *P. aeruginosa* colonisant les poumons des patients, entraînant des infections chroniques létales (voir chapitre 6.1 sur les PAM et les maladies) [Smith *et al.* 1996; Goldman *et al.* 1997].

De même, un autre peptide humain, le LL-37, est fortement antagonisé par des concentrations en cations mono ou divalents [Bowdish *et al.* 2005]. Toutefois, tous les peptides ne sont pas sensibles à la concentration saline, et beaucoup peuvent exercer leur pouvoir antibactérien quelque soit la concentration en sel, comme par exemple la tachyplesine ou les polyphemusines [Tam *et al.* 2002]. Il est possible de développer des peptides synthétiques en hélice  $\alpha$ , avec une activité identique aux peptides naturels ; les modifications au niveau de la charge, de l'hydrophobicité ou encore le degré de rotation de l'hélice permettent au peptide synthétisé de résister aux changements de concentration en sel.

Peu d'études sur la toxicité des peptides ont été publiées, et il semble indispensable de mener des recherches approfondies sur la toxicité éventuelle des PAM en vue de l'obtention de nouveaux médicaments anti infectieux. En effet, l'existence d'une activité hémolytique pourrait être un frein majeur au développement de ces molécules.

### RESUME

Les PAM, comme toutes molécules à visée thérapeutique, sont dotés d'avantages indéniables mais également d'inconvénients.

Parmi les avantages, nous pouvons citer leur rôle multifonctionnel dans la lutte contre les bactéries, fungi et virus, leur action bactéricide rapide et sur des bactéries multi-résistantes. Malheureusement, les PAM naturels ou de synthèse coûte très cher en production, et le recul reste encore faible quant à leur toxicité potentielle en tant qu'agent anti-infectieux.

Le besoin en nouveaux médicaments pour agrandir l'arsenal de thérapeutiques anti-infectieuses fait toutefois des PAM des molécules prometteuses.

## **9. Mécanismes de résistance aux PAM**

Depuis la découverte des premiers PAM, beaucoup d'études ont été menées afin de comprendre leur mécanisme d'action et d'essayer de les synthétiser afin d'en faire des médicaments antibactériens. Jusqu'en 2002, on pensait encore que les PAM étaient des candidats idéals pour de nouvelles thérapies, la résistance des micro-organismes envers ces molécules semblant peu probable [Zasloff 2002]. En effet, les peptides antimicrobiens font partie de l'immunité innée de l'organisme, et comme nous en avons discuté plus haut, leur mécanisme d'action rend difficile la mise en place de mécanismes de résistances efficaces. Cependant, des études plus récentes ont démontré l'existence de résistances aux PAM [Yeaman *et al.* 2003]. Ces mécanismes de résistance ne sont connus que pour les bactéries, nous ne nous intéresserons donc qu'à cette catégorie de micro-organismes.

Les bactéries capables de survivre à une exposition de PAM semblent employer deux stratégies fondamentales distinctes :

- une **résistance constitutive**, dite passive
- une **résistance inductible**, ou encore adaptative [Yeaman *et al.* 2003].

## 9.1 Petit rappel sur la résistance des bactéries aux antibiotiques

Cette résistance des bactéries aux PAM peut être comparée à la résistance des bactéries aux antibiotiques. En effet, il existe deux mécanismes : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La **résistance naturelle** ou intrinsèque, portée par le chromosome, est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries d'un même genre (ex. : les entérobactéries et les macrolides).

La **résistance acquise** est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'un genre donné. Cette résistance est évolutive et varie en fonction du temps et de l'utilisation des antibiotiques, qui ne provoquent pas la résistance mais qui sélectionnent les bactéries résistantes. L'acquisition de la résistance peut résulter d'une mutation chromosomique (10 à 20% des cas) ou médiée par des éléments génétiques mobiles comme des plasmides (80 à 90% des cas). Trois grandes catégories de mécanismes rendent compte de la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques :

- le plus fréquent est l'inactivation de l'antibiotique par inactivation enzymatique de l'antibiotique (hydrolyse des bêtalactamines par les bêtalactamases) ou par

modification de la molécule (estérification des aminosides par les aminotransférases) ;

- la modification ou la substitution de la cible de l'antibiotique par mutation des gènes codant la cible (résistance aux fluoroquinolones par modification de l'ADN gyrase), ou par acquisition de gènes étrangers (entérocoques et glycopeptides) ;
- la diminution de perméabilité (obstruction ou disparition des porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) ou l'apparition de système d'efflux (pompe qui chasse l'antibiotique hors de la cellule bactérienne).

## 9.2 La résistance naturelle des PAM

Certaines bactéries possèdent des propriétés particulières, leur conférant une résistance à certains PAM, même en l'absence de contact préalable avec ces derniers : c'est ce que l'on appelle un mécanisme de résistance constitutive ou naturelle.

Des bactéries du genre *Serratia* ou *Morganella* ont une composition particulière de la membrane externe, composition fournissant peu de sites de fixation aux PAM. Ainsi, la présence de stérols ou de phospholipides peu chargés dans la membrane externe, ou la baisse du potentiel transmembranaire diminuent l'affinité des PAM pour les membranes des bactéries [Zasloff 2002]. Les bases moléculaires de ces résistances aux PAM ne sont cependant pas encore bien comprises [Yeaman *et al.* 2003].

## 9.3 La résistance acquise des PAM

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les bactéries pour contrer l'action des PAM à différents niveaux, notamment des changements de structure ou encore la perméabilité membranaire.

### 9.3.1 Modification de la charge nette.

L'action des PAM réside dans leur charge positive attirée par la charge négative des micro-organismes. *S. aureus* possède un opéron (*dlt*) comprenant des gènes qui codent des

protéines responsables de l'ajout de D-alanine aux acides téichoïques du peptidoglycane [Peschel *et al.* 1999]. En effet, l'acide téichoïque est formé d'un squelette chargé par des groupes phosphates déprotonés ; l'addition de D-alanine va estérifier ce squelette et entraîner la réduction de la charge nette négative. Lorsque l'opéron *dlt* est inactivé, l'action des PAM est plus importante [Peschel *et al.* 1999].

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe composée de nombreuses molécules de LPS, maintenues par des ions magnésium et calcium faisant des ponts avec les sucres phosphatés [Zaslouff 2002]. La charge de la membrane externe de la plupart des bactéries à Gram négatif est modulée par le régulon PhoPQ, un système composé d'un capteur (PhoQ) et d'un effecteur (PhoP). Le régulon PhoP/PhoQ affecte la sensibilité aux PAM par la modulation du régulon PmrA, qui contrôle une banque de gènes intervenant dans la composition de la membrane externe en éthanolamine et 4-aminoarabinose [Groisman 1998; Gunn *et al.* 2000]. Ainsi, il peut provoquer une augmentation de ces charges positives, induisant une moindre interaction avec le peptide antimicrobien.

Ainsi le système de régulation PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* est un mécanisme de défense contre les PAM : la bactérie réagit à certains signaux de l'environnement (comme la présence de PAM) et induit des changements de charge dans sa membrane externe, favorisant ainsi la résistance aux PAM [Guina *et al.* 2000].

### 9.3.2 Modification de la fluidité membranaire

En augmentant les interactions hydrophobes, les bactéries à Gram négatif réduisent la fluidité membranaire et donc la sensibilité aux PAM.

Ainsi, la capsule polysaccharidique intervient dans la résistance de *Klebsiella pneumoniae* envers des PAM tels que la lactoferricine, l'HNP 1 ou encore l'HBD 1. En effet, la capsule limite les interactions entre peptides et cibles membranaires. Une souche mutante de *Klebsiella pneumoniae* (52k10) confirme le rôle de la capsule polysaccharidique : cette souche, dépourvue de capsule, est plus sensible aux peptides antimicrobiens cités ci-dessus [Campos *et al.* 2004].

D'autres mécanismes peuvent être mis en place comme l'addition d'aminoarabinose ou de palmitate sur le Lipide A du LPS [Groisman *et al.* 1997; Guo *et al.* 1997; Gunn *et al.* 1998], réduisant les interactions électrostatiques et la fluidité de la membrane des bactéries.

