

THÈSE

pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Adrienne MARCHAND

CARACTERISATION ET ETUDE DU MODE D'ACTION DE PEPTIDES ANTI-LEGIONELLA

Directeur de Thèse : Jean-Marc BERJEAUD

Soutenue le 02 décembre 2011, devant la Commission d'Examen :

Rapporteurs : *M. Alain DUFOUR* *Professeur, Université de Bretagne Sud*
M. Thierry JOUENNE *Directeur de Recherche, CNRS, Université de Rouen*

Examineurs : *M. Thierry BERGÈS* *Professeur, Université de Poitiers*
M. Erick J. DUFOURC *Directeur de recherche, CNRS, Université de Bordeaux*
M. Jean-Marc BERJEAUD *Maitre de Conférences, Université de Poitiers*

A ma mère, sans qui tout cela n'aurait pas été possible...Merci pour tout...

Remerciements

Voilà, la thèse est rédigée, il me reste maintenant à écrire la partie la plus difficile que sont les remerciements. Depuis mon premier stage en L3, voilà maintenant six ans que je suis dans ce labo, j'ai donc vu passer un certain nombre de personnes. Je vais essayer d'être exhaustive dans les lignes qui suivent, excusez moi par avance si j'oublie certains d'entre vous.

Je vais commencer ces remerciements de façon non « protocolaire » avec la personne la plus importante pour moi dans ce labo, **Jean-Marc Berjeaud**. Tu m'as accepté pour la première fois en stage en Licence, petite stagiaire timide que j'étais. Depuis, je n'ai pas voulu avoir d'autre chef que toi. Je dois te remercier pour tout. Tu m'as donné goût à la biochimie, à la recherche, et même à l'enseignement (qui l'eût cru...). Tu m'as appris beaucoup de choses au niveau professionnel, à être une chercheuse, à avoir l'esprit critique, à être autonome, à « foncer dans le tas »... Mais si tu es le meilleur chef dont on puisse rêver, c'est aussi parce qu'en plus d'être un bon chercheur et un bon enseignant, tu es une super personne, sous tes airs de râleur... Tu as toujours été présent pour moi. A chacun de mes coups de mou, à chaque manip qui voulait pas marcher (et il y en a eu), il suffisait que j'aie te voir pour que ça aille mieux. Tu as toujours pris le temps, même quand tu n'en avais pas, pour parler des problèmes, rassurer, remonter le moral. Et que dire de la rédaction de la thèse, c'est grâce à toi aussi si elle s'est aussi bien passée. Ces mots sont bien faibles, mais merci pour tout Jean-Marc, je suis heureuse de t'avoir eu comme chef et collègue toutes ces années.

Je reviens maintenant au « protocole »... Je voudrais donc tout d'abord remercier **Jacques Frère** d'avoir accepté de m'accueillir dans son labo durant toutes ces années.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **Alain Dufour**, Professeur à l'Université de Lorient et Monsieur **Thierry Jouenne**, Directeur de recherche à l'Université de Rouen, d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail. Je remercie également chaleureusement Monsieur **Thierry Bergès**, Professeur à l'Université de Poitiers, et Monsieur **Erick J. Dufourc**, Directeur de recherche à l'Université de Bordeaux, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Monsieur Dufourc, je souhaiterais aussi vous remercier, ainsi que **Cécile Courrèges** et **Axelle Grélard**, de m'avoir si gentiment accueilli dans votre laboratoire. Ces trois semaines à Bordeaux se sont merveilleusement bien passées. Vous m'avez tous les trois fait me sentir comme « chez moi ». Malgré ma méconnaissance complète de la biophysique, vous m'avez laissé manipuler l'appareil RMN, ce qui m'a permis de mieux comprendre cette technique. Je vous remercie également pour les heures passées à m'expliquer de façon simple et claire la théorie de cette difficile technique et à m'aider à traiter mes résultats. Merci beaucoup.

Je voudrais aussi remercier **Christian Lacombe**, notre Cricri, mon chef biker !! Tu es parti à la retraite au bon moment, juste pour échapper au dur labeur de correction de manuscrit. Toi aussi, je t'estime

beaucoup, aussi bien le chercheur (avec toutes tes idées farfelues plutôt malignes au final) que la personne. Même si tu ne faisais pas beaucoup de bruit (mis à part la musique classique qui sortait de ton bureau...), tu as quand même laissé un vide dans l'aile A. Profites bien de ta retraite Cricri, et j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir de temps en temps.

Yann Héchard, je te remercie également pour toutes ces années. J'ai souvent été la râleuse lors des réunions d'organisation (je laisse ma place à Clémence, Mathieu et les autres pour ça maintenant) mais au final, le labo ne tourne pas si mal que ça maintenant. Merci aussi pour l'année de conseils en bio mol pour essayer de trouver ce foutu gène de la WRK. Faute de le trouver, j'aurais au moins appris l'espoir et l'acharnement...

Passons aux étudiants maintenant, dans le désordre...

Je vais bien sur commencer par mon grand pote **Juju** (t'es plus étudiant mais désolé, je ne peux pas te voir comme un des chefs...), mon caliméro préféré. Avant d'être collègues, j'ai été ta stagiaire (bizarre ça d'ailleurs ☺), ta padawan comme tu dis. Mais tu es aussi mon ami, avec qui j'ai partagé de nombreuses confidences, soirées et heures de JdR (d'ailleurs, on recommence quand ???). J'espère que notre amitié durera longtemps !!! Une nouvelle étape de ta vie commence pour toi, qu'elle soit heureuse.

Nico, le roi du rhum arrangé, tu ne fais plus parti du labo, mais c'est tout comme. Toi aussi, tu es mon ami, même si on ne se voit pas assez souvent. Ah !! On en a passé des heures devant l'HPLC à essayer de caser le plus de « run » dans la journée (tu es le grand gagnant pour ça) ou dans la salle ADN à espérer trouver ce gène. Tu as réussi à faire de moi une mini « biomologiste » débutante, moi qui ne jurait que par la biochimie... Merci pour ces quelques années.

Clémence, ma stagiaire de toujours, maintenant devenue grande... Avec toi aussi, j'en ai passé des heures devant l'HPLC, à rater des pics parce qu'on était plongées dans des conversations surtout pas scientifiques. On est vraiment différentes et pourtant ça colle plutôt bien entre nous. Je te souhaite une thèse et une longue carrière scientifique. Même si des fois tu en doutes, tu es faite pour ça, aies confiance en toi !

Je voudrais remercier **Luëti**, partie depuis déjà bien longtemps du labo, mais pas oubliée, même si on ne trouve pas le temps de se donner souvent des nouvelles. Tu m'a guidé quand je suis arrivée dans ce labo, une vraie maman ☺. Je te souhaite de trouver ta voie, enfin.

Je remercie également ma collègue de bureau, de thèse et de galères, **Aicha**. Je te souhaite que ta thèse se passe bien et que tu partes très vite de Poitiers (c'est gentil, hein...). Je suis sûre que même si ces trois années ont parfois été difficiles pour les raisons qu'on connaît, ça t'aura permis de grandir, d'apprendre à

te connaître, et au final, ça ne sera que du positif. Même si tu ne veux plus jamais remettre les pieds à Poitiers, j'espère qu'on restera en contact par la suite.

Oulà, déjà la troisième page qui commence. Je vais faire un tir groupé, histoire de ne pas écrire une « thèse » de remerciements... Je remercie pour ces bons moments passés au labo, **Mathieu**, dit Lulu, et sa collègue du « bureau des plaintes » **Emilie**, la trollinette. Je compte sur vous pour continuer à râler, c'est comme ça qu'on vous aime. **Renaud**, toujours moqueur et jamais perdant à un jeu (faut que ça cesse...). Je te souhaite beaucoup de courage pour cette thèse qui s'annonce remplie « d'aventures », et j'attends que tu la finisses pour monter notre manga-game bar. Je remercie également les « anciens », **Nono** (toujours (ou presque) de bonne humeur), **Momo**, mon **Jean-Fa**, **Nawel** et j'en oublie sûrement.

Il me reste à remercier quelques personnes, si importantes dans le labo. **Steph**, grâce à toi, les TP tournent si bien. Tu fais un boulot fou, et je te souhaite d'un jour enfin trouver un poste digne de toi.

Je voudrais également remercier mes trois ragoteurs préférés (ça existe ce mot ?). **Marie-Claude**, la « bonne à tout » comme tu disais récemment. Ça avait très très mal commencé entre nous, et finalement tout s'est arrangé, et c'est une bonne chose. **Karine**, la secrétaire préférée du labo, merci pour tous ces ennuis administratifs que tu nous as évités. Toutes les deux je vous remercie de tout le boulot que vous faites, qui nous permet de nous consacrer sereinement à la recherche sans gérer tout ça. Enfin, le troisième ragoteur, mon **Dada**, merci pour tes spectres et tes séquences, et surtout pour tes tartes aux fraises légendaires (c'est le mot...légendaire...) et ta (trop ?) bonne humeur. Tous les trois, merci pour ces moments de papotage qu'on a partagé, ça m'a souvent permis d'oublier un moment la galère des manips qui marchent pas...

Je tiens aussi à remercier les « Biocydex », **Marie**, **Manil** et **Fred**. Merci de m'avoir permis de manipuler chez vous. Ces derniers mois, j'ai passé plus de temps chez vous qu'à ma paillasse. **Manil**, tu es parti pour de nouvelles aventures qui seront, j'en suis sûre, heureuses. Merci pour les conseils et encouragements que tu m'as prodigués, notamment quand je voyais les mois passer mais aucun résultat arriver. **Marie**, merci aussi, et bon courage dans ce grand bureau, qui j'espère se remplira à nouveau.

Je voudrais enfin remercier tous les autres étudiants ou permanents que j'ai pu croiser tout au long de ces années, et qui m'ont tous apporté quelque chose, au niveau professionnel ou humain (**Martine**, **Frank**, **Véronique**, **Emile**, **Karline**, **Pascale**, **Clémence Julien**, **Sylvain**, **Audrey**, **Ludivine**, **Dom...** et tous les autres. Merci à vous.

Finalement, je voudrais terminer comme j'ai commencé, par une personne très importante pour moi, **Mika**. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour la patience dont tu as fait preuve, notamment ces derniers mois, et pour le soutien que tu m'as apporté lors de mes nombreux coups de mou. Sans toi, je ne sais pas si je serais aujourd'hui en train d'écrire ces remerciements, signes d'une thèse bientôt soutenue... Tu n'as connu de moi que le stress, la fatigue, le manque de temps et le ras-le-bol d'une troisième année de thèse et de sa rédaction. Plus que deux mois à tenir chéri...après je serais libre le soir, le week-end, de bonne humeur, et pourrais parler d'autres choses que de la thèse, la thèse et encore la thèse. Je t'aime.

SOMMAIRE

<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i>	1
<i>LISTE DES FIGURES</i>	3
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	7
<i>INTRODUCTION GÉNÉRALE</i>	9
<i>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	13
I. <i>Legionella pneumophila</i>	15
A. Généralités	15
1. Historique	15
2. Taxonomie	15
3. Caractéristiques	15
B. Ecologie	16
1. Interaction avec les protozoaires	16
2. Interaction avec les biofilms	18
C. Légionellose.....	19
D. Lutte contre <i>Legionella</i>	20
1. Agents désinfectants	21
2. Traitements biologiques	21
II. Les peptides antimicrobiens.....	23
A. Généralités	23
1. Les peptides produits par les organismes supérieurs	24
2. Les peptides produits par les bactéries	26
B. Les peptides produits par les bactéries du genre <i>Staphylococcus</i>	28
1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	29
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3. <i>Staphylococcus warneri</i>	36
4. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	38
5. <i>Staphylococcus cohnii</i>	39
6. <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	40
7. <i>Staphylococcus hominis</i>	41

8.	<i>Staphylococcus intermedius</i>	41
9.	<i>Staphylococcus simulans</i>	42
III.	Mécanismes d'action des peptides antibactériens.....	43
A.	Mode d'action	43
1.	Interaction initiale du peptide avec la membrane.....	44
2.	Perturbation de la membrane	45
3.	Perturbation du fonctionnement de la cellule.....	48
B.	Etudes structure-activité	48
1.	Méthodes utilisées	48
2.	Paramètres physico-chimiques.....	49
IV.	Les membranes biologiques	59
A.	Généralités	59
B.	Les phospholipides membranaires	61
1.	Chez les procaryotes.....	62
2.	Chez les eucaryotes	64
3.	Chez <i>Legionella pneumophila</i>	66
C.	Les acides gras.....	66
1.	Chez les procaryotes.....	68
2.	Chez les eucaryotes	69
3.	Chez <i>Legionella pneumophila</i>	70
MATÉRIELS & MÉTHODES.....		73
I.	Cellules et conditions de culture	75
A.	Cellules procaryotes	75
1.	<i>Legionella</i> spp.....	75
2.	<i>Staphylococcus</i> spp.....	76
3.	Autres souches bactériennes.....	76
B.	Cellules eucaryotes.....	77
1.	Cellules mononucléées humaines	77
2.	Cellules cancéreuses.....	78
II.	Evaluation de l'activité des souches, surnageants de culture, ou peptides des <i>Staphylococcus</i> contre les cellules étudiées	78
A.	Activité antibactérienne	78
1.	Spectre d'activité.....	78

2.	Mesure de la concentration minimale inhibitrice.....	79
3.	Mesure de la concentration minimale de perméabilisation (CMP) et de l'activité bactéricide.....	79
4.	Microscopie électronique à balayage.....	80
B.	Activité hémolytique.....	81
C.	Activité contre les CMN et les cellules cancéreuses.....	81
1.	Cytométrie en flux.....	81
2.	Comptage au bleu de Trypan.....	82
III.	Techniques séparatives et analytiques.....	82
A.	Etude des peptides.....	82
1.	Peptides synthétiques.....	82
2.	Préparation du surnageant de culture des <i>Staphylococcus</i>	82
3.	Chromatographie d'interaction hydrophobe.....	82
4.	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse.....	83
5.	Spectrométrie de masse ESI-MS.....	83
6.	Dosage protéique.....	83
B.	Etude des lipides.....	84
1.	Extraction des lipides totaux.....	84
2.	Dosage des phospholipides.....	84
3.	Préparation des « multi-lamellar vesicles » (MLVs).....	85
4.	Mesure de la libération de calcéine.....	86
IV.	Techniques de biophysique.....	86
A.	RMN du solide.....	86
B.	Dichroïsme circulaire.....	88
	RÉSULTATS.....	89
I.	Identification de peptides anti- <i>Legionella</i> produits par <i>Staphylococcus</i>	91
A.	Publication 1: Anti- <i>Legionella</i> activity of staphylococcal hemolytic peptides.....	91
B.	Résultats complémentaires.....	95
1.	Activités supplémentaires des <i>Staphylococcus</i>	95
2.	Spectre d'activité des souches de <i>Staphylococcus</i> produisant des peptides anti- <i>Legionella</i>	97
3.	Dichroïsme circulaire.....	98
II.	Etude structure-activité de la WRK et la PSM α , deux peptides anti- <i>Legionella</i>	103

A.	Publication 2: Effect of aminoacid substitution in the staphylococcal peptides warnericin RK and PSM α on their anti- <i>Legionella</i> and hemolytic activities	103
B.	Résultats complémentaires	109
1.	Rôle de la lysine chez la PSM α	109
2.	Spectre d'activité.....	112
3.	Résultats préliminaires : capacité des peptides à perméabiliser différents types de liposomes.	114
4.	Sensibilité de <i>L. pneumophila</i> Lens à différents composés chimiques.....	116
III.	Résultats complémentaires concernant la WRK.....	119
A.	Interaction du peptide avec les membranes	119
1.	Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide	119
2.	Microscopie électronique à balayage	146
B.	Activité anti-cancéreuse de la warnéricine RK.....	148
1.	Activité de la WRK contre des cellules cancéreuses.	148
2.	Activité de la WRK contre des cellules mononuclées saines.....	152
	CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	155
	ANNEXES.....	161
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
agr	“Accessory Gene Regulator”
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCA	Acide Bicinchoninique
BCYE	“Buffered Charcoal Yeast Extract”
BHI	“Brain Heart Infusion”
BYE	“Buffered Yeast Extract”
CL	Cardiolipide
CLM	Concentration de Lyse de MLVs
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMP	Concentration Minimale de Perméabilisation
DO_{600nm}	Densité Optique à 600 nm
DSMZ	“Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ESI-MS	Spectrométrie de masse en électrospray
FID	Free Induction Decay
GGI	Gonococcal Growth Inhibitor
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
IMIB	“Institut für Molekulare InfektionBiologie”
IP	Iodure de Propidium
kb	KiloBase
kDa	KiloDalton
kHz	KiloHertz
LCV	“ <i>Legionella</i> Containing Vacuole”
LCME	Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l’Eau
LLAP	“ <i>Legionella</i> -Like Amoebal Pathogens”
LPG	LysoPhosphatidylGlycérol
LPS	LipoPolySaccharide
MLV	“Multi-Lamellar Vesicles”

MOPS	Acide 3-(N-Morpholino)PropaneSulfonique
NAG	Acide N-Acétyl-Glucosamine
NAM	Acide N-Acétyl- Muramique
ND	Non Déterminé
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylEthanolamine
PG	PhosphatidylGlycérol
PI	PhosphatidylInositol
P/L	Peptide/Lipide
ppm	Partie Par Million
PS	PhosphatidylSérine
PSM	“Phenol-Soluble Modulin”
PTG	Peptidoglycane
R_i	Ratio peptide/lipide
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotation Par Minute
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Positif
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Positif
SLUSH	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> Synergistic Hemolysin
SM	SphingoMyéline
TAR	Tour Aéro-Réfrigérante
TFA	Acide TriFluoroAcétique
TFE	TrifluoroEthanol
v/v	Volume/Volume
UA	Unité Arbitraire
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet
WRK	Warnéricine RK

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i> dans les protozoaires	17
Figure 2.	Développement d'un biofilm et relargage des <i>Legionella</i> dans un système de distribution d'eau	19
Figure 3.	Structures tridimensionnelle des peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs	24
Figure 4.	Structure tridimensionnelle de la mélittine	25
Figure 5.	Structure tridimensionnelle de la δ -lysine	33
Figure 6.	Le système de quorum sensing <i>agr</i> chez <i>S. aureus</i>	34
Figure 7.	Séquences des différentes PSMs produites par <i>S. aureus</i>	35
Figure 8.	Structure 3D de la WRK obtenue par RMN en présence de 8 % de TFE	37
Figure 9.	Alignement de séquence de la PSM β de <i>S. epidermidis</i> , des GGI de <i>S. haemolyticus</i> et des SLUSH de <i>S. lugdunensis</i>	39
Figure 10.	Modèles de perméabilisation des membranes par les peptides antimicrobiens	43
Figure 11.	Modèle « detergent-like »	47
Figure 12.	Fréquences relatives de chaque type de résidu (hydrophobe, polaire chargé ou polaire neutre) en fonction de sa position dans l'hélice α	50
Figure 13.	Distribution des peptides antibactériens en hélice α amphiphile en fonction de leur charge nette, leur composition en résidus hydrophobe et leur amphipathie.....	51
Figure 14.	Importance de la charge des phospholipides sur l'activité des peptides cationiques en hélice alpha amphiphile	53
Figure 15.	Illustration de l'influence de l'angle polaire sur l'insertion dans les membranes composées de POPG chargé négativement et de POPC neutre	56
Figure 16.	Interconnection entre les différents paramètres physico-chimiques des peptides antimicrobiens	57
Figure 17.	Enveloppe des bactéries à Gram négatif et à Gram positif	60
Figure 18.	Structure des principaux phospholipides membranaires	61
Figure 19.	Composition membranaire et distribution des phospholipides entre les feuillets internes et externes de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes	65
Figure 20.	Structure des différents acides gras retrouvés dans les phospholipides membranaires, et leur rôle dans la fluidité membranaire	67

Figure 21.	Représentation de la séparation des cellules mononucléées à l'aide d'un gradient de Ficoll	78
Figure 22.	Courbes étalons des standards de phospholipides.....	85
Figure 23.	Spectres dichroïques caractéristiques des principales structures secondaires des peptides	99
Figure 24.	Spectres dichroïques obtenus pour la WRK, la f-WRK, la PSM α et la f-PSM α	99
Figure 25.	Alignement des séquences des peptides synthétiques de la famille « PSM-K to PSM-R »	109
Figure 26.	Représentation schématique de l'insertion des peptides PSM α , f-PSM α , PSM_7R et PSM_22R dans les membranes de <i>Legionella</i>	112
Figure 27.	Mesure des CMI de différents composés chimiques	116
Figure 28.	Profils d'élution de la PSM_13R en fonction des conditions de solubilisation.....	117
Figure 29.	Orientation des noyaux au sein d'un champ magnétique B ₀ orienté parallèlement à l'axe z	119
Figure 30.	Représentation des trois principales étapes d'une expérience de RMN et de l'obtention du spectre RMN.....	121
Figure 31.	Formes des spectres RMN du phosphore en fonction de la phase lipidique.....	122
Figure 32.	Formes des spectres RMN du deutérium en fonction des mouvements moléculaires des lipides.....	123
Figure 33.	Exemple de détermination de l'éclatement quadrupolaire de la position plateau et de la position 16 sur un spectre RMN du deutérium.....	125
Figure 34.	Spectres RMN du phosphore des membranes modèles en présence de différentes concentrations de WRK.....	128
Figure 35.	Spectres RMN du deutérium des membranes modèles en présence de différentes concentrations de WRK.....	130
Figure 36.	Superposition des spectres obtenus pour les membranes modèles à 30°C et à 43°C à R _i = ∞ et R _i = 10.....	132
Figure 37.	Eclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions 16 et plateau des spectres du deutérium des membranes modèles en fonction de la température.....	133
Figure 38.	Résultats de l'analyse par RMN du phosphore en rotation à 10 kHz des membranes modèles à R _i = ∞ et R _i = 10, et résultats de la simulation des ces spectres à l'aide d'un programme en FORTRAN.	134
Figure 39.	Spectres RMN du phosphore des membranes naturelles en présence de différentes concentrations de WRK.....	136

Figure 40.	Superposition des spectres RMN du phosphore obtenus à $R_i = 10$ à 37°C pour les membranes naturelles et pour les membranes modèles.....	138
Figure 41.	Spectres RMN du deutérium des membranes naturelles en présence de différentes concentrations de WRK.....	139
Figure 42.	Calcul des premiers moments spectraux en fonction de la température pour les membranes modèles et naturelles à $R_i = \infty$ en RMN du deutérium.....	140
Figure 43.	Superposition des spectres obtenus pour les membranes naturelles à 30°C à et $R_i = 10$	141
Figure 44.	Eclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions 16 et plateau des spectres du deutérium des membranes naturelles en fonction de la température.....	142
Figure 45.	Schéma représentant « l'effet de coin » pouvant être induit par l'interaction de la WRK à la membrane.....	144
Figure 46.	Représentation du phénomène de « mismatch » hydrophobe lorsque le peptide est plus long ou plus court que l'épaisseur de la membrane.....	145
Figure 47.	Microscopie électronique à balayage de <i>L. pneumophila</i> en présence de différentes concentrations de WRK.....	147
Figure 48.	Les quatre grands types de leucémie.....	149
Figure 49.	Pourcentage de perméabilisation de cellules JURKAT, KG1 et K562 en présence de concentrations croissantes de WRK.....	150
Figure 50.	Observation microscopique de cellules leucémiques KG1 en présence de concentrations croissantes de WRK.....	151
Figure 51.	Pourcentage de perméabilisation de cellules mononucléées humaines saines en présence de concentrations croissantes de WRK.....	152

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif	27
Tableau 2.	Alignement de séquence des principales δ -lysines produites par différents <i>Staphylococcus</i> et de la WRK avec les δ -lysines.....	33
Tableau 3.	Composition en phospholipides de différentes bactéries à Gram négatif et positif.....	63
Tableau 4.	Impact de l'osmolarité du milieu et/ou de la phase de croissance sur la composition en phospholipides de <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i>	64
Tableau 5.	Composition en acides gras membranaires d' <i>E. coli</i> en phase stationnaire, après une culture à 25 ou 42°C	68 (Kato & Bito, 1978)(Kato & Bito, 1978)(Kato & Bito, 1978)(Kato & Bito, 1978)
Tableau 6.	Composition en acides gras membranaires de <i>B. subtilis</i> en phase exponentielle, après une culture à 25 ou 37°C.....	69
Tableau 7.	Liste des acides gras les plus retrouvés dans les membranes des érythrocytes humains	70
Tableau 8.	Composition en acides gras de <i>L. pneumophila</i> en phase exponentielle et phase stationnaire.....	71
Tableau 9.	Souches de <i>Legionella spp.</i>	75
Tableau 10.	Souches de <i>Staphylococcus spp.</i>	76
Tableau 11.	Autres souches bactériennes utilisées lors de cette étude	77
Tableau 12.	Activité hémolytique des quinze souches de <i>Staphylococcus</i>	95
Tableau 13.	Activité anti- <i>Legionella</i> de quinze souches de <i>Staphylococcus</i>	96
Tableau 14.	Spectre d'activité des cinq souches de <i>Staphylococcus productrices de peptides anti-Legionella</i>	98
Tableau 15.	Résultats de la déconvolution des spectres des peptides WRK, la f-WRK, la PSM α et f-PSM α	100
Tableau 16.	Activités des peptides « PSM-K to PSM-R » envers <i>L. pneumophila</i> Lens, les érythrocytes et des membranes modèles	110
Tableau 17.	Spectre d'activité de la WRK, la PSM α , la PSM-G14K, et la PSM-22R.....	113
Tableau 18.	Mesure de la perméabilisation de liposomes par différents peptides.....	115

Tableau 19. Composition en phospholipides des membranes modèles et températures de transition de phase de chaque phospholipide.....**126**

Tableau 20. Caractéristiques des spectres obtenus en RMN en rotation à 10 kHz des membranes modèles à $R_i = \infty$ et $R_i = 10$**135**

INTRODUCTION GENERALE

L'une des thématiques de recherche du Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau (LCME) est l'étude de traitements contre *Legionella*. Cette bactérie, d'origine hydrotellurique, est retrouvée essentiellement dans les environnements aquatiques naturels (rivières, lacs...) ou artificiels (tours aérorefrigérantes, spas, douches...). La survie et la prolifération de *Legionella* dans ces environnements aqueux sont néanmoins liées à son interaction avec des protozoaires comme les amibes, et ceci au sein de biofilms. Ces interactions rendent *Legionella* plus résistante à la désinfection (biocides, traitements thermiques...), et plus infectieuse, le parasitisme des amibes permettant la libération de vésicules sous forme d'aérosols. En effet, c'est l'inhalation par l'homme d'aérosols contaminés par *Legionella* qui est responsable de la légionellose. Cette maladie est un réel problème de santé publique, avec environ 1500 cas en 2010 en France et un taux de mortalité de 12 %. Toutefois, il existe des molécules permettant de traiter la légionellose (érythromycine, doxycycline...).

En 2005, une souche bactérienne, *Staphylococcus warneri* RK, a été isolée au laboratoire. Elle présente une activité anti-*Legionella* grâce à la production de trois peptides actifs. Il s'agit de la warnéricine RK (WRK) et des δ -lysines I et II. La WRK est un peptide long de 22 acides aminés, qui se structure en hélice alpha amphiphile et qui ne présente aucune homologie de séquence avec des peptides déjà décrits dans la littérature. Il présente une activité bactéricide exclusivement contre le genre *Legionella*, ainsi qu'une activité hémolytique. Il semble agir sur les membranes de *Legionella* selon un mode d'action « detergent-like ». Les δ -lysines I et II sont homologues à la δ -lysine de *Staphylococcus aureus* et présentent également des activités anti-*Legionella* et hémolytique.

Ces peptides pourraient constituer une bonne alternative dans la lutte contre *Legionella*. D'une part, en termes de désinfection de l'eau, ces molécules, spécifiques de *Legionella* et biodégradables, pourraient être utilisées en remplacement des agents chimiques, dont l'emploi massif a un impact écologique non négligeable. D'autre part, ces peptides pourraient être utilisés en thérapeutique, à condition de ne plus posséder d'activité hémolytique.

A partir de ces résultats, il nous est apparu intéressant de rechercher d'autres peptides actifs contre *Legionella*, puis de déterminer les motifs peptidiques responsables des activités anti-*Legionella* et hémolytiques. En parallèle, nous avons poursuivi l'étude du mode d'action de la WRK, notre peptide modèle.

Pour atteindre ces objectifs, trois axes de recherches ont été développés dans ce travail:

- Le premier axe a été consacré à la détection puis la caractérisation de peptides anti-*Legionella* produits par diverses espèces et souches de *Staphylococcus*. Par la suite, les activités antibactérienne et hémolytique de ces différents peptides ont été déterminées et comparées. Ces résultats ont permis d'identifier un peptide intéressant pour la suite de l'étude. Il s'agit de la PSM α , produite par *Staphylococcus epidermidis*, qui présente

une activité inhibitrice contre *Legionella* tout en étant peu hémolytique comparée à la WRK.

- Le deuxième axe a consisté en une étude structure-activité de la WRK et de la PSM α afin d'essayer de déterminer la séquence d'un peptide qui serait bactéricide envers *Legionella* mais non hémolytique. Les activités d'un certain nombre de peptides modifiés, à partir des séquences de la WRK et la PSM α , ont été étudiées. De plus, leur action sur des liposomes constitués de compositions variables en phospholipides a également été analysée afin de comprendre la relation existant entre la composition membranaire de *Legionella* et l'activité inhibitrice des peptides.
- Enfin, le troisième axe a consisté en une étude plus spécifique du mode d'action de la WRK, notamment en termes d'action sur les membranes et d'activité sur les cellules eucaryotes.

L'interaction de la WRK avec les membranes de *Legionella* a été étudiée par RMN du solide et par microscopie électronique à balayage.

D'autre part, un certain nombre de peptides antimicrobiens ont été décrits dans la littérature comme présentant une activité contre des cellules cancéreuses. De ce fait, nous avons souhaité étudier l'activité anticancéreuse de la WRK.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Legionella pneumophila*

A. Généralités

1. Historique

Legionella pneumophila a été isolée pour la première fois en 1943 par Tatlock puis par Jackson *et al.* en 1947 mais était alors considérée comme faisant partie des bactéries de type *Rickettsia* (agent responsable du typhus) (Fields *et al.*, 2002).

En juillet 1976, lors de la 56^{ème} convention annuelle de l' «American Legion» à Philadelphie, 182 participants ont contracté une pneumonie. Parmi eux, 29 en décédèrent (Fraser *et al.*, 1977). La bactérie à l'origine de cette épidémie a été isolée en janvier 1977 par Joseph McDade et Charles Shepard grâce à l'utilisation d'un protocole de recherche des *Rickettsia* (CDC,Atlanta) (McDade *et al.*, 1977). En hommage aux victimes, cette pneumonie fut nommée « maladie des légionnaires », et le microorganisme en cause, *Legionella pneumophila*.