Ce mécanisme induit donc une résistance à la polymyxine, aux PAM en hélice  $\alpha$  ou encore en feuillet  $\beta$  comme la protégrine [Guo *et al.* 1998].

### 9.3.3 Modification des protéines membranaires

Chez *Yersinia enterocolitica*, une bactérie à Gram négatif, la composition de la membrane externe, est différente de celle des autres entérobactéries et présente une résistance aux PAM. Cette dernière serait liée à la présence d'un plasmide codant une adhésine A et la lipoprotéine A [Visser *et al.* 1996].

### 9.3.4 La production d'enzymes protéolytiques

De nombreuses publications ont démontré que des enzymes protéolytiques peuvent être impliquées dans des phénomènes de résistance aux PAM [Belas *et al.* 1991; Resnick *et al.* 1991]. Cette résistance adaptative se fait par sécrétion de protéases et peptidases, capables de cliver les peptides. Par exemple, *S. aureus* sécrète une métalloprotéase, l'aurolysine, qui inactive par clivage la cathélicidine humaine LL-37 [Sieprawska-Lupa *et al.* 2004]. Les souches de *S. aureus* capables d'inactiver ce PAM présentent une sensibilité diminuée, mais la protéolyse des PAM reste à démontrer *in vivo*. De même, des espèces des genres *Yersinia* et *Streptococcus* libèrent des protéases pouvant participer à leur protection contre les PAM cationiques. Chez *Yersinia*, le gène plasmidique *pla* code une protéase de surface essentielle pour obtenir la résistance chez le genre [Yeaman *et al.* 2003]. *Bacillus spp* et *P. aeruginosa* dégradent grâce à des enzymes protéolytiques les cécropines, et de nombreuses espèces de *Salmonella* stoppent de la même façon les attaques des magainines [Guina *et al.* 2000]. Enfin, la sérine-protéase heat-shock DegP (protéine de choc thermique) sécrétée par *Escherichia coli* lui permet de résister à la lactoferricine B *in vitro* [Yeaman *et al.* 2003].

### 9.3.5 Mécanisme de résistance efflux-dépendant

L'efflux est apparu comme un mécanisme par lequel les bactéries peuvent résister aux peptides cationiques. Une étude sur *Neisseria gonorrhoeae* menée par Shafer et coll. en 1998 montre que la résistance aux peptides antibactériens est en partie médiée par un

système d'efflux énergie-dépendant codé par l'opéron *mtr* (dont le gène est *mtrR*) [Shafer *et al.* 1998]. En effet, cette bactérie dispose d'un système potassium antiport formé par les protéines RosA et RosB [Stumpe *et al.* 1997]. Le gène *rosA/rosB* semble être inductible lors de l'exposition de la bactérie aux PAM entraînant le pompage actif de ces derniers hors de la bactérie [Yeaman *et al.* 2003].

### 9.3.6 La modification des cibles intracellulaires.

Il existe une séparation temporelle et fonctionnelle entre l'interaction initiale avec la membrane et la mort cellulaire. De ce fait, les PAM agissent et inhibent essentiellement des cibles se situant à l'intérieur de la membrane plasmique. Il y a donc des mécanismes complexes modifiant ces cibles intracellulaires qui confèrent une résistance [Yeaman *et al.* 2003].

Par exemple, une mutation sur le gène *gyrB* (*gyrase responsable du déroulement du chromosome pour sa réplication*) d'*E. coli* est associée à la réduction de la sensibilité de cette bactérie à la microcine B17, un PAM inhibant la réplication de l'ADN [del Castillo *et al.* 2001]. Cette mutation est due au remplacement d'un résidu tryptophane par un résidu arginine dans le polypeptide GyrB, réduisant l'inhibition de l'ADN gyrase par la microcine B17.

### RESUME

Il existe donc de nombreux mécanismes de résistance aux PAM, naturels ou acquis par les bactéries. Toutefois, l'obtention de souches résistantes n'est pas simple. En effet, Zasloff a réalisé des cultures de *E. coli* et *S. aureus* en présence de Pexiganan, un analogue synthétique de magainines et les tentatives d'induction d'une résistance à cette molécule ont été infructueuses [Zasloff 2002].

Il en résulte que les PAM sont des molécules très intéressantes dans la lutte contre les infections bactériennes notamment, et présentent cet avantage majeur d'induire peu de résistance.

# **10. Développement clinique en matière d'anti-infectieux**

## 10.1 Introduction

Les PAM sont connus depuis longtemps, et leur activité intéressent de nombreux chercheurs, notamment dans le développement d'anti-infectieux pour leur action rapide mais surtout l'absence potentielle de phénomène de résistance. En effet, depuis quelques années, nous voyons se développer des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques conventionnels. Ces PAM seraient de toute évidence une solution novatrice en matière de traitement anti-infectieux.

Ainsi, des peptides antimicrobiens (ou dérivés = analogues) sont en cours de développement clinique, notamment sous forme de topique ([tableau VIII](#)) [Hancock 2000].

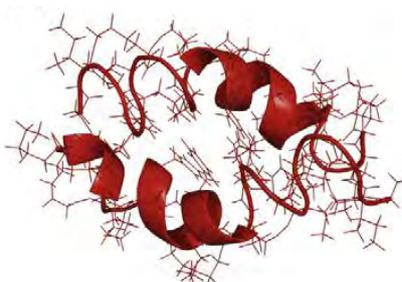
**Tableau VIII : Peptides antimicrobiens cationiques en développement clinique**

d'après Andrès et al. 2007

Produit (société)	Structure/extrait	Voie d'administration	Indications en cours de développement
<i>Pexiganan (Magainin Pharmaceuticals)</i>	Hélice $\alpha$ /peau du xénope	Crème	Impétigo et ulcérations surinfectées chez les diabétiques (études de phase III)
<i>Isegaran (Intrabiotics Pharmaceuticals)</i>	Peptides à ponts disulfure/leucocytes de porc	Bains de bouche Aérosols	Mucites chimio-induites (étude de phase III) Infections pulmonaires dans la mucoviscidose et sous ventilation mécanique (études de phase I)
Peptides MBI ( <i>Micrologix Biotech</i> )	Hélice $\alpha$ /non communiqué	Crème	Colonisation et surinfections des cathéters centraux (étude de phase III) ; acné et portage nasal chronique de <i>S. aureus</i> (étude de phase I)
Peptides dérivés de l'histatine ( <i>Periondotix</i> )	Hélice $\alpha$ /salive humaine	Bains de bouche et gels	Gingivites et affections périodontales (étude de phase II-III) ; candidoses buccales et infections chroniques à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (études de phase I)
<i>Neuprex (Xoma Ltd)</i>	Hélice $\alpha$ /homme	Voie i.v.	Méningococcémies chez enfants (en attente d'ATU) ; maladie de Crohn
<i>Mycoprex (Xoma Ltd)</i>	Hélice $\alpha$ /homme	Voie i.v.	Infections fongiques
Peptides dérivés de l'héliomocine ou de la thanatine ( <i>Entomed S.A.</i> )	Peptides à ponts disulfure/insectes	Voie i.v.	Infections systémiques fongiques chez l'immunodéprimé et bactériennes à germes multirésistants

## 10.2 Le Pexiganan

C'est dans les années 1990 que le premier PAM dérivé de la magainine fut développé : il s'agit du Pexiganan (*Magainin Pharmaceuticals Philadelphia, Etats-Unis*) (figure 34) [Jacob *et al.* 1994; Lamb *et al.* 1998].



**Figure 34 : Structure du Pexiganan**

d'après Gottler *et al.* 2009

Le Pexiganan, on encore appelé MSI-78, a été conçu par Zasloff et ses collaborateurs dans les années 1990, grâce notamment à leur recherche sur l'importance de la structure de la magainine dans son rôle antibactérien. Sous forme de topique, le Pexiganan a fait, comme tout médicament, l'objet d'études cliniques, pour le traitement du pied diabétique [Maloy *et al.* 1995].

La FDA (Food and Drug Administration) refuse en 1999 l'autorisation de mise sur le marché du Pexiganan après deux études cliniques de phase III, celles-ci ne démontrant pas une efficacité supérieure au traitement conventionnel (ofloxacine par voie orale) du pied diabétique. La FDA impose la réalisation de nouvelles études cliniques [Lipsky *et al.* 2008]. Entre temps, l'industrie produisant le Pexiganan est revendue à MacroChem Corp. Une meilleure compréhension des infections du pied diabétique et des traitements anti-infectieux par topiques, ainsi que l'amélioration de conception des essais cliniques et les progrès dans la fabrication des peptides sont très encourageants et permettent de fonder de grands espoirs pour obtenir l'approbation de la FDA.

Le Pexiganan était pourtant une molécule très prometteuse. De nombreuses études ont été réalisées *in vitro* afin de déterminer la concentration inhibitrice de cette molécule sur un

large panel de bactéries, principalement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif que l'on retrouve chez l'Homme ([tableau IX](#)). Les chiffres obtenus pour le Pexiganan sont comparés à l'ofloxacin choisie comme molécule de référence par la FDA [Fuchs *et al.* 1998; Ge *et al.* 1999].

**Tableau IX : CMI de souches bactériennes et pourcentage d'inhibition par le Pexiganan ou l'ofloxacine selon la littérature**

d'après Gottler *et al.* 2009

Souches bactériennes	CMI Pexiganan (µg/mL)		% de souches sensibles au Pexiganan à concentration ≤ 64 µg/mL		% de souches sensibles à l'ofloxacine à concentration ≤ 2 µg/mL
	Fuchs <i>et al.</i> 1998	Ge <i>et al.</i> 1999	Fuchs <i>et al.</i> 1998	Ge <i>et al.</i> 1999	Fuchs <i>et al.</i> 1998
<b>Bactéries aérobies</b>					
<i>Acinetobacter sp.</i>	8	8	100	100	100
<i>Alcaligenes faecalis</i>		256	100	71	80
<i>Citrobacter diversus</i>	16	8	100	99	100
<i>Citrobacter freundii</i>	16	8	96	100	92
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	4	8	100	100	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	32	100	100	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	32	64	96	92	100
<i>Escherichia coli</i>	16	32	100	100	83
<i>Klebsiella oxytoca</i>	16	16	100	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	16	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	16	100	99	100
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	64		100		20
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	16	16	100	100	93
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	8	100	100	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	8	100	100	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	32	16	100	100	92
<i>Streptococcus pyogenes</i>	32	8	97	99	96
<b>Bactéries anaérobies</b>					
<i>Bacteroides fragilis</i>	6	4	100	100	67
<i>Bacteroides ovatus</i>	6	8	100	100	0
<i>Clostridium perfringens</i>	18	64	100	90	100
<i>Clostridium ramosum</i>	16	16	100	100	0
<i>Clostridium sporogenes</i>	6	16	100	100	100
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	45	32	100	91	100
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1	8	100	97	0
<i>Prevotella bivia</i>	69	32	78	94	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	51	64	100	91	33

Les résultats montrent clairement l'efficacité et l'action large spectre de la molécule *in vitro*. De plus, des études ont été menées pour évaluer le mécanisme de résistance chez des bactéries : l'utilisation de la molécule à concentrations sub-inhibitrices de manière répétée n'induit pas le développement de mécanisme de résistance. Cela a été démontré notamment chez *Staphylococcus aureus*, bactérie connue pour développer des résistances à de nombreux antibiotiques (notamment la méticilline) [Chang *et al.* 2003]. Des études de cinétiques chez *E. coli* et *S. aureus* démontrent la rapidité d'action du MSI-78. A une concentration de 50 µg/mL le nombre d'UFC/mL a été réduit à zéro en 30 minutes chez *E. coli* et en 60 minutes chez *S. aureus* [Navon-Venezia *et al.* 2002].

Concernant la toxicité éventuelle du Pexiganan, des études mesurant l'activité hémolytique du peptide sur les globules rouges humains ont été menées montrant qu'il faut une concentration supérieure à 250 µg/mL pour induire une hémolyse totale [Radzishvsky *et al.* 2007]. Cette concentration est bien supérieure aux CMI de la plupart des souches bactériennes citées dans le [tableau VIII](#).

Ainsi, la faible propension à générer des résistances, le large spectre d'activité, l'action rapide du Pexiganan mais également sa faible toxicité en faisait un candidat idéal pour le traitement du pied du diabétique. De plus, lors des essais de phases III, aucun autre effet indésirable n'a été rapporté [Lamb *et al.* 1998].

D'autres études ont été entreprises sur cette molécule, notamment sur la synergie avec certains antibiotiques sur les bactéries présentes chez des sujets neutropéniques fébriles, dont *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* (résistant à la méticilline) et *S. epidermidis* (résistant à la méticilline). Ainsi, le Pexiganan semble agir en synergie avec les β-lactamines, en amincissant la membrane bactérienne permettant aux β-lactamines de pénétrer plus facilement à l'intérieur de la bactérie. La capacité de liaison du Pexiganan au LPS est un aspect très important dans cette activité synergique [Gottler *et al.* 2009].

Malheureusement, aucune information n'est sortie de MacroChem Copr., depuis le refus de la FDA en 1999 concernant la commercialisation du Pexiganan, nous pouvons donc penser que le développement a été abandonné.

### 10.3 L'Isegran

Développé par un laboratoire américain, Intrabiotics Pharmaceuticals Inc., l'Isegran est un analogue synthétique de la protégrine I du porc. Cette molécule a été initialement développée comme solution pour bains de bouche permettant d'éviter les mucites chimio-induites. L'Isegran possède une activité à large spectre contre les bactéries et champignons *in vitro*. Les essais de phase II furent très prometteurs. L'étude portait sur les hamsters, à qui on administrait ce peptide quatre jours avant une allo-greffe de moelle. Les résultats indiquaient une réduction de 22% des mucites, mais également une baisse de 40% de leur sévérité [Loury *et al.* 1999]. Lors des essais cliniques de phase III, les résultats n'ont pourtant pas été significatifs, et n'ont pas démontré une réduction des mucites en comparaison d'un placebo, et l'évaluation de la molécule a été arrêtée [Jenssen *et al.* 2006].

### 10.4 Le Neuprex

On peut considérer cette molécule comme apparentée aux PAM ; elle provient de Xoma Ltd. En effet, c'est un petit peptide, résultant d'un clivage artificiel d'une protéine cationique humaine, la *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI). Le Neuprex a fait l'objet de nombreuses études, la première datant de 1996 sur un groupe de 26 enfants présentant une septicémie à méningocoque. Dans cette étude, un seul décès a été déploré, contre une mortalité de 22% selon la littérature [Mackin 1998]. Egalement nommé rBPI-21, ce fragment de protéine recombinante a confirmé ces résultats lors d'essais cliniques de phase III réalisés en 1998 sur plus de 2200 méningococcémies en pédiatrie. Le Neuprex a ainsi obtenu la désignation de médicament orphelin par la FDA, et selon les dernières informations, la molécule serait en attente d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) par la FDA et les instances européennes dans le cadre des méningococcémies.

### **RESUME**

Encore beaucoup d'études et de travaux sont à réaliser sur les PAM et leurs analogues pour prouver leur efficacité sous forme de traitements ainsi que leur innocuité. A l'heure actuelle, aucune molécule n'a dépassé les essais cliniques de phase III hormis le Neuprex qui est toujours en attente d'ATU.

## **DISCUSSION CONCLUSION**

Les PAM (*sous-entendu cationiques*) sont des molécules clés du système immunitaire inné, chez les animaux et les végétaux, et contribuent à la première ligne de défense de l'organisme. Ce sont de petits peptides, entre 12 et 50 AA, uniquement de type lévogyre, cationiques et présentant des propriétés amphiphiles. Actuellement, plus de 1500 PAM ont été identifiés, que ce soit chez l'Homme, les Insectes, les Plantes... Les PAM sont présents partout dans la Nature. Ces molécules sont importantes pour les organismes qui les possèdent, car ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, voire antiparasitaires...sans oublier leur rôle dans les réponses inflammatoires (affections cutanées, maladie auto-immune de Crohn, cancers, maladies cardio-vasculaires...) [Zaiou 2007]. En réponse à une infection, l'expression des gènes codant ces PAM est constitutive ou induite, et l'expression des PAM est locale (cellules phagocytaires, épithélium chez les animaux, feuilles et racines chez les plantes).