2. Taxonomie

La famille des *Legionellaceae* qui fait partie de l'ordre des *Legionellales*, lui-même faisant partie de la classe des *Gammaproteobacteria*, n'est composée que du seul genre *Legionella*. Le nombre d'espèces et de sérogroupes décrits ne cesse d'augmenter. Il y a actuellement 50 espèces comprenant au moins 70 sérogroupes (Benson & Fields, 1998; Diederer, 2008; Fields *et al.*, 2002).

Parmi ces espèces, *Legionella pneumophila* qui comporte 16 sérogroupes est l'espèce majoritairement retrouvée dans les pathologies humaines. Le séro groupe 1, retrouvé dans 85 % des cas diagnostiqués, a été responsable de l'épidémie de Philadelphie de 1976. Il est la cause d'environ 90 % des cas de légionellose en Europe et aux Etats-Unis. Le second séro groupe retrouvé (1,6 % des cas) est le 6 (Benin *et al.*, 2002; Joseph, 2004; Yu *et al.*, 2002).

Certaines bactéries de la famille des *Legionellaceae*, nommées *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs) ne peuvent pas être cultivées *in vitro* et nécessitent la présence de protozoaires hôtes pour se multiplier et se maintenir. Elles sont sans doute pathogènes pour l'homme, mais il est difficile de prouver cette hypothèse du fait de la difficulté à les détecter par des moyens classiques de détection de *Legionella* (Adeleke *et al.*, 1996).

3. Caractéristiques

Les *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif. Elles mesurent entre 0,3 et 0,9 µm de large et 2 à 20 µm de long, sont aérobies, non sporulées et non capsulées.

Ces bactéries sont mobiles (sauf *L. oakridgensis*) grâce à un ou plus rarement deux flagelles. Ce flagelle est généralement situé en position polaire, voire subpolaire dans certains cas. Il mesure jusqu'à 8 µm de long et 14 à 20 nm d'épaisseur (Rodgers *et al.*, 1980).

Legionella pneumophila peut également présenter des pili lorsqu'elle est cultivée en milieu riche (Rodgers *et al.*, 1980).

Les *Legionella* sont aérobies strictes. Elles n'hydrolysent pas les carbohydrates et utilisent les acides aminés comme source de carbone et d'énergie. Elles sont cependant auxotrophes pour certains acides aminés comme la cystéine, la sérine et la thréonine (Pine *et al.*, 1979; Tesh *et al.*, 1983).

Leur culture est réalisée en milieu liquide dans du BYE (Buffered Yeast Extract) composé de tampon ACES et d'extrait de levure, et en milieu gélosé sur du BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) qui est du BYE auquel est rajouté du charbon actif (Feeley *et al.*, 1979).

La culture optimale des *Legionella* se fait en 2 à 5 jours, à un pH de 6,9, sous 2,5 % de CO₂, à une température comprise entre 25 et 42°C (avec un optimum de température de 35°C) (Diederer, 2008; Feeley *et al.*, 1979; Fields *et al.*, 2002).

B. Ecologie

Les *Legionella* sont des bactéries d'origine hydrotellurique. Elles sont retrouvées dans les environnements aquatiques naturels tels que les rivières et les lacs, mais aussi dans les sols humides ou la boue. Elles peuvent également proliférer dans des milieux hydriques artificiels comme les systèmes de climatisation, les tours aéro-réfrigérantes (TAR), les spas ou encore les réseaux d'eau chaude sanitaire (Borella *et al.*, 2005; Fliermans *et al.*, 1981; Stout *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 2009).

D'une manière générale, la survie et la prolifération de *Legionella* dans l'environnement sont liées à son interaction avec des protozoaires comme les amibes, et ceci au sein de biofilms.

1. Interaction avec les protozoaires

Les protozoaires sont des microorganismes eucaryotes se nourrissant par phagocytose de bactéries, d'algues ou de levures présentes à la surface des biofilms.

La culture de *Legionella* nécessite des conditions particulières qui ne sont pas retrouvées dans les environnements aqueux. Pour pouvoir survivre et se multiplier dans ces milieux, *Legionella* est un parasite intracellulaire de certains protozoaires (Fields, 1996; Fields *et al.*, 2002; Rowbotham, 1980).

Parmi eux sont retrouvées plus de 20 espèces d'amibes, deux espèces de protozoaires ciliés (*Tetrahymena pyriformis* et *Tetrahymena thermophila*) et *Dictyostelium discoideum* (Lau & Ashbolt, 2009). Parmi les amibes, les genres les plus communément retrouvés sont *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Hartmanella* (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Rowbotham, 1980).

Excepté en laboratoire, il n'a jamais été observé de croissance extracellulaire de *Legionella* (Fields, 1996).

Son cycle de vie intracellulaire suit plusieurs étapes décrites dans la **Figure 1**.

La première étape est l'internalisation des *Legionella* par phagocytose. Une fois dans les phagosomes, la bactérie est capable de recruter rapidement des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique et ribosomes) afin de former une vacuole répliquative. En parallèle, elle inhibe la voie endocyttaire qui permettrait à l'hôte de la détruire. Elle peut ainsi se multiplier dans la vacuole répliquative jusqu'à épuisement des nutriments, puis être disséminée dans l'environnement et infecter une nouvelle cellule-hôte (nouveau protozoaire, macrophage alvéolaire).

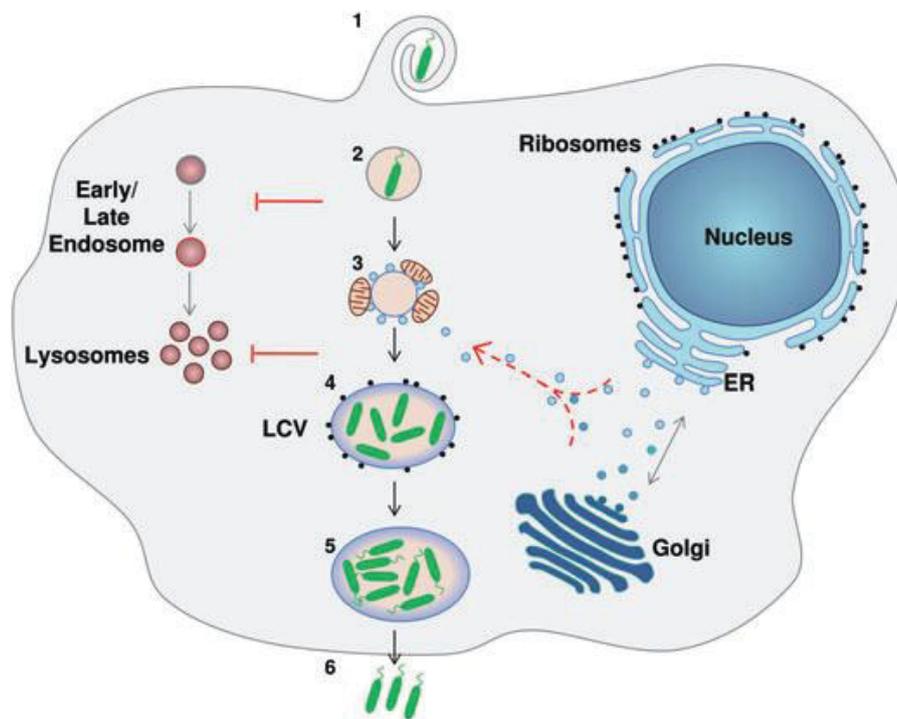


Figure 1. Cycle de vie de *Legionella pneumophila* dans les protozoaires (Franco *et al.*, 2009).

(1) internalisation de *L. pneumophila* par phagocytose, (2) Inhibition de la voie endocyttaire (inhibition de la fusion phagosome-endosome), (3) interaction de la « *Legionella* containing vacuole » (LCV) avec des mitochondries et inhibition de la fusion phagosome-lysosome, (4) recrutement sur la LCV du réticulum endoplasmique et de ribosomes pour former une vacuole répliquative, (5) réplication de *Legionella*, et formation du flagelle et (6) sortie du protozoaire.

L'interaction avec les protozoaires procure plusieurs avantages à *Legionella*. Durant leur internalisation, les bactéries peuvent se multiplier tout en étant protégées des conditions environnementales difficiles (température, dessiccation, biocides...) (Greub & Raoult, 2004; Neumeister *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2004).

Puis, lors de la dissémination hors des amibes, les *Legionella* sont expulsées soit sous forme libre, soit par centaines à l'intérieur de vésicules de quelques μm de diamètre (Berk *et al.*, 1998; Bouyer *et al.*, 2007; Molmeret *et al.*, 2004). Ces vésicules permettent à *Legionella* de survivre de nombreux mois dans l'environnement (Bouyer *et al.*, 2007), et rendent la bactérie plus résistante à la désinfection (biocides, traitements thermiques...) (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Barker *et al.*, 1993; Bouyer *et al.*, 2007). De plus, il semblerait qu'elle devienne également plus infectieuse, les vésicules jouant le rôle de vecteur de transmission de la légionellose sous forme d'aérosols (Berk *et al.*, 1998; Cirillo *et al.*, 1994).

2. Interaction avec les biofilms

Si les protozoaires sont un paramètre essentiel à la multiplication de *Legionella*, les biofilms sont quant à eux la clé de sa persistance dans l'environnement (Borella *et al.*, 2005).

Les biofilms sont des communautés complexes de microorganismes adhérant à une surface et intégrés dans une matrice extracellulaire composée d'exopolymères. Ils sont généralement constitués de diverses espèces microbiennes appartenant aux bactéries, algues, champignons, protozoaires et virus. La formation du biofilm est décomposée en trois principales étapes (**Figure 2**) :

- L'attachement des cellules planctoniques flottantes à la surface
- La maturation du biofilm durant laquelle les microorganismes vont se multiplier et vont sécréter une matrice exopolymérique
- Le détachement de ces microorganismes et leur dispersion dans l'environnement.

Il est à noter que dans les environnements aquatiques artificiels (TAR, spas, douches..), la croissance de *Legionella* est détectée presque exclusivement au sein des biofilms (Lau & Ashbolt, 2009). Le mécanisme de colonisation des biofilms par *Legionella* dans un système de distribution d'eau est décrit dans la **Figure 2**. L'interaction avec les protozoaires joue un rôle important dans la colonisation des biofilms ainsi que dans la dissémination hors de ces biofilms.

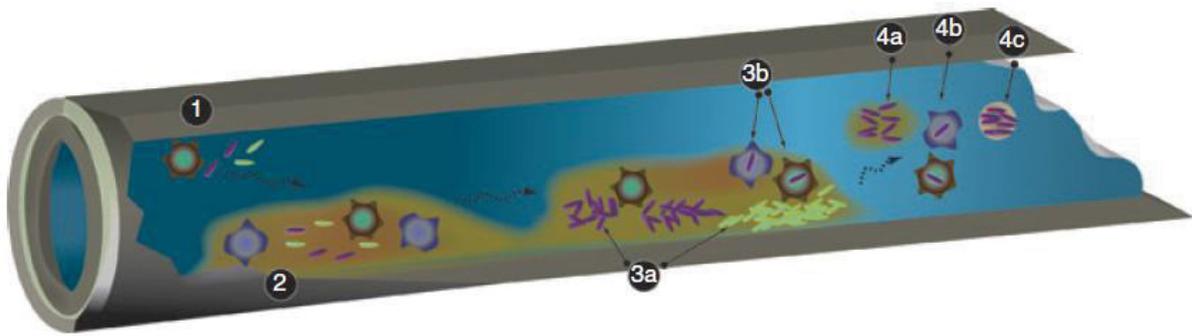


Figure 2. Développement d'un biofilm et relargage des *Legionella* dans un système de distribution d'eau (Lau & Ashbolt, 2009).

(1) Entrée de *Legionella* et de protozoaires dans la canalisation, (2) adsorption des microorganismes sur le biofilm existant, (3) développement de *Legionella* au sein du biofilm (3a) sous forme libre, ou (3b) après ingestion par des protozoaires, (4) dissémination de *Legionella*, (4a) enchâssée dans la matrice du biofilm, (4b) à l'intérieur d'un protozoaire ou (4c) à l'intérieur de vésicules relarguées par les protozoaires.

Legionella tire plusieurs avantages à coloniser des biofilms plutôt qu'à rester à l'état planctonique (Davey & O'Toole G, 2000). En effet, il existe au sein du biofilm, et entre le biofilm et la phase aqueuse, des systèmes d'échanges qui permettent d'apporter aux microorganismes les nutriments et métabolites nécessaires à leur survie. De plus, plusieurs études ont démontré que le biofilm permet de protéger les *Legionella* des stress environnementaux et des traitements chimiques (Borella *et al.*, 2005).

C. Légionellose

La légionellose, ou maladie du Légionnaire est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987 (Benhamou *et al.*, 2005). En 2010 en France, il y a eu 1540 cas avec un taux de mortalité de 12 %. Le taux d'incidence moyen qui est de 2,38 cas /100 000 habitants en France en 2010 peut monter à plus de 10/100 000 chez les hommes de plus de 70 ans (Source InVS). En effet, certains facteurs de risque ont pu être déterminés tels que l'âge, le sexe masculin, le tabagisme, l'alcoolisme, le diabète ou encore l'immunodépression (Benhamou *et al.*, 2005).

Les *Legionella* sont transmises par voie aérienne via l'inhalation d'aérosols contaminés. Une fois inhalées, les *Legionella* atteignent les alvéoles pulmonaires puis les macrophages bordant les alvéoles. Elles sont alors phagocytées par ces derniers dans lesquelles elles sont capables de proliférer de la même façon qu'à l'intérieur des amibes (Molmeret *et al.*, 2004; Swanson & Sturgill-Koszycki, 2000).

Les principales sources de contamination sont les environnements aquatiques artificiels et notamment ceux qui génèrent des aérosols tels que les TAR, spas, douches... (Atlas, 1999). Les TAR sont les installations les plus fréquemment mises en cause dans les cas d'épidémie de légionellose (Source InVS).

La légionellose est une maladie non contagieuse qui peut se présenter sous deux formes (Benhamou *et al.*, 2005) :

- La forme sévère, appelé légionellose ou maladie du Légionnaire, est une pneumonie. Les symptômes apparaissent après une incubation de 2 à 10 jours. Ils commencent par des malaises, un état de léthargie et de faiblesse, s'en suit une atteinte des voies respiratoires après quelques jours. En parallèle, la plupart des patients ont une forte poussée de fièvre qui peut être accompagnée de symptômes (i) neurologiques (confusion, désorientation, hallucinations, amnésies, céphalées...), (ii) digestifs (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées...), et (iii) biologiques (cytolyse hépatique, syndrome glomérulaire et/ou insuffisance rénale...) (Benhamou *et al.*, 2005).
- La forme bénigne, nommée fièvre de Pontiac, est un syndrome pseudo-grippal. Les différents symptômes, qui apparaissent après 1 à 2 jours d'incubation sont de la fièvre, des frissons, des céphalées et myalgies, mal de gorge, des nausées, ou encore de la toux sèche. Tous ces symptômes vont disparaître spontanément après quelques jours (Edelstein & Meyer, 1984; Fraser *et al.*, 1979).

Les traitements utilisés pour soigner la légionellose font appel aux molécules de type macrolide (érythromycine, clarithromycine..), azalide (azithromycine), fluoroquinones (ciprofloxacine, lévofloxacine..), tétracycline (doxycycline) et à la rifampicine (Diederer, 2008). Ces agents antimicrobiens doivent présenter une forte activité contre *Legionella* ainsi qu'une bonne capacité de pénétration au sein des macrophages alvéolaires (Roig & Rello, 2003).

D. Lutte contre *Legionella*

L'interaction avec les protozoaires et les biofilms est un facteur essentiel de prolifération et dissémination de *Legionella* dans l'environnement. Il est donc important d'en tenir compte pour lutter contre cette bactérie.

Les méthodes principales de traitement mises en place sont l'utilisation d'agents désinfectants, de molécules biologiques, et moins fréquemment de traitements physiques (UV, ultrasons, choc thermique...) (Kim *et al.*, 2002). Ces méthodes peuvent être utilisées soit en traitement préventif, soit en traitement curatif.

1. Agents désinfectants

Il existe deux grandes familles d'agents chimiques :

- Les agents oxydants, qui regroupent principalement les produits chlorés (chlore, monochloramine, dioxyde de chlore) ou bromés (acide hypobromeux, bromure de sodium, bromure d'ammonium).
Le chlore est l'agent le plus utilisé pour la désinfection des eaux du fait de son fort pouvoir oxydant et de son action rapide à faible concentration (Loret *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2007).
- Les agents non oxydants, qui sont composés d'une très grande variété de désinfectants organiques tels que les thiazolones, les amines halogénées ou encore les aldéhydes (Kim *et al.*, 2002).

2. Traitements biologiques

Dans le but de limiter l'impact écologique lié à l'utilisation massive d'agents chimiques, de nouvelles molécules sont recherchées comme solution alternative dans la lutte contre *Legionella*. Ces molécules doivent être spécifiques de la cible et biodégradables.

Dans la littérature, peu de molécules anti-*Legionella* ont été décrites.

La lactoferrine est une glycoprotéine liant le fer qui est présente dans différents fluides de l'organisme (lait, salive, larmes...) (Bortner *et al.*, 1986). Sous sa forme non saturée en fer, elle inhibe la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* à l'intérieur de monocytes humains, en limitant la quantité de fer disponible (Byrd & Horwitz, 1989; Byrd & Horwitz, 1991).

Une étude sur l'activité bactéricide de certaines huiles essentielles a montré que des huiles de feuille de cannellier, appartenant à l'espèce *Cinnamomum osmophloeum*, possédaient une activité bactéricide contre *L. pneumophila* sg 1. Cet effet est dû au cinnamaldehyde, composé majoritaire de ces huiles (Chang *et al.*, 2008).

Le LBM415, un inhibiteur de peptides déformylases, possède une activité anti-*Legionella* (CMI 4 µg/ml) *in vitro* et inhibe, de manière réversible, la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans des macrophages alvéolaires (Edelstein *et al.*, 2005). Toutefois, cette activité bactéricide n'est pas spécifique des bactéries du genre *Legionella*. (Fritsche *et al.*, 2005).

Enfin, la warnéricine RK est un peptide produit par *Staphylococcus warneri* RK qui inhibe les *Legionella* (Verdon *et al.*, 2008; Verdon *et al.*, 2009a). Ce peptide sera décrit plus en détail dans le chapitre suivant où sera réalisée une présentation des peptides antimicrobiens.

II. Les peptides antimicrobiens

A. Généralités

Les peptides antimicrobiens sont produits par des organismes aussi variés que les bactéries, les protozoaires, les plantes ou les animaux (insectes, poissons, amphibiens, mammifères...) (Nissen-Meyer & Nes, 1997). Ils sont actifs contre la majorité des espèces bactériennes et fongiques, voire même contre des virus enveloppés (VIH par exemple) et des protozoaires (Hancock & Chapple, 1999; Hancock & Scott, 2000; Masuda *et al.*, 1992; Morimoto *et al.*, 1991; Zasloff, 2002). De plus, certains peptides ont également une activité anticancéreuse. Il en existe deux groupes, ceux qui sont très actifs contre les bactéries et les cellules cancéreuses mais pas contre les cellules saines (cécropine, magainine...), et ceux qui sont actifs contre les bactéries, les cellules cancéreuses et les cellules saines (mélittine...) (Chen *et al.*, 1997; Cruciani *et al.*, 1991; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Hui *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1994).

La plupart de ces peptides agissent par perméabilisation des membranes microbiennes. Cette absence de cible spécifique empêche les microorganismes de mettre en place des mécanismes de résistance (Hoskin & Ramamoorthy, 2008). Cette caractéristique rend les peptides antimicrobiens très intéressants en tant que composés thérapeutiques en remplacement des antibiotiques classiques vis-à-vis desquels les microorganismes sont de plus en plus résistants (Hancock & Chapple, 1999).

Toutefois, il semblerait que certains peptides agissent sur des cibles intracellulaires sans perturber la membrane. Ils inhibent la synthèse de protéines ou de la paroi cellulaire, l'activité de certaines enzymes, interfèrent avec le processus métabolique des microorganismes ou interagissent avec leurs ADN et ARN (Hwang & Vogel, 1998).

Différents paramètres physico-chimiques (détaillés dans le chapitre III-B-2) jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne de ces peptides : la taille, la séquence, la charge, l'hydrophobie, l'amphiphilie, la structure tridimensionnelle, la concentration en peptide ou encore la composition membranaire de la cellule cible (Giangaspero *et al.*, 2001; Shai, 1999).

Toutefois, leur activité dépend essentiellement de deux paramètres principaux qui sont leur cationicité et leur capacité à adopter des structures amphiphiles. En effet, leur charge positive (entre +2 et +9 à pH neutre) leur permet d'interagir facilement avec les membranes microbiennes chargées négativement (et peu avec les membranes eucaryotes peu chargées), et leur amphiphilie les rend capables de s'incorporer au sein de ces membranes (Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Tossi *et al.*, 2000).

1. Les peptides produits par les organismes supérieurs

La plupart des organismes vivants doivent lutter quotidiennement contre des pathogènes qui peuvent affecter leur santé voire leur survie. Pour cela, ils ont mis en place une réponse immunitaire innée, qui peut être suivie, chez les vertébrés, par une réponse immunitaire acquise avec activation spécifique de cellules T et B par des antigènes (Fearon & Locksley, 1996). Les peptides antimicrobiens sont des composants très importants du système immunitaire inné qui permettent à l'hôte de contrôler sa flore naturelle (production constitutive des peptides) et de lutter contre les pathogènes (production peptidique induite par l'invasion de pathogènes) (Giangaspero *et al.*, 2001; Tossi *et al.*, 2000). Ces peptides sont souvent la première ligne de défense d'un organisme car leur production et leur diffusion est jusqu'à 100 fois plus rapide que celle des protéines et cellules de l'immunité.

Ces peptides sont généralement classés en quatre groupes qui dépendent de leur séquence et leur structure tridimensionnelle (Boman, 1995; Bulet *et al.*, 2004; Hancock & Sahl, 2006; Tang *et al.*, 1999).

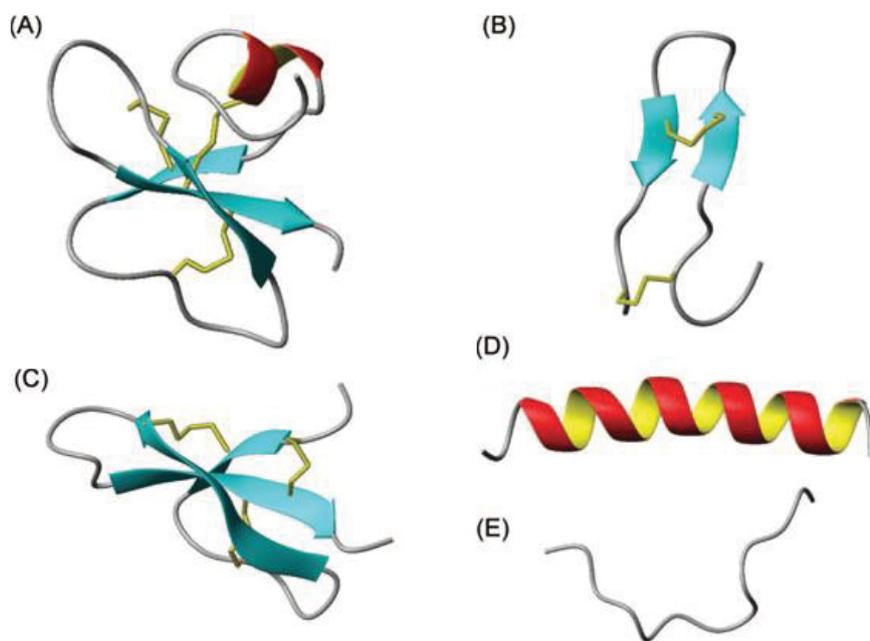


Figure 3. Structures tridimensionnelle des peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs (Jenssen *et al.*, 2006).

(A) Structure mixte feuillet β /hélice α de la β -defensin-2 humaine, (B) structure en épingle à cheveux de la polyphémusine de la limule, (C) structure en feuillet β de la défensine RK1 du lapin, (D) structure en hélice α de la magainine 2 et (E) structure désorganisée de l'indolicidine bovine.

Les ponts disulfures sont indiqués en jaune.

a) Les peptides en hélice alpha amphiphile

Les peptides en hélice alpha amphiphile sont les plus abondants et les plus répandus dans la nature (**Figure 3D**). Ils sont généralement courts (5 à 40 résidus), cationiques et présentent 40 à 60 % de résidus hydrophobes (Tossi *et al.*, 2000). Ils ne possèdent pas de cystéine et présentent parfois un coude au milieu de la molécule. Ils sont généralement déstructurés en solution aqueuse mais se structurent en hélice alpha à proximité des membranes (**Figure 4**) (Brogden, 2005).

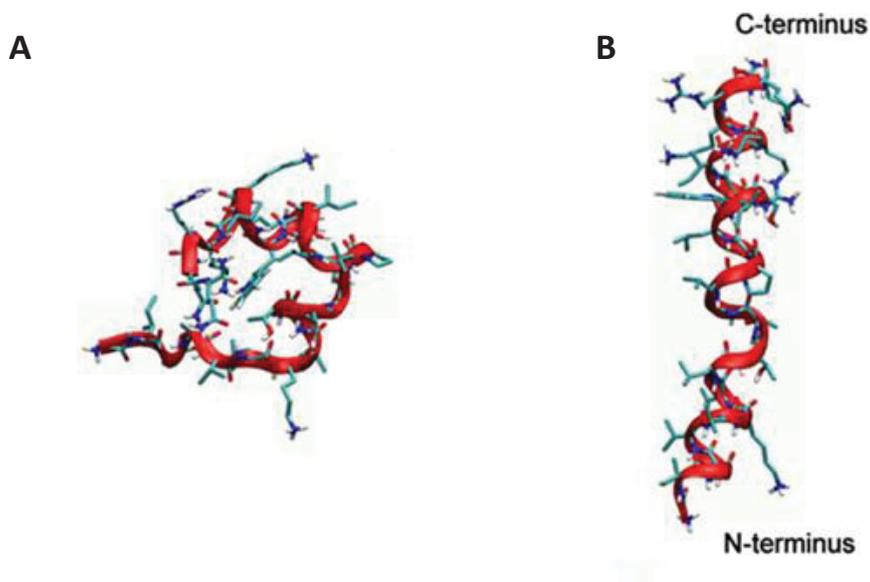


Figure 4. Structure tridimensionnelle de la mélittine (Glattli *et al.*, 2006).

(A) en solution aqueuse et (B) au contact de membranes artificielles composées de DMPC.

Ces peptides sont produits par des organismes variés, tels que les insectes (cécropine, mélittine), les amphibiens (magainine), les champignons (alaméthicine) ou encore les humains (cathélicidine LL-37) (Andersson *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 1970; Raghuraman & Chattopadhyay, 2007; Zanetti, 2004; Zasloff, 1987). Ils sont actifs contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les champignons et les protozoaires (Tossi *et al.*, 2000).

b) Les peptides riches en cystéine stabilisés par des ponts disulfures

Ces peptides contiennent des cystéines (entre 2 et 8) impliquées dans la formation de ponts disulfures (Bulet *et al.*, 2004).

Ils peuvent se structurer en feuillet β (la plupart des défensines des vertébrés) (**Figure 3C**), en épingle à cheveux (les brévinines des amphibiens, l'androctonine du scorpion...) (**Figure 3B**), ou en feuillet β /hélice α (les défensines des invertébrés, des plantes et de certains vertébrés) (**Figure 3A**) (Bulet *et al.*, 2004).

c) Les peptides contenant un pourcentage élevé d'un type d'acide aminé

Cette famille, très hétérogène, rassemble des peptides dont la composition est dominée par un type d'acide aminé.

Les histatines sont des peptides riches en histidine qui sont retrouvés dans les sécrétions salivaires humaines. Les indolicines (**Figure 3E**), riches en tryptophane, sont isolées de neutrophiles bovins. Il y a également des peptides riches en proline principalement isolés d'insectes (drosocine, pyrrocoricine) ou riches en glycine (diptéricine) (De Smet & Contreras, 2005; Otvos, 2002; Selsted *et al.*, 1992).

2. Les peptides produits par les bactéries

Les bactéries produisent également de nombreux peptides antimicrobiens nommés bactériocines (Bastos *et al.*, 2009; Jack *et al.*, 1995). Elles sont synthétisées par voie ribosomique et présentent une activité contre des souches phylogénétiquement proches des souches productrices, ou occupant les mêmes niches écologiques.

Les bactéries productrices ont développé un système de protection contre leur propre bactériocine appelé immunité. Chaque bactériocine a son propre système immunitaire généralement exprimé en même temps que les gènes structuraux du peptide (Bastos *et al.*, 2009; Jack *et al.*, 1995).

Les bactériocines peuvent être produites par des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

a) Les peptides produits par les bactéries à Gram négatif

Ce groupe est constitué des microcines qui sont produites par les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* et notamment *E. coli* (Dirix *et al.*, 2004).

Les microcines regroupent une dizaine de peptides qui se répartissent en deux classes qui diffèrent par leur mode d'action (Pons *et al.*, 2002):

- les microcines de classe I, qui ciblent des enzymes intervenant dans la structuration et la synthèse d'ADN/ARN.

- les microcines de classe II qui interagissent avec les membranes bactériennes.

b) Les peptides produits par les bactéries à Gram positif

Ces peptides étant très nombreux, plusieurs classifications ont été proposées (Cotter *et al.*, 2005; Daw & Falkiner, 1996; Diep & Nes, 2002; Hechard & Sahl, 2002; McAuliffe *et al.*, 2001; Pons *et al.*, 2002).

La classification suivante (**Tableau 1**) est proposée par Bastos *et al.* (Bastos *et al.*, 2009).

Tableau 1. Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (d'après Bastos *et al.*, 2009).

Classification	Caractéristiques	Sous-classe	Exemples
Classe I (lantibiotiques)	Peptides contenant des acides aminés modifiés	Type A (linéaire)	Pep5, Epidermine, Nukacine ISK-1
		Type B (globulaire)	Mersacidine
		Type C (multicomposant)	Staphylococcine C55
Classe II	Peptides linéaires ne contenant pas d'acides aminés modifiés	Type IIa (« pediocin-like »)	Pédiocine PA-1
		Type IIb (multicomposant)	Auréocine A70, Lactacine F
		Type IIc (divers)	Auréocine A53, Lactococcine A
Classe III	Protéines sensibles à la chaleur	Type IIIa (bactériolysines)	Lysostaphine
		Type IIIb (non lytique)	Helvéticine J
Classe IV	Peptides cycliques	-	Entéroccine AS-48

❖ Classe I : Lantibiotiques

Ce sont des peptides, longs de 19 à 38 acides aminés et de masse inférieure à 5 kDa, contenant des acides aminés modifiés post-traductionnellement tels que la lanthionine et la β -méthyl-lanthionine (Willey & van der Donk, 2007).

Cette classe est subdivisée en trois catégories, la sous-classe A contient les peptides linéaires (Pep5, épidermine...), la sous-classe B comprend les lantibiotiques globulaires (mersacidine...) et enfin la sous-classe C est composée des lantibiotiques à deux composants comme la staphylococcine C55 (Bastos *et al.*, 2009).