Les PAM présentent une grande diversité structurale, et sont actuellement classés en trois grandes familles [Andres *et al.* 2007] :

- les peptides linéaires formant des hélices  $\alpha$
- les peptides riches en cystéine
- les peptides contenant un pourcentage élevé en un type d'AA peu commun.

Malheureusement, cette « classification » n'a pour le moment pas fait l'objet d'un consensus international, et la découverte de nouveaux PAM génère des dénominations souvent très intuitives pour celui qui la donne, mais non universelles. Il serait donc peut-être important de se pencher sur cette question, afin d'harmoniser toutes ces découvertes en une vraie classification.

Concernant le mode d'action des PAM, encore beaucoup de recherches sont à mener. En effet, s'il est bien connu pour les magainines et les cécropines pour ce qui est de l'activité antibactérienne, il reste de nombreuses questions pour les autres familles, mais aussi pour les mécanismes d'action antivirale, antifongique et antiparasitaire. Ainsi, la plupart des PAM ont une activité directe sur les bactéries, mais il en existe qui agissent au niveau intracytoplasmique. Le mécanisme général proposé est que les PAM tuent les bactéries en perméabilisant leur paroi (effet détergent), entraînant parfois la formation de pores.

Les PAM ont donc **une activité** :

- **bactéricide**,
- **rapide**,
- **indépendante** de l'interaction avec une cible moléculaire unique,
- **sélective** sur les bactéries (interaction avec la paroi bactérienne chargée négativement et les PAM chargés positivement),
- **à large spectre**, car ils sont actifs sur les bactéries à Gram positif et négatif (ainsi que sur les fungi, virus et certains parasites).

Toutes ces caractéristiques en font des candidats très prometteurs en terme d'anti-infectieux, d'autant que des études menées ont démontré que des phénomènes de résistance acquise étaient peu probables. Cependant, certaines bactéries ont mis en place des stratégies diminuant leur sensibilité aux PAM (diminution de la fluidité membranaire, production d'enzymes protéolytiques...).

L'espoir fondé sur les PAM réside également dans leur action sur des bactéries résistantes voire multi-résistantes, et en font des molécules intéressantes dans le contexte actuel. En effet, depuis quelques années, il n'est pas rare d'entendre parler de bactéries multi-résistantes : *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant (SARM), Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), ou encore *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline. Si nous savons qu'une infection par SARM peut être traitée grâce à la vancomycine ou la teicoplanine, la crainte concernant les ERG (Entérocoques résistants aux glycopeptides) est de voir une transmission du gène de résistance de l'entérocoque vers le SARM, rendant le traitement par glycopeptides totalement inefficace... Nous sommes face à un dilemme important : il est nécessaire de prendre conscience que les bactéries auront toujours une longueur d'avance sur nos thérapeutiques et qu'il est (et sera) nécessaire de continuer les recherches en matière d'anti-infectieux. Les grands groupes pharmaceutiques ont un peu dénigré le filon ces dernières années, pour des questions de profit. Mais si nous ne poursuivons pas les recherches afin de découvrir de nouvelles molécules antibactériennes, il se pourrait, dans un scénario catastrophe, que le taux de mortalité pour certaine infection augmente, et que des complications surviennent pour des maladies jusque là anodines.

Il semble donc indispensable de poursuivre les recherches, afin de trouver de nouvelles molécules, de nouveaux modes d'action permettant de lutter contre ces bactéries toujours

plus inventives pour échapper à nos stratégies d'éviction. Les PAM semblent être des candidats intéressants. Malheureusement, et sûrement pour une question de coût, peu d'études sont en cours sur ces molécules. Il est pourtant nécessaire de poursuivre les recherches, car nous ne disposons que de peu de données, notamment concernant leur activité hémolytique. Dans le futur, nous pourrions envisager de nouvelles thérapeutiques à partir de ces molécules naturelles, mais aussi à partir d'analogues synthétiques, possédant les mêmes activités anti-infectieuses mais ayant une toxicité maîtrisée. L'intérêt majeur de cette voie réside dans le mode d'action très différent des antibiotiques actuels et fait de ces PAM les molécules de demain. Nous pouvons nous poser la question de l'étude menée sur le Pexiganan : peut-être que si on avait démontré la non-infériorité d'efficacité de cette molécule par rapport à l'ofloxacine, ce PAM serait actuellement un médicament utilisé dans les infections du pied du diabétique dans le monde entier.

Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts, de se concentrer sur l'utilité indéniable de nouvelles molécules antibactériennes, afin de lutter contre les nouvelles infections à bactéries multi-résistantes qui apparaissent chaque jour. Il est aussi important de mieux comprendre les mécanismes infectieux et les mécanismes de résistance des bactéries pour faire évoluer l'arsenal thérapeutique actuel. Enfin, nous l'avons vu, les PAM offrent un spectre d'activité très large, ce qui est un atout majeur : nous pouvons imaginer l'utilisation d'un seul médicament pour traiter des affections diverses, sans pour autant créer des résistances à cette molécule.

Si ce sont les propriétés antibactériennes qui ont fait découvrir les PAM et naître l'engouement pour de nouvelles thérapeutiques, les domaines d'application dépassent aujourd'hui l'anti-infection, et les activités anticancéreuses de certains PAM sont des pistes prometteuses également.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aboudy, Y., E. Mendelson, *et al.* (1994). "Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus types 1 and 2." Int J Pept Protein Res **43**(6): 573-82.
- Agerberth, B., H. Gunne, *et al.* (1995). "FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(1): 195-9.
- Albiol Matanic, V. C. and V. Castilla (2004). "Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus." Int J Antimicrob Agents **23**(4): 382-9.
- Amlie-Lefond, C., D. A. Paz, *et al.* (2005). "Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come." J Allergy Clin Immunol **116**(6): 1334-42.
- Andersen, J. H., H. Jenssen, *et al.* (2003). "Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir." Antiviral Res **58**(3): 209-15.
- Andres, E. and J. L. Dimarcq (2007). "[Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date]." Med Mal Infect **37**(4): 194-9.
- Andreu, D. and L. Rivas (1998). "Animal antimicrobial peptides: an overview." Biopolymers **47**(6): 415-33.
- Bastian, A. and H. Schafer (2001). "Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro." Regul Pept **101**(1-3): 157-61.
- Bayer, A. S., R. Prasad, *et al.* (2000). "In vitro resistance of Staphylococcus aureus to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity." Infect Immun **68**(6): 3548-53.
- Bechinger, B., M. Zasloff, *et al.* (1993). "Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy." Protein Sci **2**(12): 2077-84.
- Belaid, A., M. Aouni, *et al.* (2002). "In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1." J Med Virol **66**(2): 229-34.
- Belas, R., D. Erskine, *et al.* (1991). "Proteus mirabilis mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior." J Bacteriol **173**(19): 6279-88.
- Bell, G. and P. H. Gouyon (2003). "Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins." Microbiology **149**(Pt 6): 1367-75.
- Benincasa, M., M. Mattiuzzo, *et al.* (2009). "Activity of antimicrobial peptides in the presence of polysaccharides produced by pulmonary pathogens." J Pept Sci **15**(9): 595-600.
- Benincasa, M., B. Skerlavaj, *et al.* (2003). "In vitro and in vivo antimicrobial activity of two alpha-helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs." Peptides **24**(11): 1723-31.
- Bessalle, R., H. Haas, *et al.* (1992). "Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension." Antimicrob Agents Chemother **36**(2): 313-7.