❖ Classe II

Cette classe comprend des peptides contenant des acides aminés non modifiés, longs de 20 à 60 résidus et de masse inférieure à 10 kDa. Ils sont thermostables et sans modifications post-traductionnelles (Hechard & Sahl, 2002).

Les peptides de la sous-classe IIa présentent une activité anti-*Listeria* et sont caractérisés par un motif anti-*Listeria* conservé de type YGNGVxC (x étant un acide aminé quelconque) (Ennahar *et al.*, 2000).

La sous-classe IIb contient des bactériocines à plusieurs composants dont l'activité est permise par l'action synergique des différents peptides les composant (Nes *et al.*, 1996).

Enfin, la sous-classe IIc contient tous les autres peptides de la classe II (Hechard & Sahl, 2002).

❖ Classe III

La classe III contient les protéines thermosensibles. La sous-classe IIIa contient les bactériolysines comme la lysostaphine et la classe IIIb les bactériocines non lytiques comme l'helvéticine J (Bastos *et al.*, 2009; Joerger & Klaenhammer, 1990).

❖ Classe IV

Cette classe comprend les peptides cycliques tels que l'entéroisine AS-48 produite par *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* (Bastos *et al.*, 2009).

B. Les peptides produits par les bactéries du genre *Staphylococcus*

Le genre *Staphylococcus* a été décrit pour la première fois en 1883 par Sir Alexandre Ogston. C'est un germe ubiquiste qui peut faire partie de la flore cutanéomuqueuse de l'homme et de l'animal. Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* faisant partie de l'ordre des *Bacillales*. Ces bactéries sont classées en deux grands groupes, différenciés par la production d'une enzyme déclenchant la coagulation du plasma, la coagulase (Watanabe *et al.*, 2005) :

- les *Staphylococcus* coagulase-positif (SCP) dont le plus connu est *S. aureus*.
- les *Staphylococcus* coagulase-négatif (SCN) qui sont les plus nombreux. Parmi eux, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*...

Les *Staphylococcus* sont des coques à Gram positif de 0,7 à 1 µm de diamètre. Ils sont immobiles, non sporulés et non capsulés. Ils sont aéro-anaérobie facultatifs et possèdent une activité catalase mais pas d'activité oxydase. *Staphylococcus* est une bactérie assez facile à cultiver qui se développe en 24 heures sur des milieux riches classiques, à un pH allant de 6 à 9 et une température comprise entre 15 et 45°C.

De nombreux peptides sont produits par les différents staphylocoques existants. Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux peptides les mieux caractérisés produits par les staphylocoques les plus courants.

1. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis est présent sur la peau, et se retrouve chez quasiment 100 % de la population humaine à l'état commensal. Il est normalement non pathogène mais peut causer des endocardites et des septicémies chez des patients immunodéprimés ou porteurs de prothèses (Vuong & Otto, 2002). Il est considéré comme le principal pathogène responsable d'infections nosocomiales parmi les SCNs (Otto *et al.*, 1998). Son potentiel infectieux le plus problématique se matérialise par sa présence sous forme de biofilms sur les dispositifs médicaux implantés tels que les cathéters ou les prothèses (Vuong & Otto, 2002; Ziebuhr *et al.*, 2006). Différents peptides sont produits par cette bactérie.

❖ L'**épidermine** est un des lantibiotiques les plus fréquemment produits par différentes souches de *S. epidermidis*. C'est aussi le plus petit parmi les lantibiotiques de type A avec seulement 22 acides aminés et une masse molaire de 2164 Da.

Le mode d'action de ce peptide combine l'inhibition de la paroi cellulaire et de la synthèse du peptidoglycane à la formation de pores dans la membrane (Bonelli *et al.*, 2006).

L'épidermine est active contre *Staphylococcus* sp. et notamment contre les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (Nascimento *et al.*, 2006). Elle est aussi capable de réduire de 90 % l'adhésion de *S. epidermidis* sur des cathéters en silicone (Fontana *et al.*, 2006) ainsi que de 10 fois celle des espèces de *Corynebacterium* (Fontana *et al.*, 2007). Ce peptide pourrait donc être un bon candidat dans la lutte contre les infections liées aux cathéters (Bastos *et al.*, 2009).

La **gallidermine** de *Staphylococcus gallinarum* (Kellner 1988) et la **Staphylococcine T** de *Staphylococcus cohnii* (Furmanek *et al.*, 1999) sont deux variants naturels de l'épidermine.

❖ **Pep5** est produit par *S. epidermidis* souche 5 (Sahl & Brandis, 1981). C'est un lantibiotique de 34 acides aminés et d'une masse molaire de 3488 Da (Kaletta *et al.*, 1989).

Pep5 possède des activités similaires à celles de l'épidermine. Concernant l'inhibition de *Staphylococcus* sp., il est actif contre 77 % des SCN et 87 % des *S. aureus*, y compris des SARM (Bastos *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2006). Pep5 est donc également un bon candidat dans la lutte contre les infections liées aux cathéters. (Bastos *et al.*, 2009).

L'**épicedine 280** (3130 Da), produite par *S. epidermidis* BN 280, est un variant naturel de Pep5 avec qui elle possède 75 % de similarité de séquence (Heidrich *et al.*, 1998).

❖ *S. epidermidis*, et notamment la souche UW-3, secrète différents facteurs regroupés sous le terme de « **Phenol-soluble modulins** » (PSMs). « Phenol-soluble » signifie que ces facteurs sont retrouvés dans la phase phénolique lors de l'extraction au phénol. Le terme « modulins » fait référence à des produits bactériens qui stimulent la production de cytokines dans la cellule-hôte. En effet, les PSMs ont été initialement décrites comme inductrices de la production de cytokines dans certaines cellules (Mehlin *et al.*, 1999).

La caractérisation de ces PSMs a permis d'identifier quatre peptides, les PSMs α , β , γ , et δ . Les trois premiers ont pu être purifiés par HPLC directement à partir de cultures de *S. epidermidis*. (Mehlin *et al.*, 1999). Le quatrième a été obtenu par expression hétérologue chez *Staphylococcus carnosus* (Otto *et al.*, 2004).

Ces quatre peptides ont été purifiés avec leur méthionine N-terminale formylée et leurs masses molaires non formylées sont de 2460 Da pour la PSM α , 4639,3 Da pour la β , 2820,4 Da pour la γ et 2619 Da pour la δ . Ces peptides sont très hydrophobes et sont caractérisés par une absence d'arginine, de cystéine, d'histidine, de proline et de tyrosine dans leurs séquences, tout comme la δ -lysine de *S. aureus* (cf chapitre II.B.2)(Mehlin *et al.*, 1999).

- PSM α est un peptide de 22 acides aminés dont la séquence est originale avec tout de même 40 % de similarité de séquence avec la δ -lysine de *S. aureus*. Sa structure prédite est une hélice alpha amphiphile (Mehlin *et al.*, 1999).
- PSM β , longue de 44 acides aminés, présente des similitudes avec les SLUSHs de *S. lugdunensis* (Donvito *et al.*, 1997a) et les gonococcal growth inhibitor de *Staphylococcus haemolyticus* (cf chapitres II.B.4 et 6) (**Figure 9**) (Mehlin *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1988).
- PSM γ , longue de 25 acides aminés, est identique à la δ -lysine de *S. epidermidis*, qui présente 92 % d'homologie avec celle de *S. aureus* qui sera décrite dans le chapitre II.B.2 (**Tableau 2**) (Mehlin *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2006).
- PSM δ , longue de 23 acides aminés, présente 51 % d'homologie avec la PSM γ .

La plupart des études portant sur les activités de ces peptides ont été réalisées sur le mélange des PSMs, qui semble nécessaire à une activité optimale (Liles *et al.*, 2001; Mehlin *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2004).

De nombreuses activités leur sont imputées. Les PSMs semblent réduire la capacité de *S. epidermidis* à faire des biofilms en inhibant les communications cellule-cellule (étape de maturation du biofilm) plutôt que cellule-surface (étape précoce d'attachement des cellules planctoniques). Ceci entraîne le détachement du biofilm et, dans le cas de dispositifs médicaux

implantés, la propagation des bactéries libres dans l'organisme infecté (Vuong & Otto, 2002; Wang *et al.*, ; Yao *et al.*, 2005).

Dans un autre domaine, Durantez *et al.*, en 2010, ont décrit les PSM α et γ comme potentiellement intéressantes en tant que transporteurs d'antigène pour le développement de vaccins anti-tumoraux ou anti-viraux (Durantez *et al.*, 2010).

Elles activent la production de cytokines dans les cellules THP-1 et les monocytes, mais pas dans les cellules Jurkat, ce qui indique une sélectivité cellulaire. (Mehlin *et al.*, 1999). Liles *et al.* ont mis en évidence leur action sur les monocytes et les leucocytes via leur potentiel chimiotactique ou encore leur capacité à inhiber l'apoptose de ces cellules. Toutes ces données suggèrent que les PSMs doivent jouer un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire par l'hôte durant l'infection de *Staphylococcus* (Liles *et al.*, 2001).

De plus, à des concentrations supérieures à 16 μ M, elles sont actives contre *Streptococcus* de groupe A, *S. aureus*, et *E. coli*, alors que *S. epidermidis* γ est résistant, ce qui lui procure un avantage sélectif vis-à-vis des autres souches présentes sur la peau (Cogen *et al.*, 2010b).

Ces résultats permettent de penser que, chez un sujet sain, les PSMs sont favorables à l'hôte en privilégiant *S. epidermidis* vis-à-vis de bactéries plus pathogène. Toutefois, en cas d'infection par *S. epidermidis*, notamment si l'hôte est immunodéprimé et si la barrière de la peau est rompue, par exemple avec un cathéter, la production de PSMs peut accentuer la virulence de la bactérie en induisant une réponse pro-inflammatoire excessive (Cogen *et al.*, 2010a; Liles *et al.*, 2001; Mehlin *et al.*, 1999).

Enfin, Cogen *et al.*, en 2010, ont étudié le mode d'action des PSM γ et δ . L'étude de membranes modèles a mis en évidence leur capacité à s'y associer et à les perméabiliser selon, sans doute, un mécanisme de type « barrel-stave » (cf chapitre III-A).

2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus est retrouvé à l'état commensal chez 15 à 30 % de la population humaine. Il se situe au niveau des fosses nasales et de la gorge, à partir desquelles il est disséminé par aérosols jusque sur la peau, les vêtements et les squames. La transmission peut donc se faire par contact direct ou indirect. C'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est la cause d'infections cutanées ou profondes, mais aussi d'intoxications alimentaires, d'endocardites ou encore de septicémies (Lowy, 1998; Wenzel & Perl, 1995).

Parmi ces bactéries, les *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) sont un problème majeur dans les hôpitaux du fait de leur virulence et de la difficulté à lutter contre eux (Lowy, 2003).

De nombreux peptides produits par *S. aureus* ont été décrits :

❖ La **staphylococcine C55** est une bactériocine de classe I-C, produite par *S. aureus* C55, qui a été partiellement caractérisée en 1970 par Dajani *et al.* (Dajani *et al.*, 1970). Sa caractérisation complète sera faite par Navaratna *et al.* 28 ans plus tard (Navaratna *et al.*, 1998). La staphylococcine C55 est la première bactériocine de *S. aureus* à avoir été entièrement séquencée, et c'est également la première bactériocine à deux composants décrite chez le genre *Staphylococcus*. En effet, elle est composée de deux peptides, C55 α (3339 Da) et C55 β (2993 Da), qui agissent de façon synergique.

Bac R1, produit par *S. aureus* UT0007 est identique à la staphylococcine C55 (Navaratna *et al.*, 1999).

Les staphylococcines C55/Bac R1 sont actives contre *S.aureus*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella bovis* mais sont inactives contre les SCN (Bastos *et al.*, 2009; Crupper *et al.*, 1997; Navaratna *et al.*, 1998). De plus, elles inhibent différents agents responsables d'infections humaines tels que *Neisseria gonorrhoeae* qui cause des infections sexuellement transmissibles de type gonorrhée, *Corynebacterium diphtheriae*, agent de la diphtérie, et *Bordetella pertussis*, qui cause la coqueluche (Crupper & landolo, 1996; Crupper *et al.*, 1997; Morriss *et al.*, 1978).

❖ L'**auréocine A70**, produite par *S. aureus* A70 est une bactériocine de classe IIb. C'est la première, et unique à ce jour, bactériocine à quatre composants. Les quatre peptides produits comportent 30 à 31 acides aminés, sont cationiques et très hydrophobes (Netz *et al.*, 2001). Leur combinaison est synergique et permet leur activité contre *Listeria innocua* et *S. aureus* (Bastos *et al.*, 2009).

❖ L'**auréocine A53** est une bactériocine de classe IIc, très cationique, longue de 51 acides aminés et produite par *S. aureus* A53. Elle est produite sous forme formylée sur sa méthionine en position N-terminale (Giambiagi-Marval *et al.*, 1990; Netz *et al.*, 2002).

Cette bactériocine présente une activité contre *Staphylococcus simulans*. L'auréocine A53 induit une perméabilisation membranaire accompagnée d'un arrêt de la biosynthèse de l'ADN, des polysaccharides et des protéines (Netz *et al.*, 2002).

❖ La **δ -lysine**, nommée aussi δ -toxine ou δ -hémolysine est un peptide produit par 97 % des *S. aureus* (Dinges *et al.*, 2000) et appartenant à la famille des hémolysines qui comprend également trois protéines, les hémolysines α , β et γ (Wiseman, 1975).

La δ -lysine (2978,5 Da) est un peptide de 26 acides aminés, très hydrophobe, produit en majorité sous forme N-formylée (90 % des cas) (Fitton *et al.*, 1980). Il se structure en hélice alpha amphiphile (**Figure 5**) (Freer & Arbuthnott, 1982; Lee *et al.*, 1987) et ne présente aucun des acides aminés suivants : histidine, arginine, proline, tyrosine et cystéine (Fitton *et al.*, 1980).



Figure 5. Structure tridimensionnelle de la δ -lysine (Verdon *et al.*, 2009b).

Les résidus apolaires sont en noir.

Ces propriétés physicochimiques sont également observées chez les homologues à la δ -lysine produits par d'autres souches de *Staphylococcus*. En effet, 50 à 70 % des SCN la produiraient, comme par exemple *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. intermedius* ou encore *S. simulans* (Tableau 2) (Dinges *et al.*, 2000; Fitton *et al.*, 1980; Mehlin *et al.*, 1999; Rogolsky, 1979; Sung *et al.*, 2006; Tegmark *et al.*, 1998).

Tableau 2. Alignement de séquence (A) des principales δ -lysines produites par différents *Staphylococcus* et (B) de la WRK avec les δ -lysines (Sung *et al.*, 2006; Verdon *et al.*, 2008).

	Espèce bactérienne	Séquence en acides aminés	% d'identité avec la δ -lysine de <i>S. aureus</i>
A	<i>S. aureus</i>	MAQDIISTIG DLV [■] KW [■] I [■] IDTV NKF [■] TKK-	100,0
	<i>S. epidermidis</i>	MAADIISTIG DLV [■] KW [■] I [■] IDTV NKF [■] KK--	92,0
	<i>S. simulans</i>	MAGDIVGTIG EFV [■] KLI [■] IETV QKF [■] TQK-	65,4
	<i>S. warneri</i>	MAADIISTIG DLV [■] KLI [■] INTV KKF [■] QK--	80,0
		MTADIISTIG DFV [■] KW [■] ILD [■] TV KKF [■] TK--	80,0
	<i>S. intermedius</i>	MAADIISTIV EFV [■] KLI [■] AETV AKF [■] IK--	64,0
B	Warnéricine RK	-----MQFIT DLIKKA [■] VDF [■] F KGLFGNK	

Les acides aminés identiques entre les différentes δ -lysines sont indiqués en gris.

La δ -lysine est codée par le gène *hld*, situé dans le locus *agrRNAIII* (accessory gene regulation), qui est un système de quorum sensing chez les *Staphylococcus* contrôlant l'expression de nombreuses exoprotéines (Novick & Muir, 1999). La production du peptide est maximale en fin de phase exponentielle de croissance.

Le locus *agr* (Figure 6) a été décrit pour la première fois par Peng *et al.* en 1988 (Peng *et al.*, 1988).

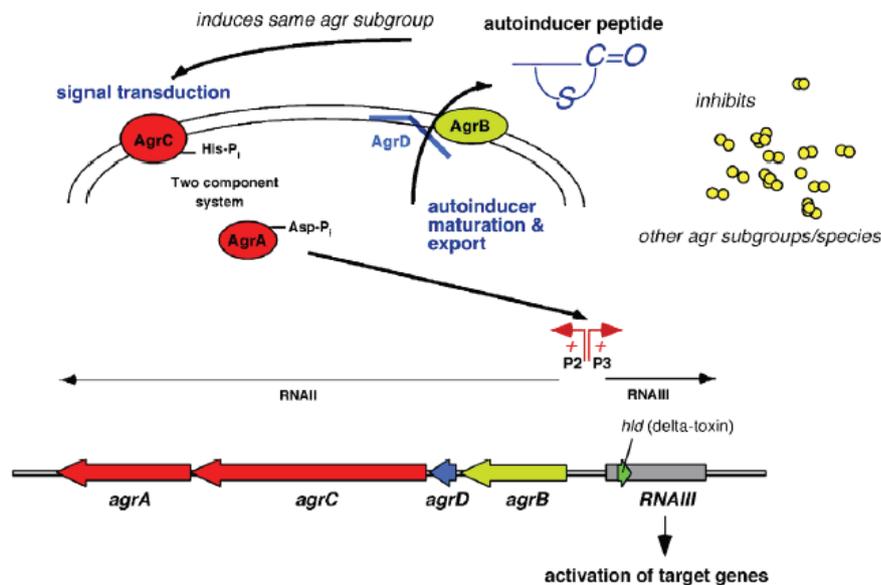


Figure 6. Le système de quorum sensing *agr* chez *S. aureus* (Kong *et al.*, 2006).

Le locus *agr* fait environ 3 kilobases (Kb) et contient deux transcrits primaires divergents, RNAII et RNAIII dont la transcription est respectivement dirigée par les promoteurs P2 et P3 (Lyon & Novick, 2004; Morfeldt *et al.*, 1995). Le transcrit RNAII correspond aux quatre gènes, *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA* (Novick *et al.*, 1995). La protéine codée par le gène *agrB* est une enzyme transmembranaire qui est impliquée dans la maturation du propeptide AgrD, en un octapeptide mature, l'AIP (autoinducteur). L'enzyme AgrB permet aussi la sécrétion de l'AIP (Lyon & Novick, 2004; Yarwood & Schlievert, 2003). Les protéines AgrA et AgrC forment un système de transduction du signal à deux composants. La protéine transmembranaire AgrC est le récepteur liant l'AIP extracellulaire. Cette liaison va alors entraîner la fixation d'AgrA sur l'ADN au niveau de la région intergénique P2-P3 et de l'opéron *agr* (Koenig *et al.*, 2004; Morfeldt *et al.*, 1996). Cette fixation va conduire à l'augmentation de la transcription à partir de P2 et P3 de RNAII et RNAIII en fin de phase exponentielle de croissance (Kong *et al.*, 2006; Yarwood & Schlievert, 2003).

La δ -lysine possède une activité hémolytique contre les érythrocytes de différentes espèces (cheval, lapin, homme, porc...) (Kreger *et al.*, 1971). Elle est également capable de lyser les protoplastes et sphéropastes bactériens, ainsi que les lysosomes et les mitochondries. Elle

produit des dermonécroses chez le cobaye et le lapin pour lesquels elle est létale à forte concentration (Kreger *et al.*, 1971; Rahal, 1972).

Toutefois elle possède une activité antibactérienne limitée. En effet, seul *Bacillus megaterium* est inhibé par 63 µg/mL de peptide. Pour les autres souches testées (*E. coli*, *S. aureus* ou *Bacillus subtilis* par exemple), même des concentrations très élevées en peptide (>500 µg/mL) ne permettent pas de les inhiber ni même de perméabiliser leurs membranes (Dhople & Nagaraj, 1993; Kreger *et al.*, 1971).

Le mode d'action de la δ-lysine, est de type « detergent-like (Rogolsky, 1979). La δ-lysine est inhibée par des phospholipides et des acides gras (Kapral, 1972; Kapral, 1976).

❖ *S. aureus* produit également une famille de peptides similaires aux **PSMs** décrites chez *S. epidermidis* (cf chapitre II.B.1). Comme pour la δ-lysine, la production des PSMs est régulée par le système *agr* (Wang *et al.*, 2007).

Ces peptides, structurés en hélice alpha amphiphile, sont séparés en deux types (**Figure 7**) (Wang *et al.*, 2007):

- le type α est composé de quatre peptides (PSMα1, α2, α3 et α4) longs respectivement de 22, 22, 23 et 21 acides aminés, similaires à la PSMα de *S. epidermidis* (Mehlin *et al.*, 1999).

La δ-lysine de *S. aureus* précédemment décrite fait également partie du type α des PSMs. (Wang *et al.*, 2007).

- le type β, est composé de deux peptides, PSM β1 et β2, tous les deux longs 44 acides aminés, similaires à la PSMβ de *S. epidermidis* (Mehlin *et al.*, 1999).

Les SLUSHs de *S. lugdunensis* font également partie de cette famille (Donvito *et al.*, 1997a; Rautenberg *et al.*, 2011).

PSMα1	f-MGIIAGIIKV IKSLIEQFTG K
PSMα2	f-MGIIAGIIKF IKGLIEKFTG K
PSMα3	f-MEFVAKLFKF FKDLLGKFLG NN
PSMα4	f-MAIVGTIIKI IKAIIDIFAK
δ-lysine	f-MAQDIISTIS DLVKWIIDTV NKFTKK
PSMβ1	f-MEGLFNAIKD TVTAAINNDG AKLGTSIVSI VENGVLLGK LFGF
PSMβ2	f-MTGLAEAIAN TVQAAQQHDS VKLGTSIVDI VANGVLLGK LFGF

Figure 7. Séquences des différentes PSMs produites par *S. aureus* (Wang *et al.*, 2007).

Les PSMs de *S. aureus* ont des activités similaires à celles de *S. epidermidis* : elles induisent la destruction des leucocytes, et jouent un rôle clé dans l'invasion du système immunitaire de l'hôte par la bactérie pathogène (Wang *et al.*, 2007).

Les PSMs sont actives contre *Streptococcus pyogenes*, un colonisateur pathogène de la peau. Joo *et al.* ont constaté (i) que cette bactérie et *S. aureus* occupent la même niche au niveau du corps humain et (ii) qu'il y a rarement de co-colonisation sur la peau. Ils en concluent que la production de PSM par *S. aureus* pourrait être un mécanisme pour l'avantager et lui permettre de coloniser et se répandre dans la population plus facilement (Joo *et al.*, 2011).

Au contraire, elles ne sont pas actives contre *S. aureus* et *S. epidermidis*, ce qui signifie qu'elles ne seraient pas impliquées dans une compétition pour un avantage écologique au sein du genre *Staphylococcus* (Joo *et al.*, 2011).

Il est à noter que la capacité de *S. aureus* à causer des infections chez l'homme ou l'animal est liée à la sécrétion des PSMs (Rautenberg *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007).

3. *Staphylococcus warneri*

S. warneri est un staphylocoque coagulase négatif qui est présent naturellement sur la peau. Il est faiblement pathogène comparé à des espèces comme *S. aureus*. Toutefois, des cas d'infections ont été décrits (septicémies, endocardites) chez des personnes immunodéprimées (Announ *et al.*, 2004).

De nombreuses staphylococcines sont produites par cette bactérie.

❖ La **nukacine ISK-1**, produite par la souche *S. warneri* ISK-1 a été isolée en 1997 par Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 1997). Elle est synthétisée sous forme d'un peptide précurseur de 57 acides aminés. Le peptide mature, similaire aux lantibiotiques de type IA comme la lacticine-481, est long de 27 acides aminés pour une masse molaire de 2960 Da (Sashihara *et al.*, 2000).

La nukacine ISK-1 possède une activité antibactérienne contre notamment *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus* et *Leuconostoc mesenteroides* (Asaduzzaman *et al.*, 2006). Même si le peptide dans son ensemble est nécessaire pour avoir une activité antibactérienne optimale, ce sont ses trois lysines en position N-terminale qui jouent un rôle primordial dans cette activité, leurs charges positives permettant une interaction avec la membrane (Asaduzzaman *et al.*, 2006).

❖ *S. warneri* RB4 produit une staphylococcine qui serait un variant naturel de la nukacine ISK-1, nommée **warnéricine RB4** (Minamikawa *et al.*, 2005). C'est un peptide de 2958,2 Da et long de 27 acides aminés. Son spectre d'action, différent de la nukacine ISK-1, est spécifique d'*Alicyclobacillus acidoterrestris*, d'*A. acidocaldarius* et de *M. luteus* (Minamikawa *et al.*, 2005). *A. acidoterrestris* est une bactérie à Gram positif qui a récemment été mise en cause dans

l'altération de certains aliments. Elle est notamment surveillée au niveau des boissons à base de jus de fruits du fait de sa capacité à sporuler dans des conditions acides ($\text{pH} < 4,5$) (Bastos *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 1996). Le potentiel de la warnéricine RB4 comme conservateur alimentaire dans les boissons à base de jus de fruits semble être intéressant à étudier. (Minamikawa *et al.*, 2005).

❖ La **warnérine IEGM KL-1** (2999 Da) est un lantibiotique produit par *S. warneri* IEGM KL-1 (Korobov *et al.*, 2005) qui est principalement actif contre des bactéries à Gram positif (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *M. luteus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Rhodococcus ruber*) (Korobov *et al.*, 2003).

❖ Enfin, en 2005 au laboratoire, la souche *S. warneri* RK a été isolée (Hechard *et al.*, 2005). Elle produit trois peptides antimicrobiens : la **warnéricine RK** (WRK), la **δ -lysine I** et la **δ -lysine II**. Les trois ont été purifiés avec leur méthionine N-terminale formylée ou non (Verdon *et al.*, 2008).

Ces trois peptides sont courts (22 acides aminés pour WRK et 25 pour les δ -lysines), cationiques et très hydrophobes. Leurs masses molaires (non formylés) sont de 2561 Da pour la WRK, 2760 Da pour la δ -lysine I et 2871 Da pour la δ -lysine II (Hechard *et al.*, 2005; Verdon *et al.*, 2008).

Les deux δ -lysines présentent 80 % d'identité de séquence avec celle décrite chez *S. aureus* (Sung *et al.*, 2006) alors que la WRK semble avoir une séquence originale (Verdon *et al.*, 2008) (**Tableau 2**). Toutefois, tout comme la δ -lysine de *S. aureus*, la WRK se structure en hélice alpha amphiphile au contact de la membrane (**Figure 8**) (Lee *et al.*, 1987; Tappin *et al.*, 1988; Verdon *et al.*, 2009a).

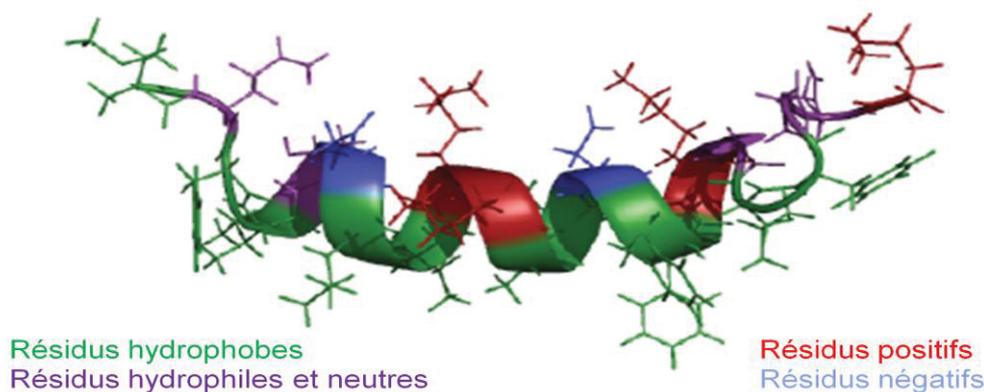


Figure 8. Structure tridimensionnelle de la WRK obtenue par RMN en présence de 8 % de TFE (Figure non publiée, J. Verdon).

Cependant, alors que la δ -lysine de *S. aureus* est décrite comme hémolytique mais n'ayant pas d'activité antibactérienne excepté contre *B. megaterium* à forte concentration (Dhople & Nagaraj, 1993; Kreger *et al.*, 1971), ces trois peptides présentent un même spectre d'activité, restreint au genre *Legionella*. En effet, exceptée une souche de *B. megaterium*, toutes les autres souches testées, qu'elles soient Gram positif ou Gram négatif sont résistantes à ces peptides. Au contraire, toutes les souches de *Legionella* testées y sont sensibles. Les trois peptides sont également hémolytiques (Verdon *et al.*, 2008).

La WRK agirait selon un mode d'action « detergent-like » (cf chapitre III-A-2) (Verdon *et al.*, 2009a). En effet, il a été montré que, comme pour la δ -lysine de *S. aureus* (Kerr *et al.*, 1995; Mellor *et al.*, 1988), la WRK déstabilise des membranes modèles composées de phosphatidylcholine, ce qui les rend perméables aux cations. Une perméabilisation des membranes de *Legionella* est également observée (Verdon *et al.*, 2009a).

4. *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus est présent sur la peau à l'état commensal. Cette bactérie que l'on pensait non pathogène est de plus en plus fréquemment impliquée dans des cas d'infections nosocomiales (Falcone *et al.*, 2004; Falcone *et al.*, 2006; Raponi *et al.*, 2005), ainsi que dans des cas de méningites, d'infections de la peau et des tissus mous ou d'endocardites (Falcone *et al.*, 2004; Falcone *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005; Raponi *et al.*, 2005; Shittu *et al.*, 2004). Cette bactérie est également connue pour être résistante à la méthicilline (Santos Sanches *et al.*, 2000) ainsi qu'aux antibiotiques glycopeptidiques ce qui est unique parmi les staphylocoques (Billot-Klein *et al.*, 1996; Campanile *et al.*, 2008; Falcone *et al.*, 2007).

En 1982, Beaudet *et al.* ont purifié un **inhibiteur de gonocoque** produit par *S. haemolyticus*. Cet inhibiteur fut décrit par Beaudet *et al.* comme une lipoprotéine ou une protéine associée à un lipide où la protéine, qui serait en fait un agrégat de peptides, est la partie active de l'inhibiteur (Beaudet *et al.*, 1982).

Deux ans plus tard, Frenette *et al.* ont caractérisé cette substance qui inhibe tous les gonocoques à 200 UA/mL en perméabilisant leur membrane, ce qui entraîne la mort de la cellule (Frenette *et al.*, 1988). Cet inhibiteur présente également une activité hémolytique contre divers types d'érythrocytes ainsi que la capacité de perturber la structure cellulaire de cellules humaines. Toutefois, l'ajout de phosphatidylcholine permet d'inhiber les activités antibactériennes et hémolytiques de cet inhibiteur (Frenette *et al.*, 1984).

Exceptée l'activité anti-gonococcale, les autres propriétés de cet inhibiteur rappellent celles décrites pour la δ -lysine de *S. aureus* (Chow *et al.*, 1983; Kreger *et al.*, 1971; Rogolsky, 1979; Wiseman, 1975). Toutefois, du point de vue de leurs caractéristiques physiques et chimiques, les

deux substances sont différentes (masse, point isoélectrique, composition en acides aminés...)(Frenette *et al.*, 1984).