- Bevins, C. L. and M. Zasloff (1990). "Peptides from frog skin." Annu Rev Biochem **59**: 395-414.
- Blondelle, S. E., K. Lohner, *et al.* (1999). "Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 89-108.
- Boman, H. G. (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity." Annu Rev Immunol **13**: 61-92.
- Boman, H. G. (2000). "Innate immunity and the normal microflora." Immunol Rev **173**: 5-16.
- Boman, H. G. (2003). "Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts." J Intern Med **254**(3): 197-215.
- Boman, H. G. and D. Hultmark (1987). "Cell-free immunity in insects." Annu Rev Microbiol **41**: 103-26.
- Boman, H. G., I. Nilsson, *et al.* (1972). "Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*." Nature **237**(5352): 232-5.
- Bovbjerg, A. M. (1963). "Development of the Glands of the Dermal Plicae in *Rana Pipiens*." J Morphol **113**: 231-43.
- Bowdish, D. M., D. J. Davidson, *et al.* (2005). "Impact of LL-37 on anti-infective immunity." J Leukoc Biol **77**(4): 451-9.
- Braff, M. H., A. Bardan, *et al.* (2005). "Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides." J Invest Dermatol **125**(1): 9-13.
- Brändén C-I., J. Tooze (1996) , "Introduction à la structure des protéines" De Boeck Université : 75-150.
- Broekaert, W. F., F. R. Terras, *et al.* (1995). "Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system." Plant Physiol **108**(4): 1353-8.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-50.
- Brogden, K. A., M. Ackermann, *et al.* (2003). "Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences." Int J Antimicrob Agents **22**(5): 465-78.
- Bucki, R., K. Leszczynska, *et al.* (2010). "Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(1): 15-25.
- Bulet, P., R. Stocklin, *et al.* (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." Immunol Rev **198**: 169-84.
- Campos, M. A., M. A. Vargas, *et al.* (2004). "Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides." Infect Immun **72**(12): 7107-14.
- Castro, M. S. and W. Fontes (2005). "Plant defense and antimicrobial peptides." Protein Pept Lett **12**(1): 13-8.

- Chang, S., D. M. Sievert, *et al.* (2003). "Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene." N Engl J Med **348**(14): 1342-7.
- Chen, F. Y., M. T. Lee, *et al.* (2003). "Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation." Biophys J **84**(6): 3751-8.
- Chen, H., Z. Xu, *et al.* (2006). "Recent advances in the research and development of human defensins." Peptides **27**(4): 931-40.
- Cole, A. M., J. Shi, *et al.* (2001). "Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds." Blood **97**(1): 297-304.
- Conlon, J. M. and A. Sonnevend (2010). "Antimicrobial peptides in frog skin secretions." Methods Mol Biol **618**: 3-14.
- Cornet, B., J. M. Bonmatin, *et al.* (1995). "Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A." Structure **3**(5): 435-48.
- Cowland, J. B., A. H. Johnsen, *et al.* (1995). "hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules." FEBS Lett **368**(1): 173-6.
- Daher, K. A., M. E. Selsted, *et al.* (1986). "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins." J Virol **60**(3): 1068-74.
- Dathe, M., J. Meyer, *et al.* (2002). "General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides." Biochim Biophys Acta **1558**(2): 171-86.
- Dathe, M., H. Nikolenko, *et al.* (2001). "Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge." FEBS Lett **501**(2-3): 146-50.
- Dathe, M. and T. Wieprecht (1999). "Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 71-87.
- De Smet, K. and R. Contreras (2005). "Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins." Biotechnol Lett **27**(18): 1337-47.
- del Castillo, F. J., I. del Castillo, *et al.* (2001). "Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase." J Bacteriol **183**(6): 2137-40.
- Di Nardo, A., A. Vitiello, *et al.* (2003). "Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide." J Immunol **170**(5): 2274-8.
- Diamond, G., N. Beckloff, *et al.* (2009). "The roles of antimicrobial peptides in innate host defense." Curr Pharm Des **15**(21): 2377-92.
- Dimarcq, J. L., P. Bulet, *et al.* (1998). "Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates." Biopolymers **47**(6): 465-77.

- Dubos, R. J. (1939). "Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : li. Protective Effect of the Bactericidal Agent against Experimental Pneumococcus Infections in Mice." J Exp Med **70**(1): 11-7.
- Ehrenstein, G. and H. Lecar (1977). "Electrically gated ionic channels in lipid bilayers." Q Rev Biophys **10**(1): 1-34.
- Ehret-Sabatier, L., D. Loew, *et al.* (1996). "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood." J Biol Chem **271**(47): 29537-44.
- Erspamer, G. F. and J. M. Cei (1970). "Biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus vilarsi melin*." Biochem Pharmacol **19**(2): 321-5.
- Erspamer, V., G. F. Erspamer, *et al.* (1979). "Occurrence and polymorphism of bombesin-like peptides in the gastrointestinal tract of birds and mammals." Gut **20**(12): 1047-56.
- Fales-Williams, A. J., K. A. Brogden, *et al.* (2002). "Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation." Vet Pathol **39**(6): 706-11.
- Fang, X. M., Q. Shu, *et al.* (2003). "Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood." Eur J Clin Invest **33**(1): 82-7.
- Fedders, H., R. Podschun, *et al.* (2010) "The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans." Int J Antimicrob Agents **36**(3): 264-6.
- Fennell, J. F., W. H. Shipman, *et al.* (1968). "Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom." Proc Soc Exp Biol Med **127**(3): 707-10.
- Finlay, B. B. and R. E. Hancock (2004). "Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?" Nat Rev Microbiol **2**(6): 497-504.
- Flucher, B. E., C. Lenglachner-Bachinger, *et al.* (1986). "Skin peptides in *Xenopus laevis*: morphological requirements for precursor processing in developing and regenerating granular skin glands." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2299-309.
- Fuchs, P. C., A. L. Barry, *et al.* (1998). "In vitro antimicrobial activity of MSI-78, a magainin analog." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1213-6.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer (1998). "Antimicrobial peptides of vertebrates." Curr Opin Immunol **10**(1): 41-4.
- Ganz, T., M. E. Selsted, *et al.* (1990). "Defensins." Eur J Haematol **44**(1): 1-8.
- Ganz, T., M. E. Selsted, *et al.* (1985). "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils." J Clin Invest **76**(4): 1427-35.
- Garcia, J. R., F. Jaumann, *et al.* (2001). "Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma

- membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction." Cell Tissue Res **306**(2): 257-64.
- Garcia, J. R., A. Krause, *et al.* (2001). "Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity." FASEB J **15**(10): 1819-21.
- Gazit, E., A. Boman, *et al.* (1995). "Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles." Biochemistry **34**(36): 11479-88.
- Ge, Y., D. L. MacDonald, *et al.* (1999). "In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin." Antimicrob Agents Chemother **43**(4): 782-8.
- Gennaro, R. and M. Zanetti (2000). "Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides." Biopolymers **55**(1): 31-49.
- Ghosh, D., E. Porter, *et al.* (2002). "Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5." Nat Immunol **3**(6): 583-90.
- Ghosh, S. K., T. A. Gerken, *et al.* (2007). "Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity." Clin Chem **53**(4): 757-65.
- Giansanti, F., M. T. Massucci, *et al.* (2005). "Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides." Biochem Biophys Res Commun **331**(1): 69-73.
- Gilbert, W., S. J. de Souza, *et al.* (1997). "Origin of genes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7698-703.
- Giovannini, M. G., L. Poulter, *et al.* (1987). "Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones." Biochem J **243**(1): 113-20.
- Goldman, M. J., G. M. Anderson, *et al.* (1997). "Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis." Cell **88**(4): 553-60.
- Gottler, L. M. and A. Ramamoorthy (2009). "Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin." Biochim Biophys Acta **1788**(8): 1680-6.
- Groisman, E. A. (1998). "The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal." Bioessays **20**(1): 96-101.
- Groisman, E. A., J. Kayser, *et al.* (1997). "Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments." J Bacteriol **179**(22): 7040-5.
- Guani-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, *et al.* (2010). "Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease." Clin Immunol **135**(1): 1-11.
- Guina, T., E. C. Yi, *et al.* (2000). "A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides." J Bacteriol **182**(14): 4077-86.