Ce n'est qu'en 1988 que cet inhibiteur a été caractérisé (Watson *et al.*, 1988). Il s'agit en fait de trois peptides, nommés **GGI** (gonococcal growth inhibitor), qui sont longs de 44 acides aminés avec des homologies de séquences entre eux supérieures à 65% (**Figure 9**) (Watson *et al.*, 1988). Ces trois peptides, dont la méthionine en N-terminale est formylée, ont des masses molaires de 4555 Da pour le peptide I, 4759 Da pour le II et 4596 Da pour le III.

PSM β	MSKLAEAIAN	TVKAAQDDW	TKLGTSLVDI	VESGVSVLGK	IFGF
GGI-I	MQKLAEAIAA	AVSAGQDKDW	GKMGTSIVGI	VENGITVLGK	IFGF
GGI-II	MEKIANAVKS	AIEAGQNQDW	TKLGTSLLDI	VSNGVTELSK	IFGF
GGI-III	MSKLVQAISD	AVQAQQNQDW	AKLGTSLVGI	VENGVGILGK	LFGF
SLUSH-A	MSGIVDAITK	AVQAGLDKDW	ATMATSIAADA	IAKGVDFIAG	FFN-
SLUSH-B	MSGIEAITK	AVQAGLDKDW	ATMGTSIAEA	LAKGIDAISG	LFG-
SLUSH-C	MDGIFEAISK	AVQAGLDKDW	ATMGTSIAEA	LAKGVDFIIG	LFH-

Figure 9. Alignement de séquence de la PSM β de *S. epidermidis*, des GGI de *S. haemolyticus* et des SLUSH de *S. lugdunensis*.

Les acides aminés identiques sont indiqués en gris.

5. *Staphylococcus cohnii*

S. cohnii est une bactérie commensale de la flore cutanée humaine, qui est rarement pathogène chez l'homme. Toutefois, elle a été mise en cause dans quelques cas d'infections des voies urinaires et plus rarement dans des septicémies. Ces infections interviennent principalement chez des personnes immunodéprimées. De plus, la plupart des souches sont résistantes à différents antibiotiques dont la méthicilline (Gemell & Dawson, 1982; John *et al.*, 1978; Kleeman *et al.*, 1993; Kloos, 1980; Mastroianni *et al.*, 1995).

Les deux principales sous-espèces de cette bactérie sont *S. cohnii* ssp. *cohnii* et *S. cohnii* ssp. *urealyticus* (Kloos & Wolfshohl, 1991). Elles présentent toutes les deux une activité hémolytique contre les érythrocytes de mouton, de lapin ou d'homme ainsi qu'une activité cytotoxique contre les fibroblastes dermiques humains qui est due à la production d'une hémolysine (Mak *et al.*, 2008; Rozalska & Szewczyk, 2008).

❖ La purification de cette hémolysine par HPLC a permis de détecter 3 pics, correspondants à trois peptides hydrophobes nommées **H1C**, **H2C** et **H3C** pour la sous-espèce *cohnii*, et **H1U**, **H2U**, **H3U** pour la sous-espèce *urealyticus* (Mak *et al.*, 2008) :

- Les hémolysines H2C et H2U sont identiques. Elles sont composées de 18 acides aminés et sont produites avec une méthionine N-terminale formylée. Leur masse molaire théorique est de 2079,5 Da.
- Les hémolysines H1C, H1U, H3C et H3U, sont également formylées sur leur méthionine en N-terminal. Elles sont composées de 43 acides aminés. H1U et H1C qui sont identiques ont une masse molaire théorique de 4457 Da, et H3C et H3U, identiques également, ont une masse molaire théorique de 4481,06 Da.

Les hémolysines H1 et H3 présentent environ 70 % d'identité avec les trois hémolysines décrites chez *S. lugdunensis* (Donvito *et al.*, 1997a; Donvito *et al.*, 1997b; Mak *et al.*, 2008), et 30 à 40 % avec les trois inhibiteurs de gonocoques décrits chez *S. haemolyticus* (Mak *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 1988). Au contraire, elles ne présentent aucune similarité avec les δ -hémolysines de *S. aureus* (Fitton *et al.*, 1980) et *S. epidermidis* (Mak *et al.*, 2008; McKeivitt *et al.*, 1990).

Quant à l'hémolysine H2, elle présente une séquence unique qui ne semble pas avoir d'identité avec d'autres peptides connus (Mak *et al.*, 2008).

❖ Un autre peptide produit par cette bactérie a été décrit. Il s'agit de la **staphylococcine T** (2166 Da) provenant de la souche *S. cohnii* T (Furmanek *et al.*, 1999). Ce peptide est similaire à l'épidermine (2164 Da) produite par *S. epidermidis*. Il est essentiellement actif contre *Staphylococcus* sp..

6. *Staphylococcus lugdunensis*

S. lugdunensis se retrouve à l'état commensal sur la peau mais peut provoquer, dans certains cas, des infections (abcès des tissus mous, endocardites, péritonites, septicémies, infections urinaires...) (Frank *et al.*, 2008; Ortiz de la Tabla *et al.*, 1996; Vandenesch *et al.*, 1993; Vandenesch *et al.*, 1995).

Cette bactérie possède une activité hémolytique contre les érythrocytes de lapin (Frank *et al.*, 2008) et 95 % des *S. lugdunensis* produisent une hémolysine avec des propriétés similaires à celles de *S. aureus* (Hebert, 1990; Vandenesch *et al.*, 1991).

S. lugdunensis possède un locus *agr* (nommé *agr-sl*) similaire à 63 % à celui qui permet l'expression de la δ -lysine chez *S. aureus*. Toutefois, l'activité hémolytique de cette bactérie est due à trois peptides qui sont exprimés à partir d'un locus différent de *agr-sl* nommé *S. lugdunensis synergistic hemolysins (slush) A, B et C*. (Donvito *et al.*, 1997a). Ces peptides, **SLUSH A, B et C**, de 43 acides aminés, ont des séquences très similaires, et présentent une structure prédite en hélice alpha. Ils ont une masse molaire prédite de 4432,09 Da pour SLUSH A, 4323 Da pour B et 4539,24 Da pour C (**Figure 9**) (Donvito *et al.*, 1997a).

De plus, il y a 39 à 48 % d'homologie de séquence entre les SLUSH et les inhibiteurs de gonocoques de *S. haemolyticus* (Donvito *et al.*, 1997a).

7. *Staphylococcus hominis*

S. hominis est une bactérie commensale de la peau qui peut être la cause d'infections nosocomiales (Chaves *et al.*, 2005) ou de septicémies (d'Azevedo *et al.*, 2008).

❖ *S. hominis* KQ-131 produit un antibiotique de type A(II), la **nukacine KQ-1131**, qui est actif contre diverses souches de bactéries à Gram positif (*Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., bactéries lactiques). Cette bactériocine, d'une masse molaire de 3003,97 Da, a la même séquence que la nukacine ISK-1 produite par *S. warneri* ISK-1 à trois acides aminés près : un dans le peptide leader et deux dans le peptide mature. De plus, elle possède les mêmes activités antibactériennes et le même spectre d'inhibition.

La nukacine KQ-131 est donc un nouveau variant de la nukacine ISK-1 (Wilaipun *et al.*, 2008).

❖ *S. hominis* MBBL 2-9 produit l'**hominicine**. Ce peptide, qui appartiendrait à la famille des bactériocines de classe I, possède 21 acides aminés et a une masse molaire de 2038,4 Da. Il est actif contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif notamment contre des souches de *Lactobacillus* et *S. aureus* (Kim *et al.*, 2010).

8. *Staphylococcus intermedius*

S. intermedius est retrouvé chez divers animaux (pigeons, chats, chevaux, renards, rats laveurs, chèvres, écureuils) et principalement chez le chien où il est la cause d'infections de la peau, ou de gingivites (Allaker *et al.*, 1993; Kelesidis & Tsiodras, ; Talan *et al.*, 1989).

Quand la bactérie est retrouvée chez l'homme, c'est le plus souvent dans des plaies infectées dues à des morsures de chien (Talan *et al.*, 1989).

Cette bactérie possède un locus *agr* proche de celui retrouvé chez les autres *Staphylococcus*. Son séquençage a permis d'obtenir une séquence prédite de la δ -lysine, qui possède 64 % d'identité avec celle de *S. aureus*, ce qui laisse penser que ce peptide pourrait avoir le même mode d'action (**Tableau 2**) (Sung *et al.*, 2006).

9. *Staphylococcus simulans*

S. simulans est retrouvé chez les animaux, y compris les bovins (Razonable *et al.*, 2001). Chez l'homme, cette bactérie a été isolée dans des cas de septicémies, endocardites, infections des voies urinaires, ostéomyélites... (Iwantscheff *et al.*, 1985; Jansen *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 1991; Razonable *et al.*, 2001; Sturgess *et al.*, 1993).

❖ *S. simulans* possède lui aussi un homologue du locus *agr* de *S. aureus* dont la caractérisation a permis de prédire la séquence de la δ -lysine de *S. simulans* qui possède 65 % d'identité avec celle de *S. aureus* (**Tableau 2**) (Sung *et al.*, 2006; Tegmark *et al.*, 1998).

❖ *S. simulans* 3299 produit la **nukacine 3299**, qui est un lantibiotique de type A, de 27 acides aminés et d'une masse molaire de 2957,3 Da. Ce peptide inhibe 67 % des souches de *S. aureus* et 80 % des souches de *S. agalactiae* retrouvées dans les cas de mammite bovine. La nukacine 3299 est identique à la nukacine ISK-1 produite par *S. warneri* ISK-1 (Ceotto *et al.*, 2010).

III. Mécanismes d'action des peptides antibactériens

A. Mode d'action

La plupart des peptides antibactériens décrits précédemment agissent sur les cellules-cibles en deux étapes successives (**Figure 10**) :

- interaction initiale du peptide avec la membrane,
- puis perméabilisation de celle-ci selon différents mécanismes, entraînant une rupture du potentiel transmembranaire, une fuite du contenu cellulaire, et finalement la mort cellulaire (Dathe & Wieprecht, 1999).

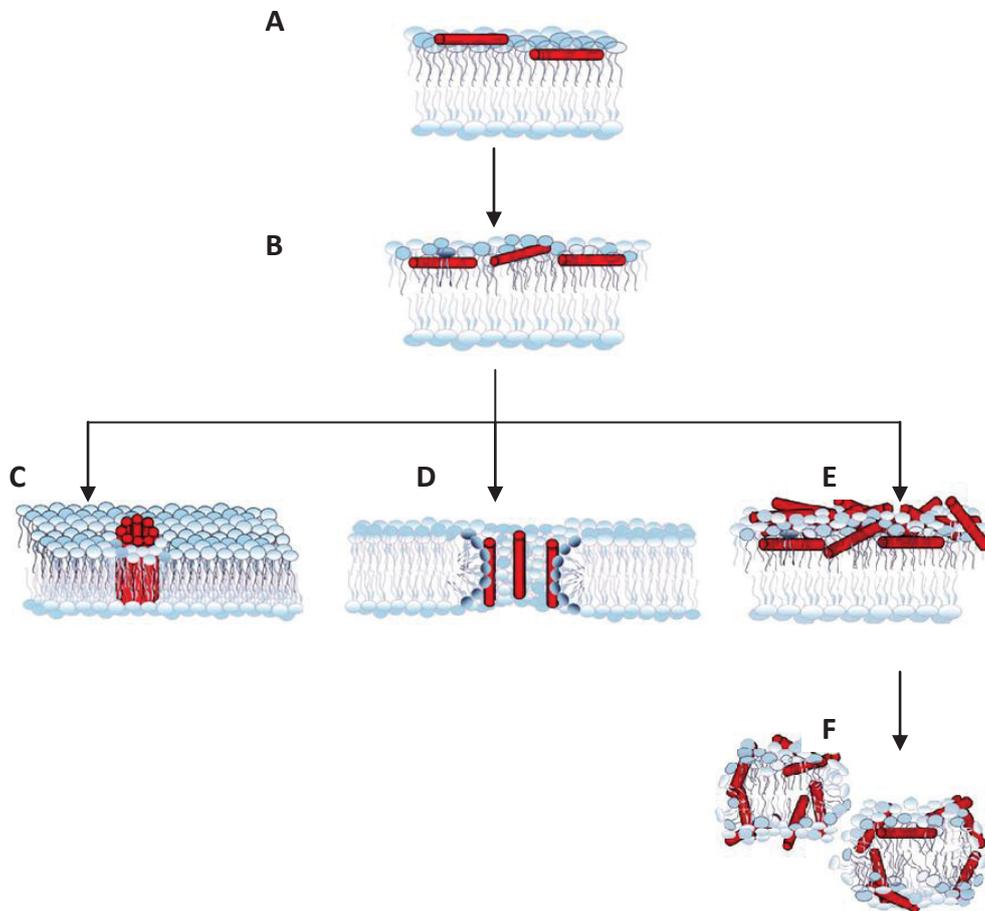


Figure 10. Modèles de perméabilisation des membranes par les peptides antimicrobiens (d'après Sato & Feix, 2006).

(A) Les peptides (cylindres rouges) s'associent à la membrane plus ou moins profondément, puis (B) s'y accumulent et commencent à perturber la membrane. Quand une concentration seuil en peptide est atteinte, le peptide perméabilise la membrane selon (C) le modèle du tonneau, (D) le modèle du pore torique ou (E-F) le modèle du tapis.

1. Interaction initiale du peptide avec la membrane

Cette interaction peut être non spécifique (de type électrostatique ou hydrophobe), ou spécifique (par interaction avec des molécules spécifiques). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons seulement au premier cas, qui correspond à la majorité des peptides antimicrobiens.

L'interaction initiale non spécifique dépend de deux paramètres principaux (**Figure 10-A**) :

- **attraction électrostatique** du peptide, chargé positivement, à la membrane bactérienne, anionique (Dathe *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1998; Oren & Shai, 1998; Tossi *et al.*, 2000). Ce sont notamment les résidus lysine et arginine, tous deux chargés positivement qui interagissent très fortement avec les groupements phosphates des bicouches lipidiques. Les forces électrostatiques sont actives sur des distances moléculaires relativement longues (Mavri & Vogel, 1996).
- **formation de l'hélice** qui génère une surface hydrophobe (Matsuzaki *et al.*, 1995). En effet, les peptides antimicrobiens sont généralement déstructurés en solution, mais se replient en hélice alpha amphiphile au contact des membranes, dans lesquelles ils peuvent alors s'insérer (Dathe & Wieprecht, 1999).

Chez les bactéries à Gram positif, l'enveloppe est chargée négativement *via* la présence des acides téichoïques et lipoteichoïques et des groupes carboxyles des acides aminés composant le peptidoglycane (PTG) (cf chapitre IV-A). Les peptides doivent traverser cette enveloppe pour atteindre la membrane cytoplasmique avec laquelle ils interagissent initialement au niveau du feuillet externe via les têtes polaires chargées négativement (Tossi *et al.*, 2000).

Chez les bactéries à Gram négatif, les peptides interagissent tout d'abord avec le feuillet externe de la membrane externe, riche en LPS. Cette interaction du peptide se fait selon un mécanisme nommé voie de translocation auto-induite (« self-promoted uptake ») (Hancock, 1997). Les peptides entrent en compétition avec des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) au niveau de leurs sites de fixation que sont les groupements phosphates présents à la surface du LPS. Le remplacement des ions par les peptides, plus volumineux, perturbe la membrane externe et cause l'apparition de fissures dans celle-ci, permettant le passage du peptide ainsi que d'autres composés hydrophobes. C'est donc le peptide lui-même qui perturbe la membrane pour s'y insérer, d'où le nom « self-promoted uptake » (Hancock, 1997).

A la suite de l'interaction initiale, le peptide commence à entrer et traverser la bicouche lipidique via différents mécanismes, afin au final, de lyser la cellule. Mais pour cela, une concentration seuil doit être atteinte (Yeaman & Yount, 2003). Ce seuil dépend (i) de la concentration en peptide et de sa capacité à s'auto-assembler et (ii) de la composition de la membrane (types de phospholipides, fluidité) (Yang *et al.*, 2000).

2. Perturbation de la membrane

Après cette interaction initiale, le peptide adopte une conformation en hélice amphiphile et peut perméabiliser la membrane *via* différents mécanismes (**Figure 10**) (Tossi *et al.*, 2000).

a) Modèle du tonneau (« barrel-stave model »)

Dans le modèle du tonneau (**Figure 10-C**), les peptides sont orientés perpendiculairement à la surface et sont positionnés tels des douves (« stave ») dans un tonneau (« barrel »). Leurs régions hydrophobes sont associées au cœur hydrophobe de la membrane (les chaînes d'acides gras), alors que leurs parties hydrophiles forment l'intérieur du pore. Initialement, les peptides se lient à la membrane sous forme de monomères et quand une concentration seuil est atteinte, les monomères s'agrègent par interaction entre leurs acides aminés hydrophiles, ce qui permet la formation du pore.

Les pores formés sont des structures dynamiques bien définies (Brogden, 2005; Yeaman & Yount, 2003).

L'alaméthicine, peptide isolé du champignon *Trichoderma viride*, agit selon ce modèle. Les pores formés sont composés de 3 à 11 peptides et ont un diamètre interne de 1,8 nm (Bechinger, 1999).

De même, ce mécanisme serait utilisé lors de la lyse des cellules eucaryotes (activité hémolytique par exemple) (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

b) Modèle du pore torique (« toroidal pore »)

Dans le modèle du pore torique (**Figure 10-D**) (Matsuzaki *et al.*, 1995; Matsuzaki *et al.*, 1996), les peptides s'orientent perpendiculairement à la surface membranaire, comme pour le modèle du tonneau.

Mais la formation du pore diffère puisque dans ce modèle, les parties hydrophiles du peptide restent en contact avec les têtes polaires de la membrane, ce qui induit une courbure

membranaire positive. Ainsi, c'est un complexe peptide (partie hydrophile)/lipide (tête polaire) qui forme la lumière du pore.

Les pores formés sont des structures bien définies de diamètre généralement plus important que pour le modèle du tonneau (3 à 5 nm) (Brogden, 2005; Yeaman & Yount, 2003).

Ce mécanisme est utilisé par la magainine 2, la mélittine ou encore le LL-37 (Hallock *et al.*, 2003; Henzler-Wildman *et al.*, 2004).

c) *Modèle du tapis ("carpet model")*

Dans le modèle du tapis (Pouny *et al.*, 1992), les peptides s'associent initialement avec la membrane parallèlement à sa surface, la couvrant à la façon d'un tapis (« carpet ») (**Figure 10-E**). Quand une concentration seuil en peptide est atteinte, la membrane est désintégrée de la même façon qu'avec un détergent (**Figure 10-F**), entraînant la formation de micelles et de pores. La présence de lipides chargés négativement permet la formation d'un tapis dense en réduisant les répulsions électrostatiques entre les peptides cationiques. La particularité de ce modèle par rapport aux deux précédents est que les peptides restent en contact avec les têtes polaires et n'interagissent pas forcément avec le cœur hydrophobe de la membrane (Oren & Shai, 1998; Powers & Hancock, 2003).

d) *Modèle « detergent-like »*

Dans le modèle du tapis, les peptides déstabilisent les membranes de la même façon que les détergents, et ceci à partir d'une concentration seuil en peptide (à fort ratio peptide/lipide (P/L)). Pourtant les peptides présentent également une activité contre les membranes à plus faible ratio P/L.

Pour expliquer l'influence de la concentration sur le type de mécanisme mis en jeu par le peptide, il a été proposé un modèle plus généraliste, nommé « detergent-like » (**Figure 11**) (Bechinger & Lohner, 2006). Ce modèle est basé sur la désintégration graduelle de la membrane en fonction de la quantité de peptide.

- **A faible ratio P/L**, le peptide perturbe la membrane de différentes façons. Une micelle de peptide peut interagir avec la membrane en adsorbant des molécules lipidiques, créant ainsi des ouvertures transitoires, ou en s'insérant au sein de la bicouche pour y former des structures de type pore mais sans structure et taille définie (Bechinger 2006,

hancock1999)). A faible ratio P/L, les peptides peuvent également simplement s'insérer dans la membrane pour la déstabiliser (Bechinger & Lohner, 2006).

- **A fort ratio P/L**, la membrane se désintègre par des mécanismes de type pore torique ou modèle du tapis (Bechinger & Lohner, 2006).

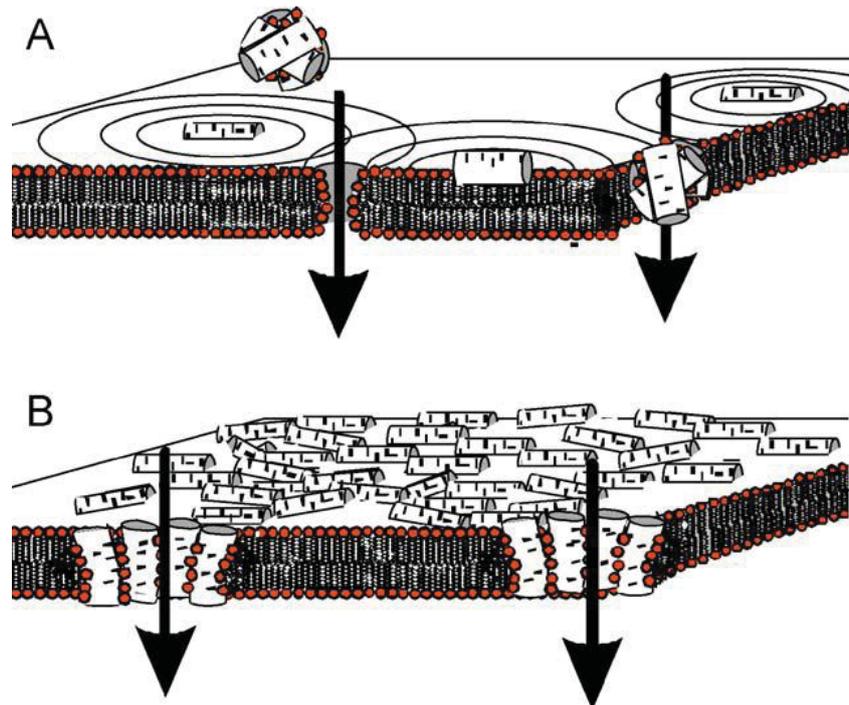


Figure 11. Modèle « detergent-like » (Bechinger & Lohner, 2006).

(A) A faible ratio P/L, les peptides perturbent la membrane comme des molécules de type détergent selon trois mécanismes et (B) à fort ratio P/L, les peptides désintègrent la membrane selon les modèles du tapis ou du pore torique.

Le mode d'action « detergent-like » serait utilisé par la δ -lysine de *S. aureus* (Verdon *et al.*, 2009b).

En effet, à faible concentration, la δ -lysine est adsorbée parallèlement à la surface de la membrane et diffuse à travers celle-ci en s'agréant sous forme de structures transitoires, de façon parallèle, perpendiculaire ou désordonnée. Ces structures transitoires peuvent induire un efflux d'ions ou encore un « flip-flop » des lipides.

A forte concentration, la δ -lysine solubilise la membrane à la façon d'un détergent, de façon graduelle avec obtention de structures membranaires de type lamellaire, puis discoïdale et enfin micellaire (Verdon *et al.*, 2009b).

La warnéricine RK, qui présente des caractéristiques proches de la δ -lysine agirait également selon un mécanisme « detergent-like » (Verdon *et al.*, 2009a).

3. Perturbation du fonctionnement de la cellule

Il a longtemps été admis que la perméabilisation membranaire causait une mort cellulaire directe. Cependant, la membrane cytoplasmique bactérienne est impliquée dans plusieurs fonctions essentielles de la cellule comme la perméabilité sélective et le maintien de gradients, l'énergétique cellulaire, la phosphorylation oxydative, la synthèse et la réticulation du PTG, de la chitine ou d'autres biopolymères, la motilité... Ainsi, la perturbation membranaire induite par les peptides selon les mécanismes décrits précédemment doit interférer avec une ou plusieurs de ces fonctions, entraînant également une mort cellulaire indirecte (Yeaman & Yount, 2003).

B. Etudes structure-activité

L'objectif de ces études est de déterminer pour un peptide les éléments structuraux lui permettant d'avoir avec une forte sélectivité antimicrobienne, c'est-à-dire une forte activité antibactérienne mais une toxicité minimale envers l'hôte, ceci en vue d'une application thérapeutique. La toxicité est généralement estimée par étude de l'activité hémolytique du peptide (Dathe & Wieprecht, 1999; Tossi *et al.*, 2000).

1. Méthodes utilisées

a) Modification de séquences

Cette méthode consiste à modifier des peptides naturels par délétion, ajout, substitution de un ou plusieurs résidus, ou par raccourcissement des parties N- ou C-terminales. Il est aussi possible de créer des peptides chimériques à partir de segments de différents peptides naturels.

De nombreuses études de ce type ont été réalisées notamment sur la cécropine, la mélittine, la magainine ou encore la δ -lysine (Blondelle & Houghten, 1991a; Dathe *et al.*, 2001; Dhople & Nagaraj, 2005; Kerr *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 2000; Tossi *et al.*, 2000; Verdon *et al.*, 2009b; Zelezetsky & Tossi, 2006).

b) Approche minimaliste

Dans l'approche minimaliste, les peptides sont créés *de novo* afin d'obtenir une structure en hélice alpha avec des paramètres physico-chimiques (hydrophobie, amphipathie...) déterminés (Tossi *et al.*, 2000). Ces peptides sont généralement constitués de l'un ou l'autre des acides aminés basiques, lysine ou arginine, et d'un ou deux résidus hydrophobes parmi l'alanine, la leucine, la phénylalanine ou le tryptophane.

Ces peptides sont généralement très antibactériens mais ne prennent pas en compte les subtilités de séquences qui ont été sélectionnées par l'évolution chez les peptides naturels, ce qui peut conduire à une perte de spécificité (Tossi *et al.*, 2000).

c) Utilisation d'une chimiothèque

Cette méthode permet le criblage simultané de plusieurs millions de peptides contenus dans une bibliothèque, et l'identification rapide de peptides biologiquement actifs sans connaissance préalable de structure ou de séquence. La bibliothèque peut être composée de molécules antibactériennes et/ou hémolytiques par exemple (Blondelle *et al.*, 1994; Blondelle *et al.*, 1996).

d) Utilisation d'une séquence matrice

Les séquences matrices sont obtenues par comparaison des séquences de peptides naturels et extraction de motifs significatifs (hydrophobie, charge...). Elles sont ensuite utilisées pour concevoir des peptides *de novo* (Tiozzo *et al.*, 1998; Tossi *et al.*, 1997; Tossi *et al.*, 2000). Cette méthode permet de limiter le nombre de peptides à synthétiser par rapport à la méthode de modification de séquences tout en conservant des informations basées sur la séquence au contraire de l'approche minimaliste (Tossi *et al.*, 2000).

2. Paramètres physico-chimiques

Lors d'études structure-activité, il faut prendre en compte différents paramètres physico-chimiques décrits dans les paragraphes suivants.

a) Taille et séquence

La plupart des peptides antimicrobiens en hélice alpha amphiphile ont moins de 50 résidus (Hancock, 1997). Il faut 3-4 résidus pour former un tour dans une hélice alpha, et donc 7-8 résidus (2 tours) pour former une hélice amphiphile. De plus, environ 22 résidus sont nécessaires pour traverser la bicouche lipidique (Shai, 2002).

Si le peptide est trop court, il ne possède pas suffisamment de résidus aliphatiques pour pouvoir interagir avec les membranes microbiennes. Pour compenser, il lui faudra donc une forte charge et une bonne capacité à former des hélices (Zelezetsky & Tossi, 2006).

Au niveau de la séquence en acides aminés, il y a une très faible conservation entre les différents peptides antibactériens, excepté la glycine souvent retrouvée en position 1 (70 %) et la lysine en position 8 (50 %) (Tossi *et al.*, 2000). Toutefois, la comparaison de 150 peptides issus de la banque de données AMSDb (Antimicrobial Sequences Database) révèle que certains types de résidus sont conservés (**Figure 12**). Ainsi, la partie hydrophobe de l'hélice amphiphile est bien définie avec de larges résidus amphipathiques au niveau N-terminal, et de plus petits résidus, en particulier l'alanine (stabilisateur d'hélice) aux parties centrales et C-terminales. Les résidus aromatiques sont rares et surtout retrouvés près de la partie N-terminale. Le secteur polaire est moins bien défini, mais on y retrouve souvent de la lysine (Tossi *et al.*, 2000).

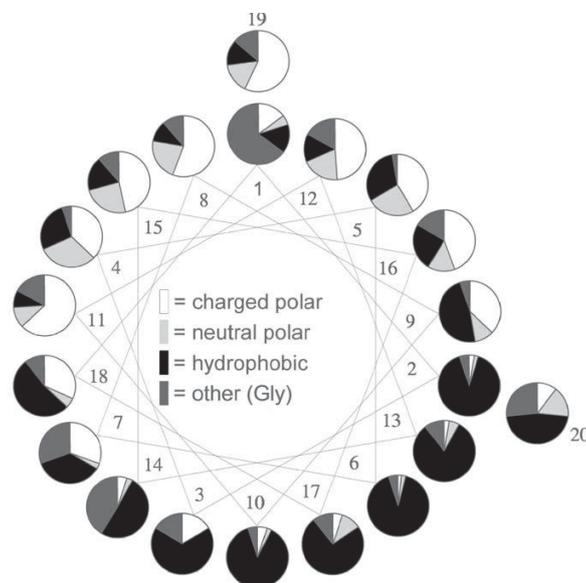


Figure 12. Fréquences relatives de chaque type de résidu (hydrophobe, polaire chargé ou polaire neutre) en fonction de sa position dans l'hélice alpha (Tossi *et al.*, 2000).

b) Charge

La plupart des peptides antimicrobiens ont une charge nette positive comprise entre +2 et +9 (**Figure 13**) (Dathe & Wieprecht, 1999; Tossi *et al.*, 2000). Celle-ci joue un rôle déterminant dans l'interaction initiale du peptide avec les membranes des cellules cibles.

Augmenter la charge d'un peptide permet ainsi d'améliorer ses activités antibactériennes et hémolytiques. Toutefois une charge excessive, au-delà de +6 ou +7 pour la magainine 2 par exemple, peut avoir un effet délétère sur l'activité antibactérienne (Dathe *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 1997; Tossi *et al.*, 2000). En effet, les interactions électrostatiques deviennent trop fortes et immobilisent les peptides cationiques au niveau des têtes polaires ce qui empêche leur insertion et donc la perturbation membranaire (Dathe *et al.*, 1996; Hinch & Crowe, 1996).

Au contraire, la réduction de la charge positive d'un peptide résulte en une perte de l'activité antimicrobienne alors que l'activité hémolytique est peu influencée, voire même augmentée dans le cas de la magainine. En effet, la diminution de la charge positive entraîne une diminution des interactions électrostatiques, alors remplacées par des interactions hydrophobes (Dathe & Wieprecht, 1999; Matsuzaki *et al.*, 1997).

La δ -lysine de *S. aureus*, neutre, est très hémolytique mais ne semble pas posséder d'activité antibactérienne. Toutefois, si on lui rajoute une charge en remplaçant un résidu négatif par une lysine, cela lui confère une activité antimicrobienne (Dhople & Nagaraj, 1995).

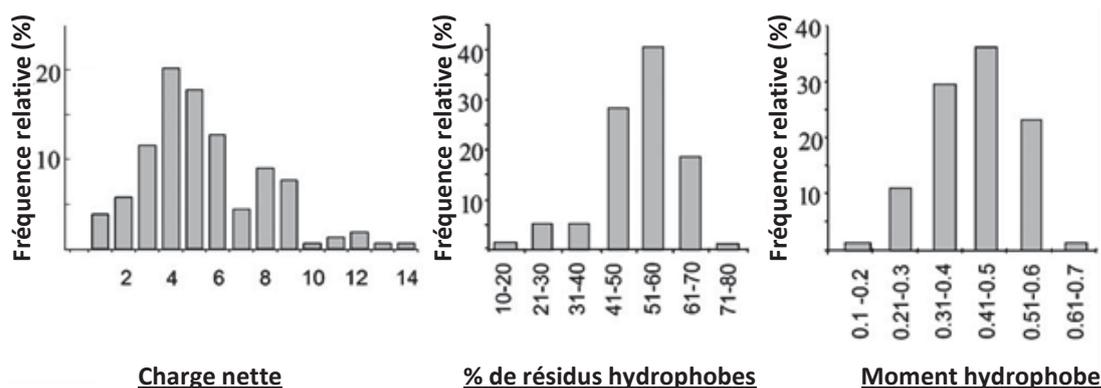


Figure 13. Distribution des peptides antibactériens en hélice alpha amphiphile en fonction de leur charge nette, de leur composition en résidus hydrophobe et de leur amphipathie (Zelezetsky & Tossi, 2006).

Les deux premiers paramètres ont été déterminés sur la séquence entière, et le troisième sur les 20 résidus N-terminaux.

c) *Hydrophobie*

L'hydrophobie d'un peptide, définie comme le pourcentage de résidus hydrophobes, représente sa capacité intrinsèque à passer d'une phase aqueuse à une phase hydrophobe (Dathe & Wieprecht, 1999).

La plupart des peptides antimicrobiens présentent 40 à 60 % de résidus hydrophobes, et sont donc globalement hydrophobes (**Figure 13**) (Tossi *et al.*, 2000).

Les interactions hydrophobes jouent un rôle important dans la partition des peptides au sein des membranes. Pour qu'un peptide soit actif, deux conditions sont requises en termes d'hydrophobie (Dathe & Wieprecht, 1999):

- le peptide doit être suffisamment soluble en milieux aqueux pour être transporté rapidement vers la cellule cible, en particulier dans le cadre de la réponse immunitaire contre des agents microbiens (faible hydrophobie requise)
- le peptide doit pouvoir interagir avec la partie hydrophobe de la membrane pour perturber la bicouche lipidique (forte hydrophobie requise).

Par conséquent, la plupart des peptides antimicrobiens sont modérément hydrophobes afin d'optimiser leur activité contre les membranes des cellules bactériennes (Yeaman & Yount, 2003).

L'augmentation de l'hydrophobie est corrélée à une augmentation de l'activité antibactérienne (Avrahami & Shai, 2002; Dathe *et al.*, 1997; Wieprecht *et al.*, 1997a). Toutefois, il existe une fenêtre optimale d'hydrophobie. Au-delà ou en-deçà, une diminution de l'activité antimicrobienne est observée.

En effet, si l'hydrophobie est trop faible, le peptide n'a que peu d'affinité pour les lipides membranaires. Au contraire, si elle est trop forte, le peptide s'agrège ce qui rend son passage à travers la paroi des cellules et donc son accès à la membrane cytoplasmique plus difficile (Dathe & Wieprecht, 1999; Huang *et al.*, 2010).

L'hydrophobie est en fait bien plus corrélée à l'activité hémolytique (Blondelle & Houghten, 1992; Dathe & Wieprecht, 1999). En effet, l'augmentation de ce paramètre permet une meilleure activité hémolytique et donc une diminution de la sélectivité antibactérienne (Wieprecht *et al.*, 1997a).

Contrairement aux cellules procaryotes, l'agrégation des peptides n'empêche pas l'accès à la membrane chez les eucaryotes (Huang *et al.*, 2010).

Pour résumer, l'hydrophobie influence bien plus la perméabilisation des membranes eucaryotes, neutres, que celle des membranes procaryotes, chargées négativement. L'explication donnée à ce phénomène est que, chez les procaryotes, il y a une balance entre les interactions électrostatiques et hydrophobes. Ainsi, la variation de l'hydrophobie est compensée par les forces électrostatiques, ce qui atténue l'effet observé lors de la modification de ce paramètre. Au contraire, chez les eucaryotes, les forces électrostatiques n'interviennent pas, donc une modification de l'hydrophobie influence fortement l'activité (**Figure 14**) (Dathe & Wieprecht, 1999).

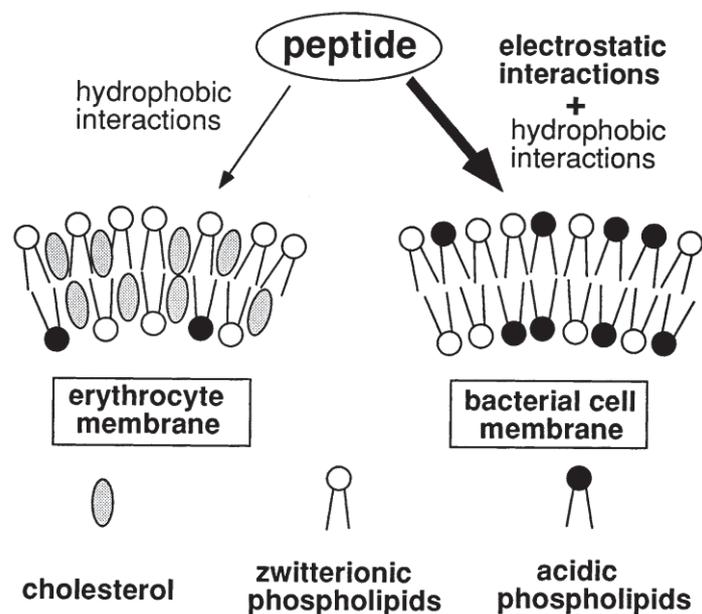


Figure 14. Importance de la charge des phospholipides sur l'activité des peptides cationiques en hélice alpha amphiphile (Matsuzaki, 1999).

Le feuillet externe des membranes eucaryotes présente une charge nette neutre, alors que celui des membranes procaryotes est chargé négativement via la présence des phospholipides négatifs (« acidic phospholipids »).

d) *Amphipathie et moment hydrophobe*

Le moment hydrophobe (**Figure 13**) est une mesure quantitative de l'amphiphilie (ou amphipathie) d'un peptide. Il est défini comme la somme vectorielle des indices d'hydrophobie de chaque acide aminé composant ce peptide (Eisenberg, 1984).

Il est difficile de corréliser clairement le moment hydrophobe et l'activité car (i) les résidus hydrophobes et hydrophiles ne sont pas distribués régulièrement dans la plupart des hélices alpha ce qui fait que le moment hydrophobe final n'est pas représentatif de ce qui se passe en chaque point du peptide et (ii) le moment hydrophobe est calculé sur la base d'une hélice alpha

idéale alors que les peptides liés à la membrane présentent rarement 100 % d'hélicité (Dathe & Wieprecht, 1999).

La variation du moment hydrophobe agit de façon similaire à la variation de l'hydrophobie. En effet, son augmentation permet d'améliorer son activité contre les membranes procaryotes, chargées négativement, mais encore plus contre les membranes eucaryotes dont la charge nette est neutre (**Figure 14**) (Dathe *et al.*, 1997; Yeaman & Yount, 2003).

Des études effectuées sur la mélittine ont confirmé que la diminution du moment hydrophobe conduit à la perte d'activité antibactérienne et hémolytique du peptide (Perez-Paya *et al.*, 1995).

e) Hélicité

Une hélice alpha amphiphile est composée d'un coté hydrophobe et d'un coté hydrophile, ce qui se manifeste au niveau de la séquence primaire par une périodicité des résidus polaires et apolaires. Cet agencement permet une interaction optimale avec la structure amphiphile des membranes biologiques (Dathe & Wieprecht, 1999).

Certains acides aminés sont connus pour favoriser l'adoption d'une structure en hélice alpha comme l'alanine, la leucine ou encore la lysine, alors que d'autres, tels que la proline ou la glycine, sont connus pour la déstabiliser (Chou & Fasman, 1978).

Lors de l'interaction initiale du peptide avec la membrane, la capacité à se structurer en hélice alpha amphiphile est un paramètre important (Tossi *et al.*, 2000).

L'augmentation de l'hélicité chez la melittine, en ôtant un résidu glycine ou en le remplaçant par un résidu leucine, est corrélée à une augmentation de ses activités hémolytiques et antibactériennes (Blondelle & Houghten, 1991a; Blondelle & Houghten, 1991b). Au contraire, la diminution de l'hélicité entraîne une diminution des activités (Perez-Paya *et al.*, 1995). Toutefois, si la lysine est remplacée par une glycine en position 7, la propension à former une hélice est diminuée, mais cela n'a que peu d'influence sur les activités antimicrobiennes et hémolytiques (Blondelle *et al.*, 1995).

Toutefois, dans ces études, la modification de l'hélicité entraîne la modification d'autres paramètres ce qui peut dissimuler le rôle réel de ce paramètre. Pour palier à cela, des peptides ont été construits par remplacement des acides aminés L par leurs énantiomères D. Ceci perturbe localement l'hélicité sans modifier les autres paramètres. Dans ce cas, l'activité hémolytique est diminuée alors que l'activité antibactérienne est peu modifiée (Pouny *et al.*, 1992; Wieprecht *et al.*, 1996). Dathe *et al.*, en 1996, ont confirmé que l'hélicité est un paramètre primordial pour l'action sur les membranes lipidiques neutres mais n'apparaît pas essentiel pour la perméabilisation des bicouches chargées négativement (Dathe *et al.*, 1996).

f) Angle polaire

La fixation des peptides antimicrobiens dans la membrane se fait par interaction entre la partie hydrophobe de l'hélice et les chaînes d'acides gras des lipides, alors que la partie hydrophile reste en contact avec les têtes polaires (Dathe & Wieprecht, 1999).

La proportion relative des faces polaires et apolaires d'un peptide conformé en hélice alpha amphiphile est exprimée par l'angle polaire. Par exemple, si une face est composée uniquement de résidus hydrophobes et l'autre de résidus polaires, l'angle polaire est de 180° (Yeaman & Yount, 2003).

L'angle polaire influence la localisation du peptide dans la membrane ainsi que la structure des pores transmembranaires formés (**Figure 15**). Les peptides avec un petit angle polaire et une forte hydrophobie ont tendance à faire des pores transmembranaires alors que les peptides avec un angle polaire d'environ 180° s'orientent parallèlement à la membrane (Dathe & Wieprecht, 1999).

Chez les procaryotes, les forces électrostatiques permettent l'ancrage des peptides à la membrane, qui s'y insèrent plus ou moins profondément en fonction de l'angle polaire (**Figure 15-A**) (Dathe *et al.*, 2002).

Chez les eucaryotes, la diminution de l'angle polaire augmente la partie hydrophobe du peptide qui peut alors s'associer profondément dans la membrane sans interagir avec les têtes polaires. Cela entraîne une déstabilisation de la membrane et la libération de micelles peptide/lipide (**Figure 15-B**) (Dathe *et al.*, 2002).

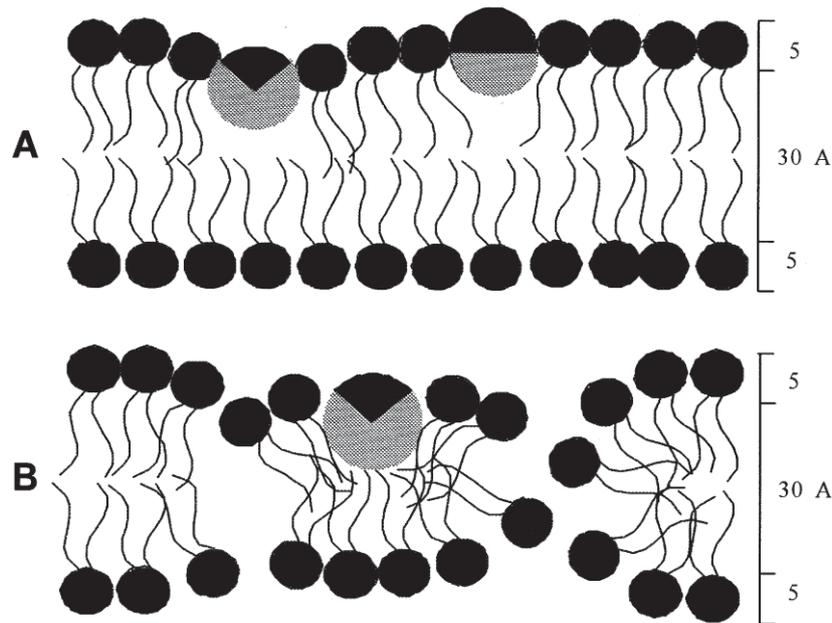


Figure 15. Illustration de l'influence de l'angle polaire sur l'insertion dans les membranes composées (A) de POPG chargé négativement et (B) de POPC neutre (Dathe *et al.*, 2002).

Les disques gris et noir représentent les peptides, la partie hydrophobe du peptide étant en gris et la partie polaire en noir.

Tytler *et al.* rapportent qu'une augmentation de l'angle polaire entraîne une diminution de l'activité hémolytique (Tytler *et al.*, 1993). Mais pour Dathe *et al.*, ce paramètre n'a que peu d'effet sur l'activité hémolytique et sur l'activité de perméabilisation des membranes non chargées (Dathe & Wieprecht, 1999).

A l'inverse, un angle polaire plus petit (et donc une plus grande surface hydrophobe) est associé à une augmentation de la capacité à perméabiliser les membranes (Dathe *et al.*, 1997; Uematsu & Matsuzaki, 2000; Wieprecht *et al.*, 1997b).

g) Conclusion

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer le rôle de chaque paramètre dans l'activité hémolytique et/ou antibactérienne afin d'obtenir un peptide avec une bonne sélectivité. Mais chacun de ces paramètres étant interconnecté (**Figure 16**), il est assez difficile d'observer l'influence d'un seul paramètre à la fois sur ces activités.

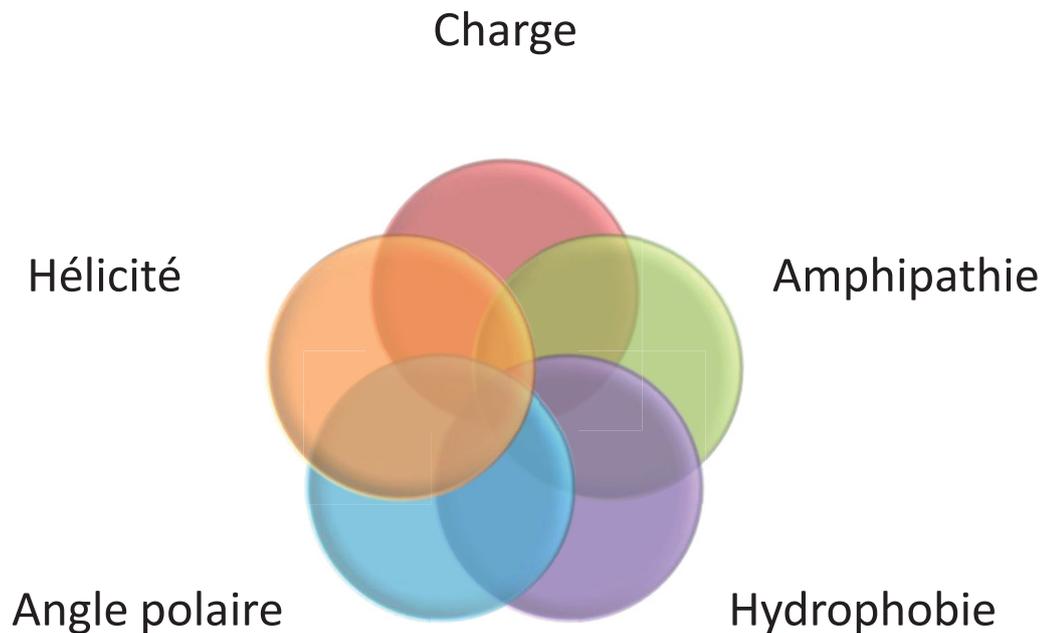


Figure 16. Interconnexion entre les différents paramètres physico-chimiques des peptides antimicrobiens (d'après Yeaman & Yount, 2003).

La séquence peptidique influence non seulement les propriétés biochimiques des peptides (charge, amphipathie, hydrophobie) mais aussi leur structure tridimensionnelle (hélicité, angle polaire).

En résumé, l'activité hémolytique peut être diminuée (donc la sélectivité augmentée) par réduction de l'hélicité, de l'hydrophobie, du moment hydrophobe et de l'angle polaire (Dathe & Wieprecht, 1999; Dathe *et al.*, 2002). Toutefois, il faut faire attention à rester dans des valeurs modérées, sous peine d'être défavorable également à l'activité antibactérienne et donc à la sélectivité (Yeaman & Yount, 2003).

IV. Les membranes biologiques

A. Généralités

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la composition de la membrane joue un rôle essentiel dans la sensibilité des cellules aux peptides antimicrobiens. La membrane plasmique est également une véritable barrière physique qui protège la cellule. Elle joue aussi le rôle d'exosquelette, conférant sa forme à la cellule et lui permettant de résister à la forte pression osmotique interne.

Elle est constituée d'une bicouche lipidique composée essentiellement de phospholipides et de protéines.

Chez les eucaryotes, dont la membrane modèle est celle des érythrocytes, du cholestérol est également présent.

Chez les procaryotes, cette membrane plasmique est entourée d'une paroi qui a une structure différente chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

- La paroi des bactéries à Gram négatif (**Figure 17-A**) est composée d'un espace périplasmique constitué d'une fine couche de PTG fortement réticulé, et d'une membrane externe qui est une bicouche dont le feuillet interne est composé essentiellement de phospholipides et de lipoprotéines connectant la membrane externe au PTG. Le feuillet externe est constitué de lipopolysaccharide (LPS) (Eband & Eband, 2009b; Nizet, 2006). Cette membrane externe est perméable aux molécules hydrophiles de taille inférieure à 600 Da grâce à la présence de porines.
- Chez les bactéries à Gram positif (**Figure 17-B**), la paroi est constituée essentiellement d'un épais PTG, qui aide à maintenir la forme des cellules, et de polymères anioniques qui le traversent. Ces molécules sont les acides téichoïques, qui sont attachés de façon covalente au PTG, et les acides lipotéichoïques, qui sont liés aux têtes polaires des lipides membranaires (Eband & Eband, 2009b).

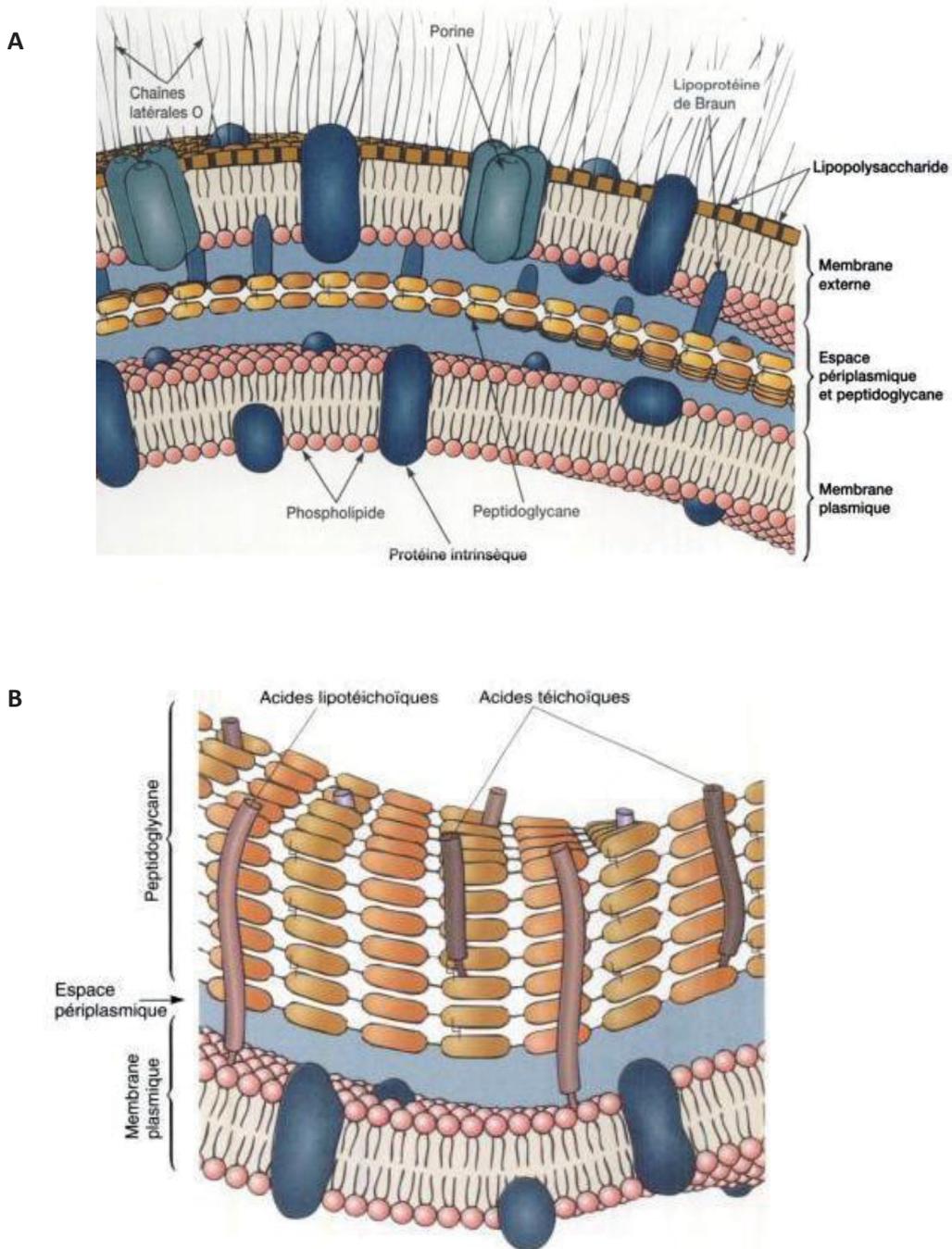
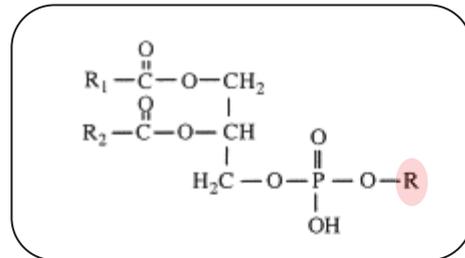


Figure 17. Enveloppe des bactéries (A) à Gram négatif et (B) à Gram positif (Prescott *et al.*, 2003).

Les phospholipides sont les composants essentiels et communs à tous ces types membranaires. C'est pour cela que leur structure et leur répartition dans les différentes membranes vont être détaillées dans les chapitres suivants.

B. Les phospholipides membranaires

Les phospholipides membranaires sont constitués d'un squelette glycérol possédant deux molécules d'acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2, et un groupement phosphate en position *sn*-3 qui porte la tête polaire (R) (**Figure 18**).



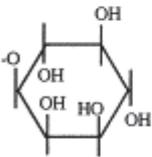
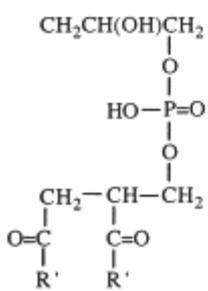
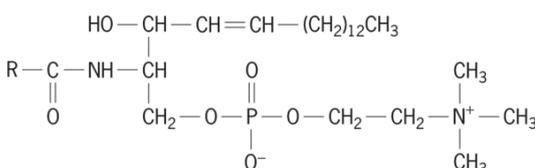
Head group (R)	Phospholipid class
H	Phosphatidic acid (PA)
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Phosphatidylserine (PS)
$ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ $	Phosphatidylethanolamine (PE)
$ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ $	Phosphatidylcholine (PC)
$ \text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} $	Phosphatidyl glycerol (PG)
	Phosphatidyl inositol (PI)
	Diphosphatidyl glycerol (DPG) (cardiolipin)
	Sphingomyelin (SM)

Figure 18. Structure des principaux phospholipides membranaires (d'après Fang & Barcelona, 1998).

R représente la tête polaire; R₁, R₂ et R' représentent les parties alkyles des chaînes d'acides gras.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles. En effet, la partie phosphate et têtes polaires est hydrophile alors que les chaînes d'acides gras sont hydrophobes.

Les phospholipides phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et sphingomyéline (SM) ont une charge nette neutre, le groupement phosphate étant chargé négativement et la tête polaire positivement.

Au contraire, le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et la cardiolipide (CL) ont une tête polaire chargée négativement et présentent donc une charge nette négative.

D'autre part, les stérols, comme le cholestérol, retrouvés chez les eucaryotes, mais pas chez les procaryotes sont généralement neutres.

Ainsi, la charge nette d'une biomembrane dépend beaucoup de sa composition en phospholipides (Yeaman & Yount, 2003).

La distribution des phospholipides dans la bicouche membranaire est très asymétrique. Par exemple, seulement 2 % des PE des érythrocytes bovins sont positionnés dans le feuillet externe (Florin-Christensen *et al.*, 2001; Yeaman & Yount, 2003). Cette distribution asymétrique joue un rôle dans la fluidité et la transition de phase des membranes (McIntosh *et al.*, 2001; Verkleij & Post, 2000).

1. Chez les procaryotes

La composition lipidique varie d'une espèce à l'autre mais en général les membranes des bactéries à Gram positif sont essentiellement composées de phospholipides anioniques tels que PG et CL, alors que les bactéries à Gram négatif le sont de phospholipides anioniques et zwitterioniques (PG, CL et PE) (Epanand & Epanand, 2009a; Yeaman & Yount, 2003).

Les membranes bactériennes sont donc chargées négativement, ce qui facilite l'interaction des peptides antimicrobiens chargés positivement avec celles-ci (Yeaman & Yount, 2003).

Pendant longtemps, PC, phospholipide majoritaire des eucaryotes, était considéré comme absent de la plupart des bactéries, excepté les bactéries spécialisées dans la photosynthèse ou en étroite relation avec des eucaryotes (Hagen *et al.*, 1966; Sohlenkamp *et al.*, 2003). Cependant, grâce à la connaissance d'un grand nombre de génomes bactériens entièrement séquencés, il apparaît évident que les gènes impliqués dans la biosynthèse de PC ne sont pas limités à un groupe restreint de bactéries, mais que la présence de PC dans les membranes bactériennes est sans doute bien plus répandue qu'on ne le pensait à l'origine (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

Toutefois, PC ne serait pas présent dans les membranes des deux organismes modèles procaryotes, *E. coli* (Gram négatif) et *B. subtilis* (Gram positif) (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

Différentes études ont été réalisées afin de déterminer les compositions membranaires de plusieurs espèces bactériennes (**Tableau 3**). Pour les bactéries à Gram négatif, la composition lipidique globale tient généralement compte de l'ensemble des lipides composant la membrane cytoplasmique et le feuillet interne de la membrane externe (Romantsov *et al.*, 2009).

Tableau 3. Composition en phospholipides de différentes bactéries à Gram négatif et positif (d'après Epanand & Epanand, 2009b).

Espèce bactérienne	% de lipides totaux		
	CL	PG	PE
Bactéries à Gram négatif			
<i>Escherichia coli</i>	5	15	80
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	21	74
<i>Proteus mirabilis</i>	5	10	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5	82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	21	60
Bactéries à Gram positif			
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	58	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	50	50	0
<i>Bacillus cereus</i>	17	40	43
<i>Bacillus polymyxa</i>	8	3	60

De plus, il existe une fluctuation de la composition en phospholipides en fonction des conditions de culture (milieu de croissance, phase exponentielle ou stationnaire, température, pH...). López *et al.* ainsi que Romantsov *et al.* ont par exemple étudié la variation des phospholipides membranaires en fonction de l'osmolarité du milieu chez *B. subtilis* et *E. coli* (**Tableau 4**) (Lopez *et al.*, 1998; Romantsov *et al.*, 2009).

Tableau 4. Impact de l'osmolarité du milieu et/ou de la phase de croissance sur la composition en phospholipides de *B. subtilis* et *E. coli* (d'après Romantsov *et al.*, 2009).

Espèce bactérienne	Phase de croissance	% de phospholipides totaux		
		Lipide	Faible osmolarité	Forte osmolarité
<i>B. subtilis</i>	ND	PE	20	17
		PG	42	32
		LPG	14	5
		CL	24	46
<i>E. coli</i>	Exponentielle	PE	79	74
		PG	18	18
		CL	4	8
	Stationnaire	PE	91	86
		PG	3	5
		CL	6	9

Les bactéries ont été cultivées en milieu LB (*B. subtilis*) ou MOPS (*E. coli*) supplémentés (forte osmolarité) ou non (faible osmolarité) en NaCl.

ND : Non déterminé; **LPG** : lysophosphatidylglycérol

Ainsi, une augmentation de l'osmolarité entraîne une augmentation de la proportion de CL compensée chez *B. subtilis* par une diminution de PG, et chez *E. coli* de PE. De plus, *E. coli* en phase stationnaire présente plus de PE et moins de PG qu'en phase exponentielle.

2. Chez les eucaryotes

La membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes est composée essentiellement de PC, PE, SM et de stérols (cholestérol). Ainsi, ces membranes ne sont pas chargées ce qui défavorise leur interaction avec les peptides antimicrobiens (Frey & Gaipf, 2010; Yeaman & Yount, 2003). De plus, la présence de cholestérol réduit fortement l'activité de ces peptides en stabilisant la bicouche lipidique ou en interagissant avec les peptides et en les bloquant (Matsuzaki, 1999; Silvestro *et al.*, 1997).

Chez les eucaryotes, PG et CL sont absents de la membrane cytoplasmique mais sont retrouvés dans les membranes mitochondriales (Epanand & Epanand, 2009a).

Comme pour les bactéries, il existe une variabilité dans la composition en phospholipides entre différents types cellulaires. Toutefois, la membrane des érythrocytes est typique des cellules eucaryotes. Ainsi, les phospholipides retrouvés en majorité chez les érythrocytes humains sont PC, PE et SM (Figure 19-A). Ces cellules présentent également un fort taux de cholestérol (Korzhenevskiy & Selischeva, 2009; Yeaman & Yount, 2003).

Comme pour les procaryotes, les membranes sont asymétriques, avec par exemple presque 100 % de PS présent sur le feuillet interne (Figure 19-B) (Frey & Gaipl, 2010).