- Gunn, J. S., K. B. Lim, *et al.* (1998). "PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance." Mol Microbiol **27**(6): 1171-82.
- Gunn, J. S., S. S. Ryan, *et al.* (2000). "Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium." Infect Immun **68**(11): 6139-46.
- Guo, L., K. B. Lim, *et al.* (1997). "Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ." Science **276**(5310): 250-3.
- Guo, L., K. B. Lim, *et al.* (1998). "Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides." Cell **95**(2): 189-98.
- Hancock, R. E. (2000). "Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications." Expert Opin Investig Drugs **9**(8): 1723-9.
- Hancock, R. E. (2003). "Concerns regarding resistance to self-proteins." Microbiology **149**(Pt 12): 3343-4; discussion 3344-5.
- Hancock, R. E. and D. S. Chapple (1999). "Peptide antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1317-23.
- Hancock, R. E. and H. G. Sahl (2006). "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies." Nat Biotechnol **24**(12): 1551-7.
- Hara, T., Y. Mitani, *et al.* (2001). "Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study." Biochemistry **40**(41): 12395-9.
- Harder, J., J. Bartels, *et al.* (1997). "A peptide antibiotic from human skin." Nature **387**(6636): 861.
- Harder, J., J. Bartels, *et al.* (2001). "Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic." J Biol Chem **276**(8): 5707-13.
- He, K., S. J. Ludtke, *et al.* (1996). "Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores." Biophys J **70**(6): 2659-66.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, *et al.* (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-8.
- Hoover, D. M., K. R. Rajashankar, *et al.* (2000). "The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization." J Biol Chem **275**(42): 32911-8.
- Horne, W. S., C. M. Wiethoff, *et al.* (2005). "Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections." Bioorg Med Chem **13**(17): 5145-53.
- Huang, H. W. (2000). "Action of antimicrobial peptides: two-state model." Biochemistry **39**(29): 8347-52.

- Hultmark, D., H. Steiner, *et al.* (1980). "Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*." Eur J Biochem **106**(1): 7-16.
- Imura, Y., N. Choda, *et al.* (2008). "Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells." Biophys J **95**(12): 5757-65.
- Izadpanah, A. and R. L. Gallo (2005). "Antimicrobial peptides." J Am Acad Dermatol **52**(3 Pt 1): 381-90; quiz 391-2.
- Jacob, L. and M. Zasloff (1994). "Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin." Ciba Found Symp **186**: 197-216; discussion 216-23.
- Jenssen, H., J. H. Andersen, *et al.* (2004). "A wide range of medium-sized, highly cationic, alpha-helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus." Antiviral Res **64**(2): 119-26.
- Jenssen, H., J. H. Andersen, *et al.* (2004). "Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate." Antiviral Res **61**(2): 101-9.
- Jenssen, H., P. Hamill, *et al.* (2006). "Peptide antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **19**(3): 491-511.
- Jonard, L., L. Banh, *et al.* (2006) "Defensins in human health and disease" J ImmBio **21** 342-347.
- Jones, D. E. and C. L. Bevins (1992). "Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene." J Biol Chem **267**(32): 23216-25.
- Kawabata, S. and S. Iwanaga (1999). "Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab." Dev Comp Immunol **23**(4-5): 391-400.
- Kowalska, K., D. B. Carr, *et al.* (2002). "Direct antimicrobial properties of substance P." Life Sci **71**(7): 747-50.
- Lai, R., H. Liu, *et al.* (2002). "An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*." Biochem Biophys Res Commun **295**(4): 796-9.
- Lai, Y. and R. L. Gallo (2009). "AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense." Trends Immunol **30**(3): 131-41.
- Lamb, H. M. and L. R. Wiseman (1998). "Pexiganan acetate." Drugs **56**(6): 1047-52; discussion 1053-4.
- Lay, F. T. and M. A. Anderson (2005). "Defensins--components of the innate immune system in plants." Curr Protein Pept Sci **6**(1): 85-101.
- Lee, D. G., Y. Park, *et al.* (2004). "Structure-antiviral activity relationships of cecropin A-magainin 2 hybrid peptide and its analogues." J Pept Sci **10**(5): 298-303.
- Lehrer, R. I. (2004). "Primate defensins." Nat Rev Microbiol **2**(9): 727-38.

- Lehrer, R. I., A. Barton, *et al.* (1989). "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity." J Clin Invest **84**(2): 553-61.
- Lehrer, R. I. and T. Ganz (1999). "Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence." Curr Opin Immunol **11**(1): 23-7.
- Lehrer, R. I., D. Szklarek, *et al.* (1985). "Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity." Infect Immun **49**(1): 207-11.
- Lemaitre, B. and J. Hoffmann (2007). "The host defense of *Drosophila melanogaster*." Annu Rev Immunol **25**: 697-743.
- Leulier, F. (2003). "Analyse génétique de la réponse immunitaire des *Drosophila melanogaster*." Université Paris 7.
- Linzmeier, R., C. H. Ho, *et al.* (1999). "A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23." Gene **233**(1-2): 205-11.
- Lipsky, B. A., K. J. Holroyd, *et al.* (2008). "Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream." Clin Infect Dis **47**(12): 1537-45.
- Lopez, C. F., S. O. Nielsen, *et al.* (2006). "Probing Membrane Insertion Activity of Antimicrobial Polymers via Coarse-grain Molecular Dynamics." J Chem Theory Comput **2**(3): 649-655.
- Loury, D., J. R. Embree, *et al.* (1999). "Effect of local application of the antimicrobial peptide IB-367 on the incidence and severity of oral mucositis in hamsters." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **87**(5): 544-51.
- Mackin, W. M. (1998). "Neuprex XOMA Corp." IDrugs **1**(6): 715-23.
- Maloy, W. L. and U. P. Kari (1995). "Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides." Biopolymers **37**(2): 105-22.
- Manwaring, W. H. (1942). "Fleming's "Lysozyme"." Cal West Med **56**(1): 5.
- Matsuzaki, K., M. Harada, *et al.* (1991). "Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1063**(1): 162-70.
- Matsuzaki, K., O. Murase, *et al.* (1996). "An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation." Biochemistry **35**(35): 11361-8.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, *et al.* (1995). "Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2." Biochemistry **34**(10): 3423-9.
- McCann, K. B., A. Lee, *et al.* (2003). "The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures." J Appl Microbiol **95**(5): 1026-33.

- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Mendez-Samperio, P., L. Alba, *et al.* (2007). "Mycobacterium bovis-mediated induction of human beta-defensin-2 in epithelial cells is controlled by intracellular calcium and p38MAPK." J Infect **54**(5): 469-74.
- Moreno, M., A. Segura, *et al.* (1994). "Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens." Eur J Biochem **223**(1): 135-9.
- Mygind, P. H., R. L. Fischer, *et al.* (2005). "Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus." Nature **437**(7061): 975-80.
- Navon-Venezia, S., R. Feder, *et al.* (2002). "Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 689-94.
- Nijnik, A. and R. E. Hancock (2009). "The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications." Curr Opin Hematol **16**(1): 41-7.
- Nizet, V. (2006). "Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens." Curr Issues Mol Biol **8**(1): 11-26.
- Okuda, K., G. C. Edwards, *et al.* (1963). "Biosynthesis of gramicidin and tryocidine in the Dubos strain of *Bacillus brevis*. I. Experiments with growing cultures." J Bacteriol **85**: 329-38.
- Ong, P. Y., T. Ohtake, *et al.* (2002). "Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis." N Engl J Med **347**(15): 1151-60.
- Oren, Z., J. C. Lerman, *et al.* (1999). "Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity." Biochem J **341** ( Pt 3): 501-13.
- Ouellette, A. J. (2004). "Defensin-mediated innate immunity in the small intestine." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 405-19.
- Ourth, D. D., T. D. Lockey, *et al.* (1994). "Induction of cecropin-like and attacin-like antibacterial but not antiviral activity in *Heliothis virescens* larvae." Biochem Biophys Res Commun **200**(1): 35-44.
- Park, C. H., E. V. Valore, *et al.* (2001). "Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver." J Biol Chem **276**(11): 7806-10.
- Park, H. C., Y. H. Kang, *et al.* (2002). "Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage." Plant Mol Biol **50**(1): 59-69.
- Pauling, L., R. B. Corey, *et al.* (1951). "The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(4): 205-11.