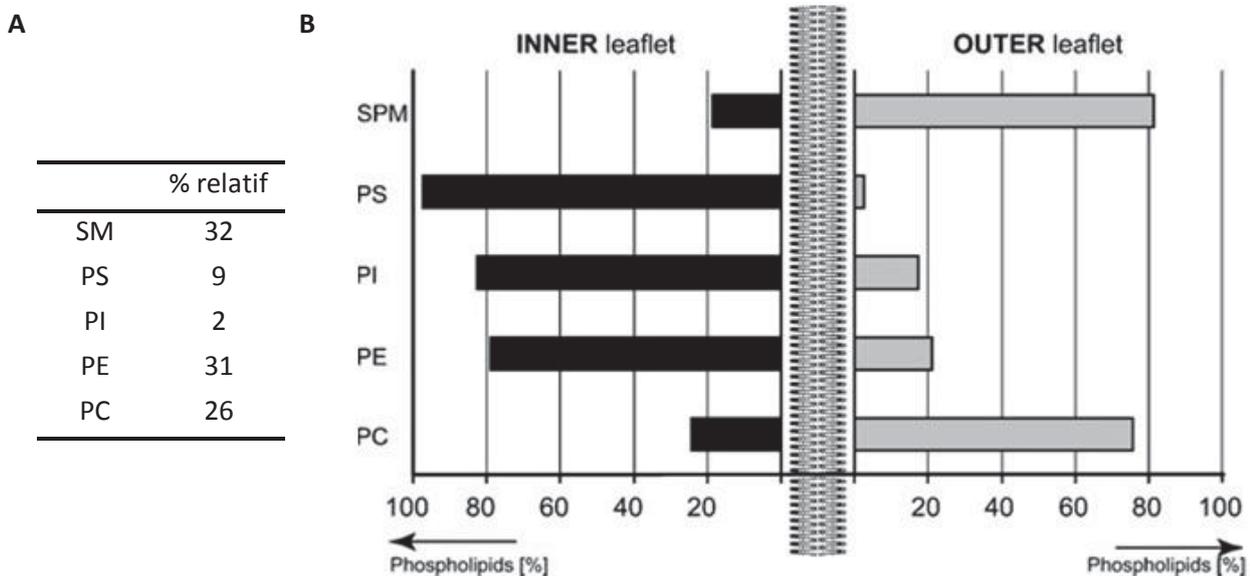


Figure 19. Composition membranaire et distribution des phospholipides entre les feuillets internes et externes de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (d'après Frey & Gaipl, 2010 ; Korzhenevskiy & Selischeva, 2009).

SPM : sphingomyéline

Parmi les cellules eucaryotes, les cellules cancéreuses ont une membrane atypique. En effet, celle-ci est plus fluide que celle des cellules saines (Kozłowska *et al.*, 1999; Sok *et al.*, 1999), et leur feuillet externe est chargé négativement grâce à la présence d'environ 10 % de PS, phospholipide absent dans ce feuillet chez les cellules saines (Ran & Thorpe, 2002; Utsugi *et al.*, 1991; Zachowski, 1993; Zwaal & Schroit, 1997).

Ces différences peuvent expliquer la sélectivité de certains peptides pour les cellules cancéreuses en facilitant les interactions électrostatiques et la déstabilisation membranaire (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

De plus, les cellules cancéreuses peuvent fixer un plus grand nombre de peptides anticancéreux grâce à une plus grande surface cellulaire que les cellules saines due à la présence de nombreux microvilli qui sont des projections de la membrane (Domagala & Koss, 1980; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

3. Chez *Legionella pneumophila*

Peu d'études traitent de la composition en phospholipides membranaires des bactéries du genre *Legionella*.

L. pneumophila présente une composition membranaire atypique parmi les bactéries à Gram négatif. En effet, sa membrane est composée essentiellement de PE (40-45 %), PC (35 %), PG (10-15 %) et CL (10-15 %) (Conover *et al.*, 2008; Hindahl & Iglewski, 1984).

Ces résultats confirment ce qui a été décrit par Sohlenkamp *et al.*, à savoir que les bactéries en étroite relation avec des eucaryotes, telles que *L. pneumophila*, présentent un fort taux de PC dans leurs membranes (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

Le rôle de PC dans les membranes bactériennes reste inexpliqué. Toutefois, Conover *et al.* ont montré que l'interaction de *L. pneumophila* avec les cellules hôtes nécessite ce phospholipide. En effet, l'absence de PC dans l'enveloppe cellulaire entraîne une diminution de l'infection des macrophages par *Legionella* ainsi que la perte de sa toxicité. Ces effets sont corrélés à une diminution de l'expression de la flagelline, une diminution de l'adhésion aux macrophages et une diminution de la translocation d'effecteurs via le système *dot/icm* (Conover *et al.*, 2008).

C. Les acides gras

Les acides gras correspondent à la partie hydrophobe des phospholipides et jouent également un rôle important dans la différenciation des types membranaires.

Ce sont des acides carboxyliques (R-COOH) à chaîne carbonée plus ou moins longue (de 14 à 20 atomes de carbone pour les plus communs) (**Figure 20**).

Fatty acid	Structure	Effect on membrane fluidity
C16:0		Decreases membrane fluidity
Cis-11-C18:1		Increases membrane fluidity
Iso-C17:0		Decreases membrane fluidity compared with anteiso-chains
Anteiso-C17:0		Increases membrane fluidity compared with iso-chains
Cyclopropane-C17:0		Mimics unsaturated fatty acids and increases stability to acid stress
Trans-11-C18:1		Mimics saturated fatty acids, and provides resistance to solvents and increases in growth temperature

Figure 20. Structure des différents acides gras retrouvés dans les phospholipides membranaires, et leur rôle dans la fluidité membranaire (Zhang & Rock, 2008).

Les acides gras saturés sont notés $C_n:p$; n représentant le nombre de carbones de la chaîne, et p le nombre d'insaturations.

La double liaison est très majoritairement de géométrie *cis*, entraînant une courbure au sein de la chaîne.

De plus, certains acides gras contiennent des groupements méthyles branchés en position *iso* (sur l'avant dernier carbone, noté *iC*) ou *anteiso* (sur l'antépénultième carbone, noté *aC*). Il faut noter que ces acides gras sont généralement saturés.

Enfin, certains acides gras possèdent un noyau cyclopropane (Zhang & Rock, 2008).

La structure des acides gras a un lien direct avec la fluidité de la membrane (**Figure 20**). Ainsi, les acides gras saturés vont adopter une conformation linéaire compacte entraînant une rigidité importante de la membrane. Parmi les acides gras insaturés, une conformation en *cis* de la double liaison conduira à une courbure rigide de la chaîne aliphatique hydrophobe, et donc à une diminution des interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras et une augmentation de la fluidité membranaire. La composition en acides gras branchés joue

également un rôle sur la fluidité membranaire en raison de l'effet destructeur du groupement méthyle sur le compactage des chaînes aliphatiques hydrophobes. Ainsi, les acides gras *antéiso* fluidifient plus la membrane que les acides gras *iso* car leur groupement méthyle est plus loin de l'extrémité de la chaîne (Zhang & Rock, 2008).

1. Chez les procaryotes

Chez la plupart des bactéries, les acides gras insaturés se limitent à des acides mono-insaturés. De plus, les acides gras ramifiés sont des composants courants des bactéries à Gram positif, mais sont rarement retrouvés chez les bactéries à Gram négatif (Kaneda, 1991).

Chez *E. coli*, organisme modèle des bactéries à Gram négatif, les acides gras majoritaires sont C16:0 et C18:1.

Des acides gras avec un noyau cyclopropane sont également retrouvés (C17:Δ et C19:Δ). Tout comme pour les têtes polaires des phospholipides, la composition en acide gras varie d'un organisme à l'autre ainsi qu'en fonction des conditions de croissance (**Tableau 5**) (Kato & Bito, 1978).

Tableau 5. Composition en acides gras membranaires d'*E. coli* en phase stationnaire, après une culture à 25 ou 42°C (Kato & Bito, 1978).

Acide gras	Composition en acides gras (%)							
	Croissance à 25°C				Croissance à 42°C			
	Phospholipides totaux	CL	PE	PG	Phospholipides totaux	CL	PE	PG
14:0	1	1	0	0	2	3	2	0
16:0	30	21	28	30	44	46	44	43
16:1	11	8	14	11	12	14	11	11
17:Δ	10	3	11	7	15	9	16	12
18:1	46	64	41	46	23	24	22	29
19:Δ	2	3	2	2	4	4	5	4
Insaturés	57	72	55	57	35	38	33	40

Chez *B. subtilis*, représentant des bactéries à Gram positif, les acides gras branchés représentent environ 85 % des acides gras totaux. Parmi eux, les plus retrouvés sont les iC15:0 et

aC15:0. Contrairement aux bactéries à Gram négatif, le taux d'acides gras insaturés est faible (**Tableau 6**) (Beranova *et al.*, 2010).

Tableau 6. Composition en acides gras membranaires de *B. subtilis* en phase exponentielle, après une culture à 25 ou 37°C (Beranova *et al.*, 2010).

Acide gras	Composition en acides gras (%)	
	Culture à 25°C	Culture à 37°C
iC14:0	2	3
iC15:0	23	15
aC15:0	39	32
iC16:0	5	8
C16:0	5	10
iC17:0	8	12
aC17:0	8	11
C18:0	1	2
Autres	4	6
<i>Antéiso</i>	48	43
<i>Iso</i>	39	39
Non branchés	8	15
Insaturés	4	2

2. Chez les eucaryotes

Contrairement aux cellules procaryotes, les cellules eucaryotes ont des membranes riches en acides gras poly-insaturés mais avec peu ou pas d'acides gras branchés. Les chaînes d'acides gras sont également plus longues que chez les procaryotes.

Les acides gras majoritaires sont C16:0, C18:0, C18:1, C20:4 et C18:2. (**Tableau 7**) (Bu *et al.*, 2006; Novgorodtseva *et al.*, 2010).

Tableau 7. Liste des acides gras les plus retrouvés dans les membranes des érythrocytes humains (Bu *et al.*, 2006).

Acide gras	% relatif
C16 :0	20
C18 :0	14
C18 :1	11
C18 :2	10
C20 :4	12
C22 :0	2
C22 :6	2
C24 :0	5
C24 :1	4
Saturés	42
Insaturés	50

Les cellules cancéreuses présentent un profil en acide gras différent des cellules saines. Par exemple, les membranes cellulaires des cancers colorectaux présentent une augmentation des acides gras C18:1 et C20:4 et une diminution du C18:2 (Fernandez-Banares *et al.*, 1996; Szachowicz-Petelska *et al.*, 2007).

Dans tous les types de membrane (eucaryote, procaryote), l'acide gras C16:0, sans insaturation et de longueur moyenne, fait souvent partie des acides gras majoritaires.

3. Chez *Legionella pneumophila*

Les phospholipides présentant des acides gras ramifiés sont caractéristiques des bactéries à Gram positif mais peuvent être retrouvés chez quelques bactéries à Gram négatif comme *L. pneumophila*, chez qui ils représentent environ 60-70 % des acides gras totaux (Kaneda, 1991).

Toutefois, les conditions de culture ont un effet très prononcé sur la composition en acides gras de *L. pneumophila*. En effet, les acides gras branchés représentent 25 % du total pour les *Legionella* en phase exponentielle de croissance mais 66 % en phase stationnaire (**Tableau 8**) (Verdon *et al.*, 2011).

Tableau 8. Composition en acides gras de *L. pneumophila* en phase exponentielle et phase stationnaire (Verdon *et al.*, 2011).

Acide gras	Composition en acides gras (%)	
	Phase exponentielle	Phase stationnaire
iC14 :0	1	6
aC15 :0	6	11
iC16 :0	9	39
C16 :1	10	8
C16 :0	42	8
aC17 :0	8	9
C17 :0	2	2
C18 :0	15	7
C20 :0	3	4
Branchés	25	66
Insaturés	10	8
Chaines courtes	8	18

Globalement, il y a chez les *Legionella* en phase stationnaire trois fois plus d'acides gras branchés et deux fois plus d'acides gras à chaîne courte (< 16 C) que chez les *Legionella* en phase exponentielle. Par exemple, en phase stationnaire, l'acide gras iC16:0 est majoritaire alors que c'est le C16 :0 qui l'est chez les *Legionella* en phase exponentielle (Barker *et al.*, 1993; Finnerty *et al.*, 1979; Moss *et al.*, 1977; Moss & Dees, 1979; Verdon *et al.*, 2011).

Ces modifications ont été liées à une baisse de la sensibilité à la warnéricine RK, peptide anti-*Legionella*, lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance (Verdon *et al.*, 2011).

MATERIELS & METHODES

I. Cellules et conditions de culture

A. Cellules procaryotes

1. *Legionella* spp.

Les souches de *Legionella* utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Souches de *Legionella* spp.

<u>Souches</u>	<u>Sources</u> ⁽¹⁾
<i>Legionella bozemanii</i> ATCC 33217	ATCC
<i>Legionella dumofii</i> ATCC 33279	ATCC
<i>Legionella feeleii</i> ATCC 35072	ATCC
<i>Legionella</i> like bacteria (LLAP10)	LCME
<i>Legionella longbeachae</i> ATCC 33484	ATCC
<i>Legionella micdadei</i> ATCC 33218	ATCC
<i>Legionella oakridgensis</i> ATCC 33761	ATCC
<i>Legionella pneumophila</i> Corby (sg1)	LCME
<i>Legionella pneumophila</i> Lens (sg1)	LCME
<i>Legionella pneumophila</i> Paris (sg1)	LCME
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33155 (sg3)	IFR62 Lyon Est
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33216 (sg5)	IFR62 Lyon Est
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33215 (sg6)	IFR62 Lyon Est

⁽¹⁾ **ATCC**: American Type Culture Collection

Legionella spp. ont été cultivées à 37°C soit en milieu liquide BYE (*Buffered Yeast Extract*) sous agitation à 150 rpm pendant environ 24 heures, ou sur milieu gélosé BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) pendant 96 heures. Les cultures en milieu liquide permettent en 24 heures d'obtenir des *Legionella* en phase exponentielle de croissance.

Le milieu BYE est composé, pour 1 litre, de 5 g d'ACES et 10 g d'extrait de levure. Il est équilibré avec du KOH 10 N à pH 6,9, puis complété, après stérilisation par filtration à 0,22 µm, avec de la L-cystéine filtrée à 0,22 µm (0,4 g/l final) et du pyrophosphate de fer filtré à 0,22 µm (0,25 g/l final).

Le BCYE est préparé, à partir de BYE non filtré, par ajout de charbon actif à 2 g/l et d'agar à 15 g/l. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis complété comme précédemment avec de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer.

2. *Staphylococcus spp.*

Les souches de *Staphylococcus* utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Souches de *Staphylococcus spp.*

<u>Souches</u>	<u>Sources</u> ⁽¹⁾
<i>Staphylococcus aureus</i> 2850	LCME
<i>Staphylococcus caprae</i> 2534D	LCME
<i>Staphylococcus carnosus</i> 4251	LCME
<i>Staphylococcus chromogenes</i> AM1	LCME
<i>Staphylococcus cohnii</i> 898	IMIB
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 567	IMIB
<i>Staphylococcus equorum</i> 4057C	LCME
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 2259	LCME
<i>Staphylococcus hominis</i> 373	IMIB
<i>Staphylococcus lentus</i> 982	IMIB
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> 967	Donvito <i>et al.</i> , 1997a
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 715	IMIB
<i>Staphylococcus simulans</i> 4334	LCME
<i>Staphylococcus warneri</i> 447	LCME
<i>Staphylococcus warneri</i> RK	Hécharde <i>et al.</i> , 2005
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 700404	ATCC

⁽¹⁾ **IMIB** : Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Germany

Staphylococcus spp. ont été cultivés, pendant 18 à 20 heures à 37 °C, soit en milieu liquide BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco) sous agitation (250 rpm) soit sur milieu BHI gélosé. Lors de la préparation des milieux solides, de l'agar a été ajouté avant autoclavage à une concentration de 15 g/l.

3. Autres souches bactériennes

Les autres souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le **tableau 11**.

Tableau 11. Autres souches bactériennes utilisées lors de cette étude

<u>Souches</u>	<u>Sources</u> ⁽¹⁾
Bactéries à Gram positif	LCME
<i>Bacillus megaterium</i> F04	LCME
<i>Bacillus subtilis</i>	LCME
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	LCME
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	LCME
<i>Micrococcus luteus</i>	LCME
<i>Pediococcus acidilactici</i> 583	LCME
Bactéries à Gram négatif	
<i>Enterobacter cloacae</i> D03	LCME
<i>Escherichia coli</i> MG1655	LCME
<i>Hafnia alvei</i>	LCME
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0502083	LCME
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 1128	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 910704	LCME
<i>Salmonella typhimurium</i>	LCME

⁽¹⁾ **DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Toutes ces souches ont été cultivées en milieu liquide BHI ou sur milieu BHI gélosé à 37°C, pendant 18 à 24 heures.

B. Cellules eucaryotes

1. Cellules mononucléées humaines

Les cellules mononucléées humaines (CMN) ont été récupérées à partir de sang frais, prélevé chez deux donneurs sains. Le sang a été tout d'abord dilué au demi avec du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute, Gibco*) complémenté en sérum de veau fœtal à 10 %, puis 30 mL ont été déposés sur 15 mL de Ficoll avant d'être centrifugés à 1200 g pendant 20 minutes à 4°C sans frein.

L'anneau blanchâtre (**Figure 21**) produit par le gradient de Ficoll et correspondant aux cellules mononucléées humaines a été récupéré dans du RPMI 1640 complémenté en sérum de veau fœtal à 10 %. Trois séries de lavages et centrifugations ont permis d'éliminer les autres cellules.

Le culot obtenu peut être conservé pendant une journée maximum à 4°C dans 5 ml de RPMI complété en sérum de veau foetal à 10 %.

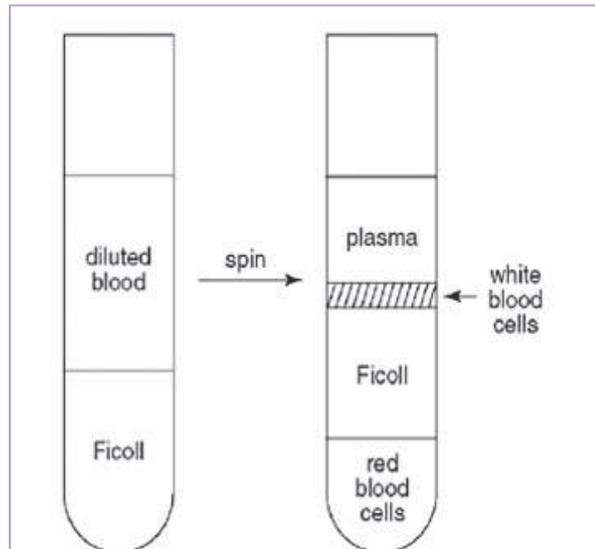


Figure 21. Représentation de la séparation des cellules mononucléées à l'aide d'un gradient de Ficoll

Les CMN (« white blood cells ») sont retrouvées au sein de l'anneau blanchâtre visible au-dessus du Ficoll.

2. Cellules cancéreuses

Des cellules leucémiques des lignées Jurkat, KG1 et K562 ont été utilisées.

Les cellules ont été cultivées (37°C, 5 % de CO₂) en milieu liquide RPMI 1640, complété en sérum de veau foetal à 10 % pour les cellules Jurkat et K562, et à 20 % pour les cellules KG1.

Elles sont repiquées dans du « milieu frais » tous les deux jours environ afin de conserver une densité de l'ordre de 10⁵ cellules/ml.

II. Evaluation de l'activité des souches, surnageants de culture, ou peptides des *Staphylococcus* contre les cellules étudiées

A. Activité antibactérienne

1. Spectre d'activité

Le spectre d'activité des souches de *Staphylococcus* a été réalisé en milieu solide. 100 µL d'une suspension bactérienne à 10⁷ UFC/ml a été étalée sur gélose BCYE ou BHI (selon la souche bactérienne étudiée), puis :

- l'activité des cultures de *Staphylococcus* a été étudiée en déposant 5 µL de celles-ci directement sur la gélose.
- l'activité des surnageants de culture a été testée en déposant 50 µL dans des puits réalisés dans la gélose.

Celle-ci a ensuite été incubée à 37 °C pendant 96 heures pour *Legionella*, ou 24 heures pour les autres bactéries testées.

L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre du halo d'inhibition autour de la zone de dépôt.

Le spectre d'activité a été réalisé en milieu liquide lorsqu'il s'est agi de tester des peptides. Pour cela, des suspensions bactériennes (10^6 UFC/mL) ont été réalisées en milieu liquide BYE ou BHI (selon la souche bactérienne étudiée), puis 95 µL de suspension ont été mis en présence de 5 µL de peptide (concentration finale de 20 µM). Elles ont ensuite été incubées 24 ou 96 heures à 37°C. La sensibilité au peptide testé correspond à une inhibition totale de la croissance bactérienne.

2. Mesure de la concentration minimale inhibitrice

L'étude de l'activité inhibitrice d'une molécule en milieu liquide permet de déterminer sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Une suspension de *L. pneumophila* a été préparée dans du milieu BYE et ajustée à 10^6 UFC/ml. Ensuite, le composé à étudier (peptides ou composés chimiques) a été dilué en série au demi, et 5 µl de chaque dilution ont été ajoutés à 95 µl de suspension bactérienne. Les suspensions ont alors été incubées à 37 °C pendant 96 heures puis la croissance de *Legionella* a été mesurée par lecture de l'absorbance à 595 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (TECAN, Sunrise).

La CMI représente la plus faible concentration en peptide (ou en substance chimique) permettant d'inhiber totalement la croissance bactérienne.

3. Mesure de la concentration minimale de perméabilisation (CMP) et de l'activité bactéricide

Une culture de *L. pneumophila* arrêtée en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}} = 0,4 - 0,8$) a été resuspendu dans du BYE afin d'obtenir une concentration bactérienne de 10^6 UFC/ml. Chaque solution de peptide testé (concentration initiale à 400 µM) a alors été diluée en série au demi et 25 µl de chaque dilution ont été ajoutés à 975 µl de suspension bactérienne. Les échantillons ont ensuite été incubés 45 minutes à 37°C.

La moitié de chaque échantillon (500 µL) a été marquée à l'aide des deux intercalants de l'ADN fluorescents du kit BaCLight™ afin d'être analysée en cytométrie en flux. Le SYTO9, qui fluoresce dans le vert (longueur d'onde d'émission = 500 nm), pénètre dans toutes les cellules, alors que l'iodure de propidium (IP), qui fluoresce dans le rouge (longueur d'onde d'émission = 635 nm) ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est endommagée. Ainsi, les cellules IP+, rouges, sont considérées comme perméabilisées contrairement aux cellules IP-, vertes, intactes. En pratique, 1,5 µL de Syto 9 (3,34 mM) et 1,5 µL d'IP (20 mM) ont été ajoutés aux suspensions bactériennes qui ont alors été incubées à l'obscurité à température ambiante pendant 15 min. Elles ont ensuite été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre FACSCanto™ II (BD Biosciences). Un total de 50 000 événements a été mesuré pour chaque échantillon et l'acquisition a été faite en utilisant le logiciel BD FACSDiVa 6.

La concentration minimale de perméabilisation (CMP) a ainsi pu être déterminée. Elle correspond à la concentration en peptide permettant de perméabiliser 90 % des *Legionella*, 100 % ayant été établi par action de 0,1 % de Triton X-100.

L'autre moitié des suspensions bactériennes a été diluée au 1/10, 1/100 ou 1/1000 selon le peptide testé puis étalée sur gélose BCYE à l'aide d'un ensemenceur automatique en spirale (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific Ltd). Les géloses ont été incubées 96 heures à 37 °C, puis un dénombrement des colonies a été réalisé à l'aide de tables données par le fournisseur. Les résultats sont exprimés en diminution de la cultivabilité (en log) des *Legionella* en présence de 10 µM de peptide (plus forte concentration testée).

4. Microscopie électronique à balayage

Une culture de *L. pneumophila* arrêtée en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}} = 0,4 - 0,8$) a été resuspendu dans du BYE afin d'obtenir une concentration bactérienne de 10^8 UFC/ml. Une solution de WRK a ensuite été ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 0, 0,6 ou 2,5 µM, puis les suspensions ont été incubées à 37°C pendant 45 minutes.

Les échantillons ont ensuite été fixés au glutaraldéhyde 2,5 % pendant 45 minutes, puis lavés au PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Ils ont ensuite été déshydratés par des lavages successifs de 5 minutes dans l'alcool 70 %, puis 10 minutes dans l'alcool 90 % et enfin 15 minutes dans l'alcool 100 %. Les échantillons ont ensuite été concentrés par centrifugation pendant cinq minutes à 2000 tours/minute, puis déposés sur une lamelle ronde. Une étape de séchage a ensuite été réalisée, pendant 12 heures à l'air libre, puis avec du hexaméthylsilazane (HDMS).

L'observation microscopique a alors été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage 840 A de JEOL à 15 KV

B. Activité hémolytique

Le pouvoir hémolytique des *Staphylococcus* a été déterminé en milieu solide. Pour cela, 5 µL de culture ou 50 µL de surnageant de culture ont été déposés sur des géloses au sang de mouton ou de cheval (Oxoid). Les boîtes de pétri ont ensuite été incubées 18-24 heures à 37°C. L'activité hémolytique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone translucide autour du dépôt. Celle-ci correspond à une plage de lyse des érythrocytes.

La détermination de l'activité hémolytique des peptides a, quant à elle, été réalisée en milieu liquide, par mesure de l'absorbance de l'hémoglobine relarguée par les érythrocytes après action des peptides. Du sang humain (500 µl), prélevé à un donneur sain, a été centrifugé (2000 g, 3 minutes, 4°C). Le surnageant a été éliminé et les érythrocytes resuspendus délicatement dans 800 µl de tampon PBS. La suspension a été centrifugée de nouveau (2000 g, 3 minutes, 4°C) et le surnageant éliminé. L'étape précédente a été répétée entre 3 et 5 fois, jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les 200 µl de culot érythrocytaire ont alors été resuspendus dans 2 ml de tampon PBS pour constituer la solution mère à 10 % (v/v). 20 µL de cette solution ont ensuite été mélangés à 930 µl de PBS et 50 µl de solution peptidique ou de Triton X-100. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes puis centrifugés (2000 g, 3 minutes, 4°C) afin de collecter le surnageant dont l'absorbance a été mesurée à 576 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo Spectronic Biomate 3 (Avantec). Le taux d'hémolyse induit par le témoin positif (0,1% de Triton X-100) équivaut à 100 % d'hémolyse.

C. Activité contre les CMN et les cellules cancéreuses

1. Cytométrie en flux

Pour chaque type cellulaire, une suspension de 10^6 cellules/mL a été préparée dans du tampon PBS. Puis une solution de peptide (400 µM) a été diluée en série au demi et 25 µl de chaque dilution ont été ajoutés à 975 µl de suspension cellulaire. Les échantillons ont ensuite été incubés 45 minutes à 37°C, puis 700 µL de chaque suspension ont été marqués avec 5 µL d'iodure de propidium. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux, comme décrit dans le **paragraphe II.A.3**.

Les cellules IP+ sont considérées comme perméabilisées.

2. Comptage au bleu de Trypan

Le bleu de trypan est un marqueur de mortalité pour les cellules eucaryotes. Il pénètre dans toutes les cellules qui peuvent néanmoins l'éjecter dans le milieu extérieur par un mécanisme nécessitant de l'énergie. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, alors qu'une cellule morte ne pourra pas et restera bleue.

En pratique, les 300 μ l de suspension cellulaire non utilisés en cytométrie en flux ont été centrifugés pendant 5 minutes à 400 g à 20°C. Les culots ont ensuite été repris dans 30 μ l de PBS, puis mélangés avec 30 μ L de bleu de trypan 0,2 %. Les cellules ont alors été comptées au microscope optique (objectif x40) après dépôt sur lame de Kova.

III. Techniques séparatives et analytiques

A. Etude des peptides

1. Peptides synthétiques

Les peptides synthétiques utilisés dans cette étude ont été commandés auprès de Genscript (Piscataway, USA), excepté la PSM α , la rPSM, la rWRK et la WRK_K9G-G20D qui ont été synthétisées par le Dr. T. Jouenne (CNRS UMR 6270, Rouen, France).

2. Préparation du surnageant de culture des *Staphylococcus*

Du milieu BHI a été inoculé au 1/1000^e avec une préculture de 24 heures de *Staphylococcus*, puis incubé à 37°C sous agitation (250 rpm). Au bout de 18 heures, la culture a été centrifugée (9000 g, 20 minutes, 4°C) et le surnageant de culture a été chauffé à 70°C pendant 15 minutes, afin d'inactiver les protéases et de tuer d'éventuelles cellules restantes, puis centrifugé à nouveau 15 minutes à 9000 g afin d'éliminer les débris. La solution obtenue constitue le surnageant de culture, contenant les substances actives.

3. Chromatographie d'interaction hydrophobe

Le surnageant de culture des *Staphylococcus* a été chargé sur une colonne d'interaction hydrophobe (POROS 20 HP2, PerSeptive Biosystems, 4,6 x 80 mm) à l'aide d'une pompe (UltiMate 3000, Dionex) à un débit de 5 mL/min. Puis 50 mL d'eau ultra pure ont été passés sur la colonne à un débit de 5 mL/min afin d'éliminer les molécules non adsorbées. L'élution des peptides adsorbés a ensuite été réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC (P680 HPLC Pump, Dionex) et d'un détecteur (UltiMate 3000 Variable Wavelength Detector, Dionex). La détection a été

réalisée à 220 et 280 nm. L'élution a été effectuée à un débit de 2 mL/min selon un gradient eau / acétonitrile / acide trifluoroacétique (TFA) 0,05 % (v/v). Le gradient a débuté à 10 % d'acétonitrile (ACN) pendant 5 minutes puis augmenté linéairement jusqu'à 100 % en 20 minutes, pour se terminer par un plateau de 5 minutes à 100 % d'ACN.

L'acétonitrile des fractions actives (éluées entre 6 et 12 minutes) a ensuite été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI Rotavapor R-124) avant lyophilisation.

4. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse

Les fractions actives lyophilisées ont été solubilisées dans 1 mL d'eau, puis injectées en sur une colonne analytique en phase inverse C8 Kromasil (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, A.I.T.). L'élution a été réalisée à un débit de 0,8 mL/min selon un gradient eau / acétonitrile / TFA 0,05 % (v/v) débutant à 50 % ou 70 % (selon la souche de *Staphylococcus*) d'ACN pendant 5 minutes, puis augmentant de façon linéaire pendant 30 minutes, pour atteindre un plateau à 100 % qui est maintenu pendant 10 minutes.

5. Spectrométrie de masse ESI-MS

Les peptides purifiés par HPLC en phase inverse ont été analysés par spectrométrie de masse en électrospray (ESI-MS), sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165. Chaque échantillon a été resuspendu dans un mélange eau / ACN / acide formique (50:50:0,1 (v/v)) avant d'être analysé. Les données ont été traitées avec le logiciel LC2-Tune et les masses calculées avec le logiciel Biomultiview 1.2 (Software package Sciex).