- Peschel, A., M. Otto, *et al.* (1999). "Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides." J Biol Chem **274**(13): 8405-10.
- Pietrantonio, A., M. G. Ammendolia, *et al.* (2006). "Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection." Antiviral Res **69**(2): 98-106.
- Pouny, Y., D. Rapaport, *et al.* (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." Biochemistry **31**(49): 12416-23.
- Powers, J. P. and R. E. Hancock (2003). "The relationship between peptide structure and antibacterial activity." Peptides **24**(11): 1681-91.
- Quayle, A. J., E. M. Porter, *et al.* (1998). "Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract." Am J Pathol **152**(5): 1247-58.
- Radziszewsky, I. S., S. Rotem, *et al.* (2007). "Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers." Nat Biotechnol **25**(6): 657-9.
- Raj, P. A. and A. R. Dentino (2002). "Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity." FEMS Microbiol Lett **206**(1): 9-18.
- Resnick, N. M., W. L. Maloy, *et al.* (1991). "A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure." Cell **66**(3): 541-54.
- Rob, C. G. (1990). "Use of penicillin for venereal disease in World War II." Sex Transm Dis **17**(3): 156-7.
- Robinson, W. E., Jr., B. McDougall, *et al.* (1998). "Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils." J Leukoc Biol **63**(1): 94-100.
- Romeo, D., B. Skerlavaj, *et al.* (1988). "Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils." J Biol Chem **263**(20): 9573-5.
- Sai, K. P., P. N. Reddy, *et al.* (1995). "Investigations on wound healing by using amphibian skin." Indian J Exp Biol **33**(9): 673-6.
- Schauber, J., Y. Oda, *et al.* (2008). "Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Invest Dermatol **128**(4): 816-24.
- Schitteck, B., R. Hipfel, *et al.* (2001). "Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands." Nat Immunol **2**(12): 1133-7.
- Schroder, J. M. and J. Harder (2006). "[Innate antimicrobial peptides in the skin]." Med Sci (Paris) **22**(2): 153-7.
- Scott, M. G., E. Dullaghan, *et al.* (2007). "An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response." Nat Biotechnol **25**(4): 465-72.

- Selsted, M. E., D. M. Brown, *et al.* (1985). "Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils." J Biol Chem **260**(8): 4579-84.
- Selsted, M. E., D. M. Brown, *et al.* (1983). "Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages." J Biol Chem **258**(23): 14485-9.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette (2005). "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response." Nat Immunol **6**(6): 551-7.
- Shafer, W. M., X. Qu, *et al.* (1998). "Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1829-33.
- Shai, Y. (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides." Biopolymers **66**(4): 236-48.
- Shai, Y. and Z. Oren (2001). "From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides." Peptides **22**(10): 1629-41.
- Shaykhiev, R., C. Beisswenger, *et al.* (2005). "Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(5): L842-8.
- Shike, H., X. Lauth, *et al.* (2002). "Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge." Eur J Biochem **269**(8): 2232-7.
- Sieprawska-Lupa, M., P. Mydel, *et al.* (2004). "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4673-9.
- Silverstein, K. A., W. A. Moskal, Jr., *et al.* (2007). "Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants." Plant J **51**(2): 262-80.
- Simmaco, M., G. Mignogna, *et al.* (1998). "Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?" Biopolymers **47**(6): 435-50.
- Simmaco, M., G. Mignogna, *et al.* (1996). "Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*." Eur J Biochem **242**(3): 788-92.
- Skarnes, R. C. and D. W. Watson (1957). "Antimicrobial factors of normal tissues and fluids." Bacteriol Rev **21**(4): 273-94.
- Smith, J. J., S. M. Travis, *et al.* (1996). "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." Cell **85**(2): 229-36.
- Sodeinde, O. A., Y. V. Subrahmanyam, *et al.* (1992). "A surface protease and the invasive character of plague." Science **258**(5084): 1004-7.

- Sorensen, O., K. Arnljots, *et al.* (1997). "The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils." Blood **90**(7): 2796-803.
- Sorensen, O. E., L. Gram, *et al.* (2003). "Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina." J Biol Chem **278**(31): 28540-6.
- Steinberg, D. A., M. A. Hurst, *et al.* (1997). "Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity." Antimicrob Agents Chemother **41**(8): 1738-42.
- Stotz, H. U., J. G. Thomson, *et al.* (2009). "Plant defensins: defense, development and application." Plant Signal Behav **4**(11): 1010-2.
- Stumpe, S. and E. P. Bakker (1997). "Requirement of a large K<sup>+</sup>-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*." Arch Microbiol **167**(2/3): 126-36.
- Supp, D. M., A. C. Karpinski, *et al.* (2004). "Expression of human beta-defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes." Burns **30**(7): 643-8.
- Tam, J. P., Y. A. Lu, *et al.* (2002). "Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized beta -strand antimicrobial peptides." J Biol Chem **277**(52): 50450-6.
- Tang, Y. Q., J. Yuan, *et al.* (1999). "A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins." Science **286**(5439): 498-502.
- Tasiemski, A., F. Vandebulcke, *et al.* (2004). "Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*." J Biol Chem **279**(30): 30973-82.
- Territo, M. C., T. Ganz, *et al.* (1989). "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils." J Clin Invest **84**(6): 2017-20.
- Tjabringa, G. S., K. F. Rabe, *et al.* (2005). "The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung." Pulm Pharmacol Ther **18**(5): 321-7.
- Tossi, A., L. Sandri, *et al.* (2000). "Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **55**(1): 4-30.
- Tossi, A., M. Scocchi, *et al.* (1997). "An approach combining rapid cDNA amplification and chemical synthesis for the identification of novel, cathelicidin-derived, antimicrobial peptides." Methods Mol Biol **78**: 133-50.
- Tran, D., P. A. Tran, *et al.* (2002). "Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides." J Biol Chem **277**(5): 3079-84.

- Valore, E. V., C. H. Park, *et al.* (1998). "Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues." J Clin Invest **101**(8): 1633-42.
- van Abel, R. J., Y. Q. Tang, *et al.* (1995). "Synthesis and characterization of indolicidin, a tryptophan-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils." Int J Pept Protein Res **45**(5): 401-9.
- van Dijk, A., E. J. Veldhuizen, *et al.* (2008). "Avian defensins." Vet Immunol Immunopathol **124**(1-2): 1-18.
- Vaz Gomes, A., A. de Waal, *et al.* (1993). "Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes." Biochemistry **32**(20): 5365-72.
- Visser, L. G., P. S. Hiemstra, *et al.* (1996). "Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes." Infect Immun **64**(5): 1653-8.
- Wang, T. T., F. P. Nestel, *et al.* (2004). "Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression." J Immunol **173**(5): 2909-12.
- Westerhoff, H. V., M. Zasloff, *et al.* (1995). "Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes." Eur J Biochem **228**(2): 257-64.
- Wong, J. H., L. Xia, *et al.* (2007). "A review of defensins of diverse origins." Curr Protein Pept Sci **8**(5): 446-59.
- Yamaguchi, Y., T. Nagase, *et al.* (2002). "Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice." J Immunol **169**(5): 2516-23.
- Yang, D., A. Biragyn, *et al.* (2004). "Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense." Annu Rev Immunol **22**: 181-215.
- Yang, L., T. A. Harroun, *et al.* (2001). "Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores." Biophys J **81**(3): 1475-85.
- Yasin, B., M. Pang, *et al.* (2000). "Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **19**(3): 187-94.
- Yeaman, M. R. and N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zaiou, M. (2007). "Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases." J Mol Med **85**(4): 317-29.
- Zairi, A., F. Tangy, *et al.* (2009). "Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides-a mini review." J Biomed Biotechnol **2009**: 452567.
- Zanetti, M. (2004). "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity." J Leukoc Biol **75**(1): 39-48.

- Zasloff, M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5449-53.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.
- Zasloff, M. (2006). "Defending the epithelium." Nat Med **12**(6): 607-8.
- Zasloff, M., B. Martin, *et al.* (1988). "Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(3): 910-3.
- Zhang, L., J. Parente, *et al.* (2005). "Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2921-7.
- Zhu, S. (2007). "Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins." Immunogenetics **59**(12): 949-54.