6. Dosage protéique

La concentration peptidique a été déterminée par dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma-aldrich) avec de l'albumine de sérum bovin à 1 mg/ml comme standard. Le principe de ce dosage repose sur le pouvoir des protéines à réduire le Cu^{2+} en Cu^+ . Le BCA est un réactif chromogène hautement spécifique de Cu^+ .

25 µl de solution peptidique, diluée ou non, ont été mis en présence de 200 µl de réactif contenant de l'acide bicinchoninique et du sulfate de cuivre à un ratio 50:1 (v/v). Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes puis l'absorbance a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque OPSYS MR (ThermoLabsystems).

B. Etude des lipides

1. Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides a été réalisée selon la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957) c'est-à-dire par une extraction méthanol/chloroforme 2:1 (v/v). Une suspension contenant de 10^9 à 10^{10} bactéries a été centrifugée (10000 g, 20°C, 10 minutes) puis le culot bactérien a été repris dans 1 ml d'eau stérile et transféré dans un microtube de 2 ml contenant 500 mg de billes de verre (150-200 μ m). La suspension a alors été vortexée pendant 1 minute afin de bien lyser les cellules. Après décantation (quelques secondes), le surnageant a été transféré dans un tube à centrifugation. L'opération a été répétée deux fois. Après ajout de 6 ml de méthanol et agitation au vortex pendant 15 secondes, le mélange a été incubé à 65°C pendant 20 minutes. L'échantillon a ensuite été refroidi à température ambiante, puis 3 ml de chloroforme ont été ajoutés. Le tube a été vortexé 15 secondes et agité à température ambiante sur un agitateur rotatif (30 rpm) pendant une nuit. Le mélange a ensuite été transféré dans un nouveau tube et centrifugé (10000 g, 20°C, 12 minutes) afin d'éliminer les débris cellulaires. Après transfert du surnageant dans un nouveau tube de centrifugation, 2 ml de chloroforme puis 4 ml d'eau ultra pure ont été ajoutés. L'ensemble a été vortexé 15 secondes et centrifugé (3000 g, 20°C, 8 minutes). La phase inférieure a été délicatement récupérée à l'aide d'une pipette pasteur et transférée dans un tube en verre. Le chloroforme a alors été éliminé par évaporation à 50°C sous flux d'azote.

2. Dosage des phospholipides

Le dosage colorimétrique des phospholipides est basé sur la formation d'un complexe entre les différents phospholipides et le ferrothiocyanate d'ammonium. Dans un premier temps, le réactif a été préparé en dissolvant 2,7 g de FeCl_3 avec 3 g de NH_4SCN (thiocyanate d'ammonium) dans 100 ml d'eau ultra pure. La gamme étalon a été réalisée avec quatre standards (L- α -Phosphatidylcholine, L- α -Phosphatidyléthanolamine, L- α -Phosphatidyl-DL-glycérol et cardiolipide) (Sigma-aldrich). Tous les échantillons ont été évaporés sous flux d'azote puis repris dans 2 ml de chloroforme. Ensuite, 1 ml de ferrothiocyanate d'ammonium a été ajouté à chaque tube puis toutes les solutions ont été vortexées 1 minute avant d'être centrifugées (1000 g, 1 minute, 20°C). La phase inférieure contenant les phospholipides a été récupérée et l'absorbance a été mesurée à 488 nm (**Figure 22**).

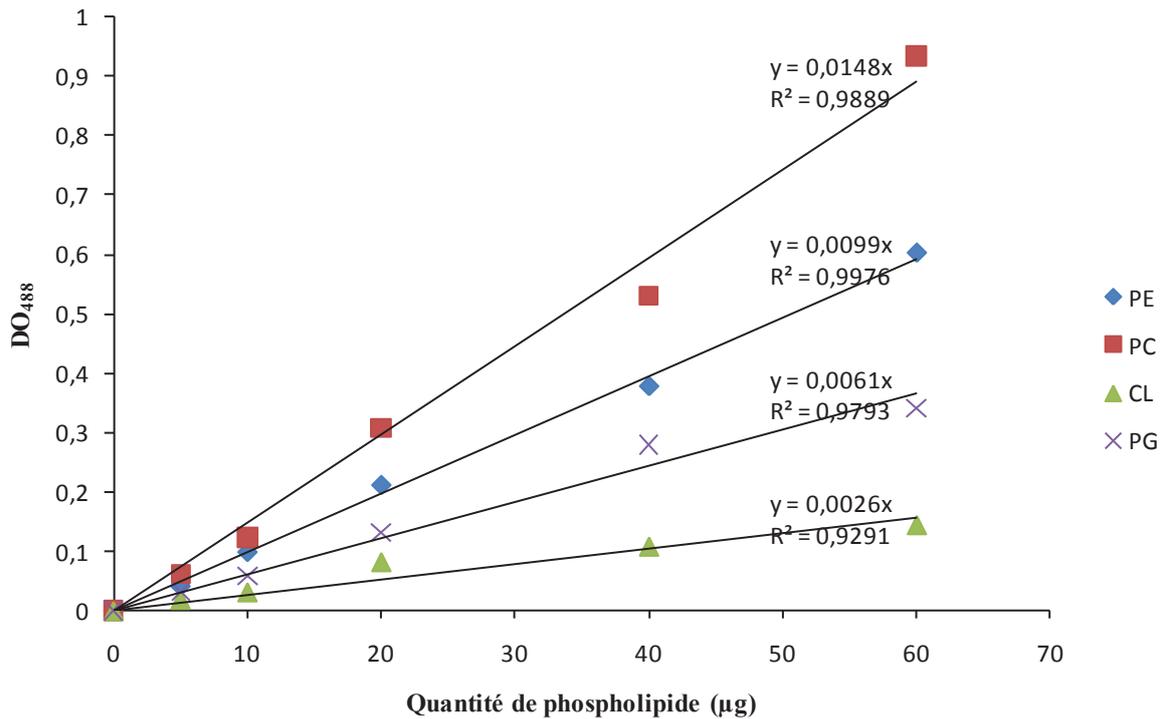


Figure 22. Courbes étalons des standards de phospholipides.

PE (◆) PC (■) CL (▲) PG (×).

Cependant, selon leur nature, les phospholipides répondent plus ou moins bien au dosage. En effet, la PE et la PC possèdent une forte relation de proportionnalité entre absorbance à 488 nm et quantité de phospholipides. Par contre, le PG et surtout le CL répondent moins bien au dosage. Ainsi, les quantités de lipides totaux déterminées par cette méthode ne seront qu'une estimation de la quantité réelle de phospholipides.

3. Préparation des « multi-lamellar vesicles » (MLVs)

Les « multi-lamellar vesicles » (MLVs) ont été préparés avec différentes compositions de phospholipides, et de façon à piéger la calcéine à l'intérieur.

Un film lipidique a tout d'abord été réalisé sur la paroi d'un tube en verre, en évaporant sous flux d'azote une quantité désirée de phospholipides (10 mg). Ce film a ensuite été hydraté avec 100 μ L de tampon MOPS (20 mM, pH 7,5) contenant de l'EDTA (0,01 mM), du NaN_3 (0,02 %) et de la calcéine (50 mM) comme décrit par Pokorny *et al.* (Pokorny & Almeida, 2005). La suspension (100 mM) a ensuite été soumise à cinq cycles chaud-froid. Un cycle chaud-froid consiste à immerger l'échantillon 30 secondes dans l'azote liquide, puis 10 minutes dans un bain-marie à 45 °C. L'échantillon doit être vortexé entre chaque cycle. Après les cinq cycles, la calcéine

contenue dans les vésicules lipidiques formées a été séparée de la calcéine libre par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Sephadex-G25 (GE Healthcare), selon le protocole fourni par GE Healthcare. L'élution a été réalisée avec le même tampon que précédemment complété avec du KCl 100 mM (Pokorny & Almeida, 2005). Les fractions éluées contenant les vésicules chargées avec de la calcéine ont été regroupées et diluées afin d'obtenir une solution lipidique d'environ 25 μ M. Pour cela, les densités optiques ont été mesurées, pour chaque fraction éluee, à 600 nm et 450 nm. La mesure à 600 nm permet de déterminer les fractions contenant les vésicules lipidiques, et la mesure à 450 nm, les fractions contenant la calcéine. Ainsi, par comparaison des deux mesures, il est possible de récolter les vésicules chargées avec de la calcéine, puis d'en déduire la concentration en lipides. En effet, connaissant la concentration lipidique déposée sur la colonne (correspondant à 100 % d'absorption à 600 nm), il est possible d'estimer la quantité de lipide présent dans les fractions récupérées en calculant le pourcentage relatif d'absorption qu'elles représentent.

4. Mesure de la libération de calcéine

La libération de calcéine des vésicules de type MLVs a été mesurée avec un fluorimètre (FluoroCount™, Perkin Elmer), couplé à une source de lumière halogène (Pakard). La longueur d'onde d'excitation était de 510 nm, et celle d'émission de 460 nm.

En pratique, différentes concentrations des peptides ont été ajoutées à 100 μ L de MLV (25 μ M), et l'intensité de fluorescence a été mesurée toutes les 20 secondes pendant 30 minutes. 100 % de libération de calcéine a été obtenu avec l'addition de 2 % (v/v) de triton X100.

Les résultats ont été exprimés soit en pourcentage de libération de calcéine en fonction du temps, soit en concentration de lyse des MLVs (CLM) correspondant à la concentration en peptide permettant la libération de 90 % de la calcéine après 30 minutes d'incubation.

IV. Techniques de biophysique

A. RMN du solide

Les échantillons observés en RMN du solide sont des vésicules de type MLVs.

Deux compositions lipidiques ont été testées :

- Les « **membranes modèles** » sont composées de 15 % de PC C16:0-C16:0 d31, 15 % de PC di-C16:1, 20 % de PE di-C16:0, 20 % de PE di-C16:1, 15 % de CL tétra-C14:0 et 15 % de CL tétra-C18:1.

- Les « **membranes naturelles** » sont composées des lipides directement extraits de la membrane de *L. pneumophila* auxquels ont été ajoutés 10 % de PC deutériée (PC C16:0-C16:0 d31).

Les lipides (11 mg au total) ont tout d'abord été co-solubilisés dans du chloroforme avec la WRK au ratios moléculaires peptide/lipide (R_i) voulus ($R_i = \infty$, $R_i = 500$, $R_i = 100$ et $R_i = 10$). Le chloroforme a ensuite été évaporé sous flux d'azote, puis par lyophilisation afin d'obtenir un film lipidique. Le film lipidique a ensuite été hydraté par ajout de 100 μ L d'eau dédeutérée aux 11 mg de lipides. L'échantillon a ensuite été soumis à trois cycles chaud-froid.

Un même échantillon étant étudié en RMN du phosphore et en RMN du deutérium, il a été lyophilisé à nouveau puis hydraté entre chaque type de RMN afin d'avoir le même « historique ».

Les expériences de RMN du ^{31}P ont été réalisées avec un spectromètre Bruker (Standard Bore, Hybride liquide/solide, Electronique Avance III Sonde solide MAS Dual 1H/X Broad Band, DVT, rotor 4mm). Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre 500 MHz (soit une fréquence de 202,47 MHz pour le Phosphore-31) à l'aide de la séquence d'Echo de Hahn (Rance & Byrd, 1983) en découplant les protons. La longueur de l'impulsion de 90° est de 4 μ s (pour une puissance de 6 dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 5 s. 5120 acquisitions ont été additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 100 Hz) a été appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures ont été réalisées de 20°C à 50°C , avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- $0,5^\circ\text{C}$). Les déplacements chimiques ont été référencés par rapport à H_3PO_4 (0 ppm).

Les expériences de RMN du deutérium sur un spectromètre Bruker (Wide Bore, Hybride Liquide/solide, Electronique Avance 500 Sonde CP MAS, 1H/X/Y, rotor 4mm). Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre 800 MHz (soit une fréquence de 122,8 MHz pour le deutérium) à l'aide de la séquence d'Echo solide (Davis *et al.*, 1976). La longueur de l'impulsion de 90° est de 4,5 μ s (pour une puissance de 0dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 2 s. 5120 acquisitions ont été additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 150 Hz) a été appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures ont été réalisées de 20°C à 50°C avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- $0,5^\circ\text{C}$). Le milieu du spectre est arbitrairement placé à 0 kHz.

L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel TopSpin 2.1.

B. Dichroïsme circulaire

Les peptides testés (100 μ M) ont été solubilisés dans du trifluoroéthanol (TFE) 20 % qui est un solvant organique mimant l'environnement hydrophobe des membranes.

Les analyses en dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un spectromètre Jasco J-810 (Easton, MD, USA). Les spectres ont été enregistrés entre 180 et 270 nm, avec un défilement de 0,5 nm/s et un incrément de 0,5 nm. Des cuves en quartz, de trajet optique égal à 1 mm ont été utilisées, et le signal du blanc (eau) a été automatiquement soustrait.

Les spectres ont ensuite été traités à l'aide du logiciel Spectra Manager, puis analysés avec le logiciel CDFriend (Sébastien Buchoux, IECB, 2005).

RESULTATS & DISCUSSION

I. Identification de peptides anti-*Legionella* produits par *Staphylococcus*

En 2005 au laboratoire la souche *Staphylococcus warneri* RK a été identifiée comme étant active contre *Legionella pneumophila*. Les molécules responsables de cette activité sont trois peptides présentant également une activité hémolytique :

- la warnéricine RK (WRK) qui est un peptide de 22 acides aminés ayant fait l'objet d'un dépôt de brevet sous la référence WO/2007/077316 (Hechard & Berjeaud, 2006) et de plusieurs articles (Hechard *et al.*, 2005; Verdon *et al.*, 2008; Verdon *et al.*, 2009a; Verdon *et al.*, 2011).
- les δ -lysines I et II qui sont deux peptides similaires à 80 % à la δ -lysine de *S. aureus*, qui a été très étudiée, est connue pour être hémolytique mais pas antibactérienne.

D'autres peptides produits par les *Staphylococcus* étant décrits comme hémolytiques, la première partie de mon travail a consisté à cribler une collection de *Staphylococcus* pour identifier les espèces actives contre *Legionella*, puis purifier et caractériser les peptides responsables de cette activité. Les résultats de cette étude font l'objet de la publication 1.

A. Publication 1: Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides

Quinze souches, virulentes ou non, représentatives des différentes espèces de *Staphylococcus* ont été testées pour leur activité anti-*Legionella*. Les surnageants de culture de neuf d'entre elles présentaient une activité.

Pour identifier les molécules actives, une méthode de purification en deux étapes, inspirée de celle décrite par Otto et Gotz en 2000 (Otto & Gotz, 2000) pour la δ -lysine de *S. epidermidis*, a été mise en place. Tout d'abord, les surnageants de culture des différents *Staphylococcus* ont été soumis à une chromatographie d'interaction hydrophobe. Puis les fractions actives ont été séparées sur une colonne HPLC en phase inverse. Les différentes fractions actives ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et caractérisées par comparaison des masses molaires mesurées avec celles des peptides de *Staphylococcus* déjà décrits. Onze peptides sur les douze actifs ont ainsi pu être identifiés. Cette nouvelle méthode de purification est bien plus rapide et tout aussi efficace que celle déjà décrite pour la purification de la WRK (Verdon *et al.*, 2008) mais, contrairement à la précédente, elle ne permet d'obtenir que les formes formylées des peptides. Aussi, nous avons décidé de faire synthétiser les formes

non formylées de la WRK et de la PSM α afin d'étudier l'influence de la formylation sur les activités des peptides. De plus, comme la souche de *S. cohnii* à notre disposition ne produisait pas suffisamment de peptides pour pouvoir les purifier, le peptide H2U, dont la séquence est assez proche de celle de la WRK, a également été synthétisé.

Les activités anti-*Legionella* et hémolytiques de tous ces peptides ont été déterminées. L'activité anti-*Legionella* a été déterminée selon trois critères que sont (i) la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus faible concentration en peptide permettant d'inhiber totalement la croissance de la bactérie (ii) la concentration minimale de perméabilisation (CMP), correspondant à la concentration en peptide qui permet de perméabiliser 90 % des *Legionella*, et enfin (iii) la diminution de la viabilité bactérienne en présence de peptide.

L'analyse des résultats de CMI a permis de séparer les peptides en deux groupes. Les peptides du groupe 1, représentés par la WRK, semblent agir selon un mécanisme « tout ou rien », avec aucune inhibition de *Legionella* en-dessous de la CMI, et 100 % d'inhibition au-delà. Au contraire, les peptides du groupe 2, représentés par la PSM α de *S. epidermidis*, inhibent *Legionella* de façon progressive en fonction de leur concentration.

Au niveau des autres activités testées, il apparaît que le groupe 1 correspond aux peptides bactéricides (abattement > 0,9 log), perméabilisants (CMP < 3 μ M) et très hémolytiques (concentration en peptide permettant 10 % d'hémolyse < 3 μ M) alors que le groupe 2 correspond à des peptides bactériostatiques (abattement < 0,9 log), faiblement perméabilisants (CMP > 3 μ M) et peu hémolytiques (concentration en peptide permettant 10 % d'hémolyse > 3 μ M).

Les peptides du groupe 1 pourraient agir selon un mécanisme « detergent-like » à forte concentration, comme cela a été précédemment suggéré pour la WRK, mais par formation de pores à faible concentration. Quant aux peptides du groupe 2, ils agiraient par formation de pores, quelle que soit la concentration peptidique.

D'autre part, la formylation N-terminale des peptides permet d'augmenter leur activité anti-*Legionella*.

PUBLICATION 1

*Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides*

Peptides

2011



Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides

A. Marchand, J. Verdon, C. Lacombe, S. Crapart, Y. Héchard, J.M. Berjeaud*

Université de Poitiers, Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau – UMR 6008 CNRS, IBMIG – UFR Sciences Fondamentales et Appliquées,
1 rue du Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2010
Received in revised form 19 January 2011
Accepted 19 January 2011
Available online 1 February 2011

Keywords:

Legionella pneumophila
Staphylococci
Hemolytic peptides

ABSTRACT

A collection of various *Staphylococci* was screened for their anti-*Legionella* activity. Nine of the tested strains were found to secrete anti-*Legionella* compounds. The culture supernatants of the strains, described in the literature to produce hemolytic peptides, were successfully submitted to a two step purification process. All the purified compounds, except one, corresponded to previously described hemolytic peptides and were not known for their anti-*Legionella* activity. By comparison of the minimal inhibitory concentrations, minimal permeabilization concentrations, decrease in the number of cultivable bacteria, hemolytic activity and selectivity, the purified peptides could be separated in two groups. First group, with warnericin RK as a leader, corresponds to the more hemolytic and bactericidal peptides. The peptides of the second group, represented by the PSM α from *Staphylococcus epidermidis*, appeared bacteriostatic and poorly hemolytic.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Legionella pneumophila is a waterborne pathogenic bacterium responsible for severe pneumonia called Legionnaire's disease [6,17]. In the environment, *L. pneumophila* is ubiquitously found in fresh water and could survive within biofilms and free-living amoeba [2]. *L. pneumophila* could be found at high level in man-made water systems such as air conditioning and cooling towers, spas. These systems are mainly responsible for outbreaks as they might produce contaminated water droplets, which are inhaled by people. *L. pneumophila* reaches the lungs and multiplies within macrophages [15]. In 2006, there were more than 6000 reported cases in Europe leading to 400 deaths ca. Concerning *L. pneumophila* growth in water systems, various methods of control have been used: chlorine, monochloramine, heat. However, these treatments are not fully efficient and, after a lag period following the treatment, *L. pneumophila* might be able to recolonize the system [19]. Therefore, it is of primary importance to find new treatments to restrain *L. pneumophila* growth.

Recently, it was shown that hemolytic peptides secreted by *Staphylococcus warneri* RK inhibited the growth of *Legionella* spp. [8]. Beside an original 22 amino acids long peptide named warnericin RK, two delta-hemolysins were characterized [20].

Hemolysins are among the most important virulence factors of *Staphylococci*. *Staphylococcus aureus*, which is a potentially pathogenic coagulase-positive specie of this genus, produces four

hemolysins – α , β , γ and δ [26]. δ -Hemolysin, also named δ -toxin or δ -lysin, is a well known peptide, which mechanism of action has been described [4,22]. δ -Hemolysins were found in most species of coagulase-negative *Staphylococci* and some sequences (Table 1) were characterized for *S. intermedius* [9], *S. epidermidis* [12], *S. simulans* and *S. warneri* [18].

Numerous hemolytic peptides (Table 1) with various other activities were found to be secreted by different *Staphylococci*. Thus *S. epidermidis* was described to produce a complex of peptides, named phenol-soluble modulin (PSM) [13], combining proinflammatory activity and a role in the detachment of biofilm [23,27]. The PSM complex is composed of three peptides of 22, 44 and 25 amino acids named PSM α , PSM β and PSM γ , respectively. PSM γ corresponds to the *S. epidermidis* δ -hemolysin [13]. Genes encoding PSM related peptides are present in all sequenced *S. aureus* strains. The production of the peptides, PSM α , PSM β and δ -toxin, was shown to be higher in the community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) strains, than in the hospital associated strains (HA-MRSA), and contributes significantly to their virulence [24]. *S. haemolyticus* secretes three hemolytic peptides, which inhibit the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. They were named gonococcal growth inhibitor (GGI) I, II and III and consist of 44 amino acids linear peptides with high sequence homologies (65–75%) [7,25]. The SLUSH A, B and C peptides, each composed of 43 amino acids with closely related sequences (>76%), are secreted by *S. lugdunensis*. Their sequences are clearly distinct from known δ -hemolysins but are similar to the *S. haemolyticus* GGIs [5]. From the three hemolytic peptides secreted from *S. cohnii*, H1 and H3 are composed of 43 amino acids and resemble to SLUSH peptides, whereas the shorter H2, containing only 18 amino acids,

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 45 40 06; fax: +33 5 49 45 35 03.
E-mail address: jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr (J.M. Berjeaud).

Table 1
Amino acid sequences of the hemolytic peptides produced by *Staphylococci* described in the literature.

Peptide name (producer species)	Sequence	Reference
Warnericin RK (<i>S. warneri</i>)	MQFITDLIKKAVDFKGLFNGK	Verdon et al. [20]
Hemolysin-H2 (<i>S. cohnii</i>)	MDFIIDIKKIVGLFTGK	Mak et al. [11]
PSM- α 1 (<i>S. aureus</i>)	MGI IAGI I K V I K S L I E Q F T G K	Wang et al. [24]
PSM- α 2 (<i>S. aureus</i>)	MGI IAGI I K F I K G L I E K F T G K	
PSM- α 3 (<i>S. aureus</i>)	MEFVAKLFPKFKDLLGKFLGNN	
PSM- α 4 (<i>S. aureus</i>)	MAIVGPTI I K I I K A I I D I F A K	
PSM- α (<i>S. epidermidis</i>)	MADVIAKIVEIVKGLIDQPTQK	Mehlin et al. [13]
PSM- δ (<i>S. epidermidis</i>)	MSIVSTIIEVVKTIIVDIVKFKK	
δ -Hemolysin-I (<i>S. warneri</i>)	MAADIISTIGDLVKLIINTVKKFQK	Tegmark et al. [18]
δ -Hemolysin-II (<i>S. warneri</i>)	MTADIISTIGDFVKWILDTVKKFTK	
δ -Hemolysin-I (<i>S. aureus</i>)	MAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFQK	Wiseman [26]
δ -Hemolysin (<i>S. epidermidis</i>)	MMAADIISTIGDLVKWIIDTVNKFQK	McKevitt et al. [12]
δ -Hemolysin (<i>S. intermedius</i>)	MAGDIISTIVDFIKLIAETVKKFTK	Ji et al. [9]
δ -Hemolysin (<i>S. simulans</i>)	MAGDIVGTIGEFVKLI IETVQKFTQK	Tegmark et al. [18]
PSM- β (<i>S. epidermidis</i>)	MSKLAEAIANTVKAQDQDWTGLTSTIVDIVESGVSVLGIKIFGF	Mehlin et al. [13]
GGI I (<i>S. haemolyticus</i>)	MQKLAEEIAAAVSAGQDKDWGKMGTSIVGIVENGITVGLKIFGF	Watson et al. [25]
GGI II (<i>S. haemolyticus</i>)	MEKIANAVKSAIEAGQNDWTGLTSTIVDIVSNGVTLSKIFGF	
GGI III (<i>S. haemolyticus</i>)	MSKLVQAI SDAVQAQQNDWAKLGTSTIVGIVENGIVGLKIFGF	
SLUSH-A (<i>S. lugdunensis</i>)	MSGIVDAITKAVQAGLDKDWATMATSIAADAKGVDFIAGFFN	Donvito et al. [5]
SLUSH-B (<i>S. lugdunensis</i>)	MSGIIEAITKAVQAGLDKDWATMATSIAEALAKGIDAI SGLFG	
SLUSH-C (<i>S. lugdunensis</i>)	MDGI FPAISKAVQAGLDKDWATMATSIAEALAKGVDFI IGLFP	
Hemolysin-H1 (<i>S. cohnii</i>)	MSGIVEAISNAVKSLDHDVNMGTSTIADVAKGADF IAGFFS	Mak et al. [11]
Hemolysin-H3 (<i>S. cohnii</i>)	MSDFVNAISEAVKAGLSADVWTMGTSTIADALAKGADF IGLGFFN	

appears unique [11]. These peptides, whose sequences are presented in Table 1, could be separated in two groups according to their size, from 18 to 26 amino acids for the small peptides, and from 43 to 44 for the long peptides. Nevertheless, like warnericin RK and *S. warneri* δ -hemolysins, all these peptides are hydrophobic, induce lysis of erythrocytes but are generally described to be non-active against bacteria, except for GGI peptides active against gonococci.

Because warnericin RK presents a high hemolytic activity, which is a major drawback for its therapeutic potency, we decided to test if other *Staphylococci* could produce anti-*Legionella* peptides with the final objective to detect a peptide with no or a low hemolytic activity.

In this paper we report the selection of *Staphylococci* producing peptides inhibiting the growth of *Legionella*. The antibacterial peptides were purified and identified and their activities towards *Legionella* as well as erythrocytes were measured. Based on the comparison of the activities of the purified peptides, as well as warnericin RK and δ -hemolysin of *S. warneri*, two classes of anti-*Legionella* peptides were proposed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, culture media and growth conditions

The *Staphylococcus* strains were grown in Brain Heart Infusion (BHI, Difco) liquid medium at 37 °C for 18–20 h under shaking (250 rpm).

L. pneumophila Lens was grown at 37 °C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates for 96 h or in buffered yeast extract (BYE) liquid medium for 24–30 h under shaking (150 rpm).

2.2. Purification of anti-*Legionella* peptides

In order to characterize anti-*Legionella* peptides, a two-step purification procedure was conducted as described below.

Cells were removed, from an overnight staphylococcal culture, by centrifugation (9000 \times g, 15 min, 4 °C) and the supernatant was heated at 70 °C for 15 min. The resulting sample was named crude extract (CE).

Chromatographic steps were conducted on a Dionex 3600 HPLC instrument composed of a Dionex P680 HPLC binary pump, an iso-

cratic Dionex UltiMate 3000 pump used as a loading pump and a Dionex UltiMate 3000 UV detector.

Firstly, the CE was loaded onto a hydrophobic interaction column (POROS 20 HP2, PerSeptive Biosystems, 4.6 mm \times 80 mm). Elution was monitored at 220 nm and 280 nm and carried out, at a flow rate of 2 mL/min, using a water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 0.05% (v/v) gradient. After washing for 5 min with 10% acetonitrile, elution was achieved in 25 min with a 20 min linear gradient from 10 to 100% acetonitrile, followed by a 5 min wash with 100% acetonitrile. The collected active fraction was lyophilized.

Secondly, the lyophilized fraction was dissolved in 900 μ L of 50% aqueous acetonitrile and injected onto a Kromasil C8 reverse-phase HPLC analytical column (5 μ M, 100 Å, 4.6 mm \times 250 mm). Separation was carried out using a water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 0.05% (v/v) solvent system. After an initial 5 min wash with 50% or 70% (according to the staphylococcal strain) acetonitrile, elution was achieved in 40 min at a flow rate of 0.8 mL/min with a 30 min linear gradient from 50 or 70 to 100% acetonitrile, followed by a 10 min wash with 100% acetonitrile. Each collected fraction was lyophilized and stored at –20 °C for further studies.

Synthetic non-formylated peptides, warnericin RK, and H2U, were purchased from Genscript (Piscataway, USA). PSM α was provided by Dr. T. Jouenne from the PBS laboratory (CNRS UMR6270, Rouen, France).

2.3. Mass spectrometry

For molecular weight determination, the HPLC fractions were analyzed by mass spectrometry, on a Perkin Elmer Sciex API 165 mass spectrometer equipped with an ion-spray source. Each sample was resuspended in 50% acetonitrile/0.1% formic acid and was analyzed by infusion at a flow rate of 5 μ L/min. The instrument scale for the mass-to-charge (m/z) ratio was calibrated with the ions of the ammonium adduct of polypropylene glycol. Scan data were obtained with LC2-Tune and mass calculation was done with Biomultiview 1.2 (Software package Sciex).

2.4. Peptide titration

Peptide concentration was determined by the bicinchoninic acid assay as described by the supplier (Sigma) with bovine serum albumin as a standard. 25 μ L of each sample were mixed with 200 μ L of

a solution of bicinchoninic acid and copper sulfate 50:1 (v/v). The preparation was incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance at 595 nm was measured by a microtiter plate reader OPSYS MR (Thermo Labsystems).

2.5. Anti-*Legionella* activity assays

2.5.1. Spot on lawn assays

Anti-*Legionella* activity was determined using spot on lawn assays as described below. A 10⁷ colony forming units (CFU)/mL suspension of *L. pneumophila* was spread onto a BCYE agar plate. Samples to be tested (5 µL of staphylococcal culture or 50 µL of staphylococcal CE) were spotted onto the surface of the agar plate. The plate was then incubated at 37 °C for 96 h. Anti-*Legionella* activity was revealed by a zone of inhibition around the test samples. Quantitative analysis was carried out by measuring diameters of the zone of inhibition.

2.5.2. Minimal inhibitory concentration

Minimal inhibitory concentration (MIC) of the different peptides was determined using microtiter plate assays as described previously [20]. MIC represents the lowest concentration of peptide which totally inhibits the growth of *L. pneumophila*.

2.5.3. Membrane permeabilization assays and cultivability evaluation

Exponentially growing *L. pneumophila* (OD₆₀₀ = 0.4–0.8) were washed and resuspended in BYE at a concentration of 10⁶ CFU/mL. The bacterial suspension was treated with various concentrations, ranging from 0 to 10 µM, of peptides during 45 min at 37 °C. The generation time, in these conditions, was evaluated and corresponded to 2.5 h (data not shown)

- (i) One half of the cell suspensions were then analyzed using a flow cytometric approach after bacterial staining with a couple of fluorochromes (SYTO9 and propidium iodide (PI)), as described previously [21]. Flow cytometric measurements were performed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) with a 488 nm argon excitation laser. A total of 50,000 events were analyzed in each sample, using BD FACSDiVa 6 software (BD Biosciences) for data acquisition and analysis. Optical filters were set up such that PI fluorescence was measured at 670 LP nm and SYTO 9 fluorescence was measured at 530/30 BP nm. A SYTO 9+/PI-gate was drawn to determine the percentage of non permeabilized cells in the control without peptide. The minimal permeabilization concentration (MPC) of peptides corresponds to the concentration leading to 90% of permeabilization of *L. pneumophila*.
- (ii) The other half of the bacteria suspensions were diluted to 1/10, 1/100 or 1/1000 depending on the peptide and then spread on a BCYE agar plate using an automatic spiral plater (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific Ltd). Plates were incubated 96 h at 37 °C before colonies numeration using tables provided by the supplier. The results were expressed by the decrease in the *L. pneumophila* cultivability estimated at the maximum peptide concentration.