## **REFERENCES WEB**

**The Antimicrobial Peptide Data Base** : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 1** : <http://www.science-et-vie.net/img/illustrations/S/structure-chimique-commune-acide-amine.png>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 6** :

[http://www.genscript.com/product\\_001/rec\\_peptide/code/RP11235/category/peptide/Bactenecin\\_bovine.html](http://www.genscript.com/product_001/rec_peptide/code/RP11235/category/peptide/Bactenecin_bovine.html), dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 7** :

[http://www.genscript.com/product\\_001/rec\\_peptide/code/RP11235/category/peptide/Bactenecin\\_bovine.htm](http://www.genscript.com/product_001/rec_peptide/code/RP11235/category/peptide/Bactenecin_bovine.htm), dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 12** : [http://lea.univ-lille1.fr/Menu\\_du\\_Site/activites%20du%20laboratoire/resultats.htm](http://lea.univ-lille1.fr/Menu_du_Site/activites%20du%20laboratoire/resultats.htm), dernière visite le 01/11/2010.

**Article en ligne Marshall et al.** : <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/1/1.pdf>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 14** : <http://www.ecosociosystemes.fr/pgramplus.jpg>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 15** : <http://www.ecosociosystemes.fr/pgrammoins.jpg>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 16** : <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/images/cellule/membrane.jpg>, dernière visite le 01/11/2010.

**Figure 31** : [http://www.rcsb.org/pdb/images/2k6o\\_asym\\_r\\_500.jpg](http://www.rcsb.org/pdb/images/2k6o_asym_r_500.jpg), dernière visite le 01/11/2010.

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Structure d'un acide aminé .....	14
Figure 2 : Différentes structures des peptides antimicrobiens.....	16
Figure 3 : Structure et séquence en AA de la Cathélicidine LL-37.....	23
Figure 4 : Structure de peptides linéaires riches en certains AA.....	23
Figure 5 : Structure et séquence en AA de l'indolicidine chez le Bovin .....	25
Figure 6 : Structure et séquence en AA de la bacténécine .....	26
Figure 7 : Structure de l'hepcidine.....	27
Figure 8 : Structure de la drosomycine.....	28
Figure 9 : Structure de deux molécules de l' $\alpha$ -défensine humaine HNP-3 .....	29
Figure 10 : Structures tri-dimensionnelles d'une $\alpha$ -défensine humaine HNP-3 (a) et d'une $\beta$ - défensine humaine hBD-1 (b) .....	30
Figure 11 : Structure de la $\theta$ -défensine RTD-1 .....	30
Figure 12 : Séquence en AA et représentation des ponts disulfure de la théromacine.....	31
Figure 13 : Structure de la magainine 2.....	36
Figure 14 : Structures tridimensionnelles des défensines.....	41
Figure 15 : Alignement des $\alpha$ -défensines humaines et positionnement des ponts disulfure	42
Figure 16 : Alignement des $\beta$ -défensines humaines et positionnement des ponts disulfure	43
Figure 17 : Structure de la $\theta$ -défensine.....	45
Figure 18 : Structure génétique des $\alpha$ (A) et $\beta$ (B) défensines humaines .....	46
Figure 19 : Structure de la LL-37 .....	49

Figure 20 : Arrangement du gène de la cathélicidine humaine LL-37 .....	51
Figure 21 : Structure du peptidoglycane.....	56
Figure 22 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif .....	57
Figure 23 : Description de la paroi des bactéries à Gram négatif.....	58
Figure 24 : Schéma d'une membrane plasmique de bactérie.....	59
Figure 25 : Mécanisme d'attraction.....	63
Figure 26 : Modèle en "douve de tonneaux" .....	66
Figure 27 : Modèle des "pores toroïdaux" .....	67
Figure 28 : Modèle en tapis .....	69
Figure 29 : Mode d'action intracellulaire des PAM.....	70
Figure 30 : Modèle proposé par Shai-Matsuzaki-Huang .....	73
Figure 31 : Mécanisme hypothétique d'apprêtement et de pénétration d'un PAM.....	75
Figure 32 : Comparaison des voies Toll, ImD, TLR et TNF-R1 .....	91
Figure 33 : Immunité innée et adaptative .....	92
Figure 34 : Structure du Pexiganan .....	110

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Nomenclature des acides-aminés .....	15
Tableau II : Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens .....	17
Tableau III : Activité antimicrobienne de la magainine 2 .....	38
Tableau IV : Récapitulatif des différents modes d'action antimicrobien .....	72
Tableau V : Spectre d'action des défensines envers les bactéries .....	76
Tableau VI : Spectre d'activité antivirale des PAM.....	79
Tableau VII : Activité du PAM Ci-MAM-A24 contre des bactéries multi-résistantes.....	97
Tableau VIII : Peptides antimicrobiens cationiques en développement clinique.....	109
Tableau IX : CMI de souches bactériennes et pourcentage d'inhibition par le Pexiganan ou l'ofloxacin selon la littérature.....	112

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 1<sup>er</sup> décembre 2010DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Anne-Sophie MICHEL épouse LAUSCH

Sujet : A la Découverte des Peptides AntimicrobiensJury :

Président : Mme Chantal FINANCE, PU-PH

Directeur : M. Raphaël DUVAL, MCF

Juges : M. Marc MERTEN, MCU-PH

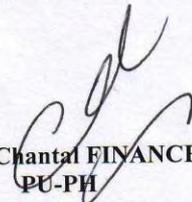
Melle Marion GRARE, AHU

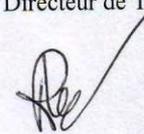
Vu,

Nancy, le 05 novembre 2010

Le Président du Jury

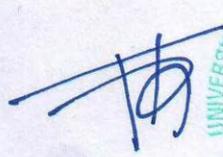
Le Directeur de Thèse

  
 Mme Chantal FINANCE  
 PU-PH

  
 M Raphaël E. DUVAL  
 MCF

Vu et approuvé,

Nancy, le 08.11.10

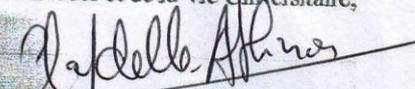
Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,
  
 Francine PAULUS


Vu,

Nancy, le 16.11.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

 Pour le Président  
 et par Délégation,  
 La Vice-Présidente du Conseil  
 des Etudes et de la Vie Universitaire,

  
 Jean-Pierre FINANCE  
 C. CAPDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3488



N° d'identification : 3488

**TITRE**

# A la découverte des Peptides Antimicrobiens

Thèse soutenue le 1<sup>er</sup> Décembre 2010

Par **Anne-Sophie MICHEL** épouse **LAUSCH**

**RESUME**

Découverts au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les Peptides AntiMicrobiens (PAM) sont depuis considérés comme des effecteurs clés de l'immunité innée. Cathélicidines, défensines, magainines ... autant de noms différents qui soulignent la diversité, la complexité et l'importance croissante donnée aux PAM. A ce jour plus de 1500 ont été découverts, et ce dans un très grand nombre d'organismes, très différents : insectes, plantes, mammifères. Ces PAM présentent aussi des activités très diverses : antibactérienne, antifongique, antivirale ou antiparasitaire. Ce travail a pour but de présenter : les grandes familles de PAM, leur variété de structure, les mécanismes d'action supposés (principalement antibactérien et antiviral) et leur rôle dans l'immunité. Il met également l'accent sur le développement clinique et une possible utilisation en thérapeutique de ces PAM, soulignant l'intérêt que ces derniers pourrait représenter, pour répondre à l'urgence de trouver de nouvelles molécules antibactériennes. En effet, l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques nécessite la recherche de nouveaux anti-infectieux ; les PAM pourraient alors y trouver toute leur place.

**MOTS CLES**

Peptides antimicrobiens, immunité, mécanismes d'action, spectre d'activité, antibactérien, antiviral, antifongique, mécanisme de résistance, peptides cationiques, magainines, défensines, cathélicidines.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. Raphaël DUVAL	Laboratoire de Microbiologie clinique	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème : 3-Médicament

**Thèmes**    1 – Sciences fondamentales    2 – Hygiène/Environnement  
                  3 – Médicament                    4 – Alimentation – Nutrition  
                  5 - Biologie                            6 – Pratique professionnelle