2.6. Hemolytic activity assays

Hemolytic activity of the peptides was determined by measuring the released hemoglobin from human erythrocytes as described previously [20].

100% hemolysis was given by adding 0.1% Triton X 100 to the reaction mixture instead of peptide solutions.

Table 2

Anti-*Legionella* activity of 15 staphylococcal strains and culture supernatants.

Staphylococcal strain	Anti- <i>Legionella</i> activity ^a		Source/reference ^b
	Culture	Crude extract	
<i>S. warneri</i> RK	+	++	Hechard et al. [8]
<i>S. aureus</i> 2850	++	+++	Laboratory collection
<i>S. lugdunensis</i> 967	+	+++	Donvito et al. [5]
<i>S. saprophyticus</i> 715	+++	+	IMI collection
<i>S. hominis</i> 373	+++	++	IMI collection
<i>S. epidermidis</i> 567	+	+++	IMI collection
<i>S. xylophilus</i> 700404	++	+	ATCC
<i>S. cohnii</i> 898	+++	+	IMI collection
<i>S. haemolyticus</i> 2259	+++	++	Laboratory collection
<i>S. lentus</i> 982	++	–	IMI collection
<i>S. equorum</i> 4057C	+	–	Laboratory collection
<i>S. simulans</i> 4334	+	–	Laboratory collection
<i>S. chromogenes</i> AM1	–	–	Laboratory collection
<i>S. carnosus</i> 4251	–	–	Laboratory collection
<i>S. caprae</i> 2534D	–	–	Laboratory collection

^a “+++” corresponds to an inhibition zone with a diameter superior to 1.1 cm, “++” to a diameter between 0.8 cm and 1.1 cm and “+” to a diameter between 0.6 cm and 0.8 cm. “–” was affected when no inhibition zone was observed.

^b IMI: Institut für Molekular Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Germany.

3. Results

3.1. Screening Staphylococci for the anti-*Legionella* activity

Staphylococcus strains representative of different species, virulent or not, are listed in Table 2. In a first step, anti-*Legionella* activity of the selected strains was checked by spotting colonies on an agar medium seeded with *L. pneumophila* Lens. Inhibitory activity was detected when a clear zone appeared around the colonies after the growth of *Legionella*. From the 15 selected strains, 12 displayed an inhibition zone (Table 2). In order to verify the relationship of this apparent anti-*Legionella* activity and the secretion of an antibacterial factor, the cell-free culture supernatants, named crude extracts (CEs), of the strains were assayed against *L. pneumophila* Lens. Nine from the 15 crude extracts displayed activity halos on the agar test revealing the action of secreted anti-*Legionella* factors (Table 2).

From the 15 tested strains, 12 *Staphylococci* showed inhibition areas around the colonies but only 9 displayed activity in their culture supernatant. For the non active crude extracts prepared from the 3 strains which showed inhibition halos around colonies, the concentration of the inhibiting factor in the supernatant could be too small to be detected. Indeed, as indicated in Table 2 diameters of the inhibition zones varied from a crude extract to another, showing either that the amount of the antibacterial agents varied depending on the species or that the various species produced different factors that differed in their specific activity. Alternatively, the secreted antimicrobials could be denatured during the incubation at 70 °C of the crude extracts. This step was conducted in order to inhibit proteases. In this case, the antimicrobial agents could be proteins but not peptides. This could be verified by using protease inhibitors instead of heat treatment for example. Alternatively, the antimicrobials could be directly subjected to chromatographic separation without heat treatment in order to obtain antibacterial agents separated from proteases.

Almost all the peptides described in the literature (Table 1), secreted by the *Staphylococci* species selected in our study, were successfully purified by the two steps process developed in this work. However, the SLUSH B from *S. lugdunensis*, as well as δ-hemolysin I from *S. warneri* RK were detected by mass spectrometry but in too low amounts to be useful for activity assays. In the same way, GGI III from *S. haemolyticus* was never detected. Our *S. aureus* strain did not produce any detectable PSM, as it was demonstrated for hospital associated strains contrarily to the community asso-

ciated strains [24]. Finally, no hemolytic peptide was recovered, using our methodology, from the culture supernatant of the *S. cohnii* strain. This could be due to the strain used, which either do not produce these particular peptides or in too weak amounts. Indeed, the anti-*Legionella* activity of the crude extract prepared from this strain was low (Table 2).

S. epidermidis, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* and *S. aureus*, known to produce hemolytic peptides, were of particular interest because they appeared as active as *S. warneri* RK.

3.2. Purification and identification of anti-*Legionella* peptides

Because we postulated that the anti-*Legionella* factors were proteinaceous, as found for *S. warneri* RK, the process was first optimized for the purification of warnericin RK and *S. warneri* δ -hemolysins I and II. The purification method of these peptides previously described and based on the affinity chromatography on hydroxyapatite was time consuming [20]. Thus, taking account of the procedure described for the purification of the δ -toxin of *S. epidermidis* [16], we developed a two steps chromatographic strategy. Briefly, crude extracts (CEs) from all the tested *Staphylococci* were directly applied on a hydrophobic interaction phase column. The adsorbed anti-*Legionella* peptides were then eluted from the column by using a rapid gradient of acetonitrile. The fractions displaying an anti-*Legionella* activity were then injected on an analytical C8 HPLC column. The chromatograms obtained from the CE of *S. warneri* RK (Fig. 1A) were quite different than the one previously described [20]. Particularly, the relative intensities of the peptides peaks were different. Moreover, all the different anti-*Legionella* peptides previously described were found but only in their N-formyl forms. The same protocol was applied to other anti-*Legionella* CE and the observed HPLC profiles varied depending on the strains (Fig. 1). However in all cases, at least one major peak was detected. The corresponding fractions were tested for anti-*Legionella* activity and analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Molecular masses of the analyzed peptides were compared to those of peptides known to be secreted by the corresponding *Staphylococci*. All the peptides were thus identified except one, which was named Haemo 3. This peptide, produced by *S. haemolyticus* 2259, has a molecular mass of 2259.78 Da. Interestingly, all the purified peptides were formylated on their N-terminal methionine.

We failed to purify any peptide from the CE of *S. cohnii* 898. However, the *S. cohnii* peptide H2U sequence displayed similarities with the warnericin RK one, thus we decided to acquire the non-formylated synthetic peptide. In the same way, in order to evaluate the impact of the formylation on the peptides activities, synthetic warnericin RK and *S. epidermidis* PSM α were tested.

3.3. Hemolytic and anti-*Legionella* activities of the peptides

The purified peptides were assayed for anti-*Legionella* and hemolytic activities. The antibacterial activity was first determined by measuring the minimal inhibitory concentration (MIC) which corresponds to the capacity of a peptide to inhibit the growth of *Legionella* (Table 3). Among all the tested peptides, the formylated forms of warnericin RK, δ -hemolysins I and II from *S. warneri* and PSM α from *S. epidermidis* showed the highest inhibitory activities towards *Legionella* (MIC < 1 μ M). On the other hand, the SLUSH A and C from *S. lugdunensis*, and GGI II from *S. haemolyticus* displayed the lowest inhibitory activity (MIC > 5 μ M). Interestingly, all the latter peptides displayed a longer amino-acids sequence as compared to the first peptides group.

Besides, analysis of the growth of *L. pneumophila* as a function of the concentration of added peptide, showed two opposite

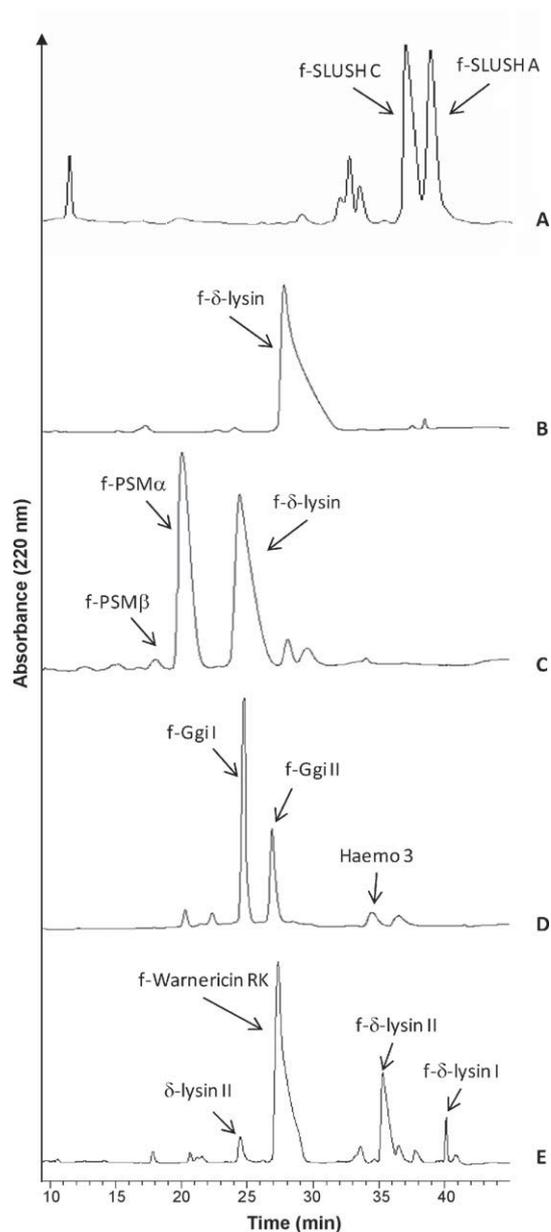


Fig. 1. Reverse-phase elution profiles at 220-nm of active fractions obtained from hydrophobic interaction chromatography from *Staphylococcus* crude extracts. (A) *S. lugdunensis* 967, (B) *S. aureus* 2850, (C) *S. epidermidis* 567, (D) *S. haemolyticus* 2259 and (E) *S. warneri* RK.

types of observed curve shape. In the first case (Fig. 2A), with non-formylated warnericin RK, the peptide seemed to act through an “all or nothing” mechanism with no inhibition of *L. pneumophila* growth above the MIC. In the second case (Fig. 2B), with non-formylated PSM α , the inhibition seemed “progressive” and dependent of the peptide dose.

In an attempt to explain this result, we hypothesized that the different shapes would be related to different modes of action. So, in order to verify such hypothesis, the minimal permeabilization concentration (MPC) of peptides, which corresponds to the concentration leading to 90% of permeabilization of the target bacteria, was determined (Table 3). Briefly, the percentage of permeabilized cells, corresponding to those stained with propidium iodide (IP), was measured using flow cytometry. As pointed out for the MIC, the formylated forms of the peptides produced by *S.*

Table 3Activities of peptides towards *L. pneumophila* and red blood cells.

	Peptide ^a	MIC curve shape	MIC	MPC	Bacterial cultivability decrease	10% Hemolysis concentration	Selectivity (therapeutic index)	
		μM		μM	log	μM	10% hemolysis/MIC	
Group 1	f-Warnericin RK	0.30	AoN	0.6	1.0	0.45	1.50	
	f- δ -hemolysin II	0.54	AoN	0.5	1.7	0.35	0.65	
	f- δ -hemolysin ^b	1.05	AoN	0.3	1.7	1.88	1.79	
	δ -hemolysin II	1.09	AoN	0.4	1.3	0.69	0.63	
	Warnericin RK	1.22	AoN	1.22	3.1	2.75	2.25	
	f-Ggi I	4.15	Pro	1.37	0.3	2.08	0.50	
	f-SLUSH C	5.16	Pro	0.7	1.2	0.18	0.03	
	f-SLUSH A	11.28	Pro	2.0	1.0	0.27	0.02	
			0.3 < MIC < 12		<3	>0.9	<3	<2.5
Group 2	f-PSM α	0.63	AoN	10.0	0.3	6.70	10.63	
	Haemo 3	1.38	AoN	>11.0	0.1	3.68	2.67	
	f- δ -hemolysin ^c	1.59	Pro	>8.4	0.1	23.55	14.81	
	PSM α	1.90	Pro	>10.1	0.7	4.10	2.16	
	f-PSM β	2.69	Pro	>5.4	0.5	10.49	3.90	
	H2U	3.04	Pro	4.5	0.6	49.00	16.12	
	f-Ggi II	13.23	Pro	>5.2	0.0	6.18	0.47 ^d	
			0.6 < MIC < 14		>3	<0.9	>3	>2.0

In both groups, the peptides are sorted by increasing MIC.

AoN = all or nothing. Pro = progressive. All the values correspond to the mean of three independent assays.

^a f indicates the formylated form of the peptide. Characteristics of groups are shown in bold letters.^b *S. aureus*.^c *S. epidermidis*.^d Value out of range.

warneri RK and *S. aureus* δ -hemolysin showed the lowest MPC values (MPC < 1 μM). However it has to be noted that the formylated PSM α , which displayed a low MIC (0.6 μM), poorly permeabilized *L. pneumophila* (MPC = 10 μM) and on the contrary, the MIC of SLUSH C was high (5.2 μM) whereas its MPC was low (0.7 μM). In a general manner, there was no correlation between MIC and MPC values but a relation exists between MIC value and MIC curve shape (Table 3).

In parallel, the same samples were assayed, by CFU counting, for the impact of the various peptides on the cultivability, or viability, of *L. pneumophila*. Except the non formylated warnericin RK, all the peptides tested appeared poorly bactericidal in the experimental conditions used (Table 3). However, when omitting warnericin RK, a linear relation could be found between the permeabilization efficiency (1/MPC) and the decrease in culturable *Legionella* (Fig. 3).

Also the hemolytic activity was studied on human red blood cells and estimated as the peptide concentration leading to 10% hemolysis (Table 3). As previously mentioned [20], the peptides produced by *S. warneri* RK appeared highly hemolytic (<0.5 μM). SLUSH peptides (<0.3 μM) as well as *S. aureus* δ -hemolysin (2 μM) displayed also a high hemolytic activity whereas other peptides showed medium (3–10 μM) or weak (>10 μM) lytic effect towards human erythrocytes.

Thus combining the anti-*Legionella* and hemolytic activities, the selectivity, or therapeutic index, was estimated by the ratio 10% hemolysis/MIC. For a given MIC value, higher the selectivity is and more the concerned peptide is potentially interesting in Legionnaire's disease treatment.

Finally, based on MPC and hemolysis experiments, the studied peptides can be separated into two peptide groups as shown in Fig. 4. Both groups are well described (Table 3) by MPC, the decrease in cultivable *Legionella*, hemolysis and selectivity values but not by MIC since their MIC ranges fully overlap. Group 1 includes peptides with low MPC (<3 μM), significant decrease in bacterial cultivability (>0.9 log), low 10% hemolysis concentration (<3 μM) and low selectivity (<2.5) while on the opposite high MPC (>3 μM), poor decrease in cultivability (<0.9 log), high 10% hemolysis concentration (>3 μM) and high selectivity (>2.5) are typical values of group 2 peptides.

4. Discussion

S. warneri RK, like many other *Staphylococci*, produce hemolytic peptides, δ -hemolysin I and II and warnericin RK, which were also found to inhibit the growth of *Legionella* species [20]. Because these peptides showed sequence homology with the hemolytic peptides produced by other *Staphylococci* (Table 1) we screened a collection of various staphylococcal species. The two main objectives of this study were (i) to demonstrate the anti-*Legionella* activity of the staphylococcal hemolytic peptides, (ii) to detect and identify at least one peptide displaying a high anti-*Legionella* activity and a weak hemolytic activity.

All the peptides were purified in their formylated form, except for the δ -hemolysin II from *S. warneri* RK. The secretion of the formylated form of such peptides, δ -hemolysin from *S. aureus* [14] or from *S. warneri* RK [20] was previously demonstrated. However, in our case the proportion of formylated peptides appeared particularly high as compared to the results of the cited studies. This is probably due to the purification process used in the present work that is based on the selection of highly hydrophobic peptides since the non-formylated forms of the peptides, thus carrying a free amine function at their N-terminus, were more polar than formylated ones. It has to be noted that the formylated forms of warnericin RK, δ -hemolysin II from *S. warneri* and PSM α from *S. epidermidis* showed a higher inhibitory activity (MIC < 0.6 μM) than the corresponding non-formylated forms (MIC > 1.1 μM). This could be related to the difference in positive charges number between both forms of peptides. Indeed, the N-terminal amine function in the formylated peptides is blocked and then cannot be protonated, while the antimicrobial activity of the peptides is correlated to their net positive charge [3] as bacterial membranes are globally negatively charged.

In our experiments carried out to determine the MIC of the purified peptides, we observed two different curve shapes in the results, which were named "all or nothing" and "progressive" (Fig. 2). It was suggested [21], using model membranes, that warnericin RK destabilized the membranes through a detergent-like mode of action, rather than forming pores, as previously proposed for *S. aureus* δ -hemolysin [1]. Thus the "all or nothing" shape, observed for

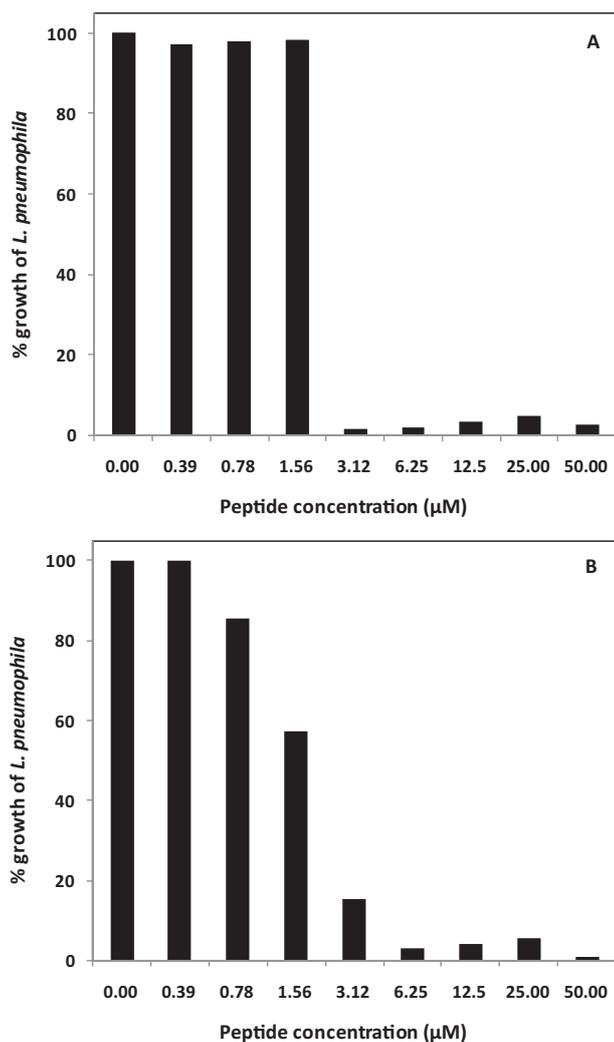


Fig. 2. Growth of *L. pneumophila* in presence of increasing concentrations of peptide. (A) Warnericin RK = all or nothing shape and (B) PSMα from *S. epidermidis* = progressive shape. 100% corresponds to the control without peptide. Each histogram corresponds to only one experiment.

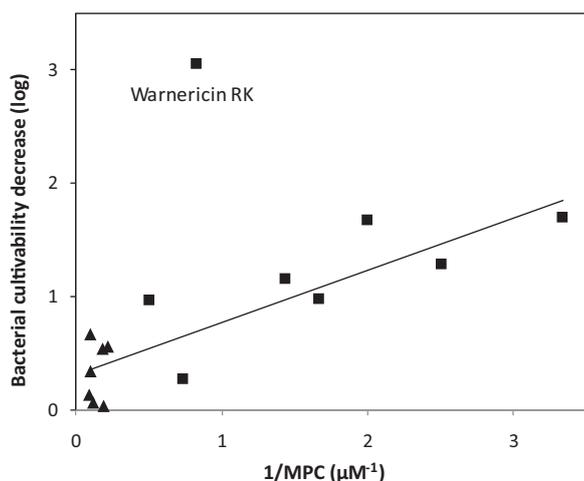


Fig. 3. Relationship between the permeabilization (1/MPC) and the decrease in bacterial cultivability. MPC = minimal permeabilization concentration and corresponds to the peptide concentration leading to 90% of permeabilization of *L. pneumophila*. After permeabilization the bacteria were spread on a BCYE agar plates for estimation of the decrease in bacterial cultivability. For experimental details, see Section 2. (■) Group 1 and (▲) Group 2 peptides. The regression line was calculated without the warnericin RK result ($R^2 = 0.7498$).

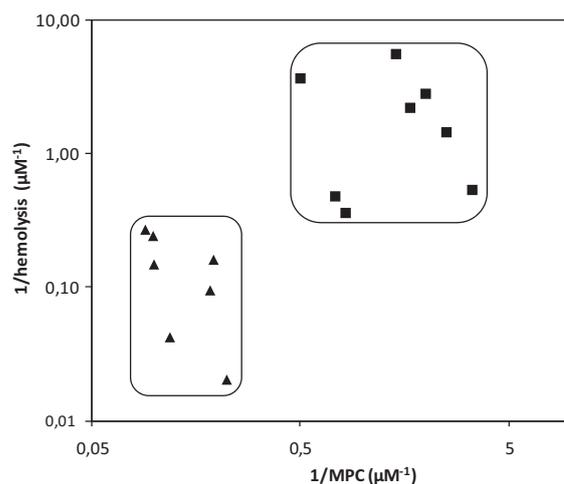


Fig. 4. Relationship between the permeabilization (1/MPC) and the hemolytic activity (1/10% hemolysis). MPC = minimal permeabilization concentration and corresponds to the peptide concentration leading to 90% of permeabilization of *L. pneumophila*. 10% hemolysis is the peptide concentration leading to 10% hemolysis. For experimental details, see Section 2. (■) Group 1 and (▲) Group 2 peptides.

warnericin RK and other peptides, could be due to a cooperative interaction of peptide molecules resulting in a sudden destabilization of the membrane when the peptide reached a threshold concentration. On the contrary, the “progressive” shape could be due to a progressive increase in the number of channels which permeabilized the bacterial membrane.

Taking the entire results presented in Table 3, group 1 peptides were generally membrane-active peptides that bind to *Legionella* and to erythrocytes at a peptide concentration similar to or below their MIC concentration and were also bactericidal, whereas group 2 peptides were membrane-active peptides only at high concentrations compared to MICs (around 10-fold) and poorly bactericidal. So membrane events occurring during each type of experiments must be investigated. (i) In MIC determination experiments, the peptide continuously interacts with bacteria in the culture. Small pores, which abolish membrane potential, are sufficient for growth inhibition but large pores or membrane solubilization may also occur. In this respect, transient cation specific channels were observed in the micromolar range for warnericin RK [21] and *S. aureus* δ-hemolysin [10]. (ii) Hemolysis requires large pores formation or membrane solubilization to allow hemoglobin (68,000 Da) leakage as evidenced by the partial osmotic protection obtained by polyethylene glycols of different sizes (from 4000 to 10,000 Da) [21]. (iii) In bacterial membrane permeabilization assays, only small pores are needed to allow propidium iodide (IP, MW 668) penetration. And (iv) when spreading peptide treated bacteria on culture medium plates to study the bactericidal effect of a peptide, only the bacteria which were permeabilized by reversible structures, presumably small ionic channels rather than larger IP or hemoglobin pores and larger structures, were able to recover their membrane integrity and thus proliferate. Finally, keeping in mind that MPC corresponded to the peptide concentration which permeabilized 90% of the bacterial cells, propidium iodide penetration occurred far below the MICs of the group 1 peptides. We propose that at low concentrations, such peptides permeabilize *Legionella* cells by forming ionic channels and IP pores, and only few hemoglobin pores, while ionic channels formation is the predominant event for the group 2 peptides whatever the peptide concentration. So in this view, the peptides displaying an “all or nothing” mode of action may be the ones that bind synergistically to their respective target sites with higher affinity than the peptides acting in a “progressive” way.

To conclude, *Staphylococci* produce hemolytic peptides which are, for all the tested peptides, active towards *L. pneumophila*. According to their activities in terms of inhibition of growth (MIC) and permeabilization (MPC) of *L. pneumophila* as well as hemolysis, these peptides can be separated in two classes based on their mode of action. The first class, with warnericin RK as the model, might destabilize the membrane of bacterial cells by a detergent-like mechanism as previously suggested [21] at high concentration and by forming pores at low concentration. The second class of peptides, corresponding to PSM α from *S. epidermidis* as an archetype, inhibited *L. pneumophila* by a bacteriostatic mode of action, which could be due to the formation of small pores in the bacterial membrane. Interestingly, both warnericin RK and PSM α , displayed similar low MIC but the second one appeared poorly hemolytic. PSM α is potentially a good candidate to be used as a specific anti-*Legionella* drug in so far as its spectrum of activity against bacteria would be similar to the one observed with warnericin RK and delta-lysin I from *S. warneri* [20]. In order to design an effective anti-*Legionella* peptide devoid of hemolytic activity, it could be interesting to determine which warnericin RK and PSM α structural parameters are implicated in their differences noted in the present work.

Acknowledgments

We want to thank Susanne Hennig and Wilma Ziebuhr from Institut für Molekular Infektionsbiologie, Universität Würzburg, (Würzburg, Germany) and Pr. F. Vandenesch from the Centre National de Référence des Staphylocoques (Lyon, France) for kindly providing some of the *Staphylococci* strains used in this study. A. Marchand was supported by a grant of the French Minister of Research.

References

- [1] Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1529–39.
- [2] Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:355–80.
- [3] Dhople VM, Nagaraj R. Conformation and activity of delta-lysin and its analogs. *Peptides* 2005;26:217–25.
- [4] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16–34.
- [5] Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandenesch F. Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect Immun* 1997;65:95–100.
- [6] Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506–26.
- [7] Frenette M, Beaudet R, Bisailon JG, Sylvestre M, Portelance V. Chemical and biological characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by *Staphylococcus haemolyticus* isolated from urogenital flora. *Infect Immun* 1984;46:340–5.
- [8] Hechard Y, Ferraz S, Bruneteau E, Steinert M, Berjeaud JM. Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiol Lett* 2005;252:19–23.
- [9] Ji G, Pei W, Zhang L, Qiu R, Lin J, Benito Y, et al. *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J Bacteriol* 2005;187:3139–50.
- [10] Kerr ID, Dufourcq J, Rice JA, Fredkin DR, Sansom MS. Ion channel formation by synthetic analogues of staphylococcal delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 1995;1236:219–27.
- [11] Mak P, Maszewska A, Rozalska M. The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from *Staphylococcus cohnii*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;287:230–5.
- [12] McKeivitt AI, Bjornson GL, Mauracher CA, Scheifele DW. Amino acid sequence of a delta like toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1990;58:1473–5.
- [13] Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med* 1999;189:907–18.
- [14] Mellor IR, Thomas DH, Sansom MS. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 1988;942:280–94.
- [15] Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwaik YA. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 2004;6:129–39.
- [16] Otto M, Gotz F. Analysis of quorum sensing activity in *Staphylococci* by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin. *Biotechniques* 2000;28:1088–96.
- [17] Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:149–62.
- [18] Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative *Staphylococci*. *J Bacteriol* 1998;180:3181–6.
- [19] Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Levi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* 2004;97:950–63.
- [20] Verdon J, Berjeaud JM, Lacombe C, Hechard Y. Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* 2008;29:978–84.
- [21] Verdon J, Falge M, Maier E, Bruhn H, Steinert M, Faber C, et al. Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys J* 2009;97:1933–40.
- [22] Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009;30:817–23.
- [23] Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003;188:706–18.
- [24] Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007;13:1510–4.
- [25] Watson DC, Yaguchi M, Bisailon JG, Beaudet R, Morosoli R. The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *Biochem J* 1988;252:87–93.
- [26] Wiseman GM. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol Rev* 1975;39:317–44.
- [27] Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genome wide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 2005;191:289–98.

B. Résultats complémentaires

1. Activités supplémentaires des *Staphylococcus*

Dans la **publication 1**, les quinze souches de *Staphylococcus* ont été criblées à partir de leur activité contre *L. pneumophila* Lens.

En parallèle, leurs activités contre deux autres espèces de *Legionella* ainsi que contre des érythrocytes de différentes espèces ont également été déterminées.

L'activité des différents *Staphylococcus* contre des érythrocytes est présentée dans le **tableau 12**.

Tableau 12. Activité hémolytique des quinze souches de *Staphylococcus*.

	Hémolyse			
	Sang de mouton		Sang de cheval	
	Culture	Surnageant	Culture	Surnageant
<i>S. warneri</i> RK	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 2850	+++	++	+++	++
<i>S. lugdunensis</i> 967	+++	++	+++	++
<i>S. saprophyticus</i> 715	++	-	++	-
<i>S. hominis</i> 373	++	-	++	-
<i>S. epidermidis</i> 567	-	-	-	+
<i>S. xylosus</i> ATCC 700404	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> 898	++	-	++	-
<i>S. haemolyticus</i> 2259	++	-	++	-
<i>S. lentus</i> 982	-	-	-	-
<i>S. equorum</i> 4057C	-	-	-	-
<i>S. simulans</i> 4334	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i> AM1	-	-	-	-
<i>S. carnosus</i> 4251	-	-	-	-
<i>S. caprae</i> 2534D	-	-	-	-

Les cultures ou surnageants de culture des différents *Staphylococcus* ont été déposés sur une gélose au sang (mouton ou cheval).

« +++ » correspond à une zone d'hémolyse ayant un diamètre supérieur à 1 cm ; « ++ » a un diamètre compris entre 0,8 et 1 cm ; « + » à un diamètre compris entre 0,6 et 0,8 cm ; et « - » correspond à une absence d'hémolyse.

Les cultures de sept des quinze souches testées sont hémolytiques. Toutefois seules quatre d'entre elles ont un surnageant de culture actif contre les érythrocytes de cheval (trois pour les érythrocytes de mouton). Cette différence entre culture et surnageant de culture peut s'expliquer par le fait que les composés actifs sont sans doute trop faiblement concentrés dans le surnageant de culture pour qu'une activité soit détectée.

L'activité des cultures et surnageants de culture des *Staphylococcus* contre deux souches de *L. pneumophila* (Lens et Dallas), ainsi qu'une autre espèce de *Legionella* (*L. longbeachae* ATCC 33484) ont ensuite été testées (**Tableau 13**).

Tableau 13. Activité anti-*Legionella* de quinze souches de *Staphylococcus*.

	Activité anti- <i>Legionella</i>					
	<i>L. pneumophila</i> Lens		<i>L. pneumophila</i> Dallas		<i>L. longbeachae</i> ATCC 33484	
	Culture	Surnageant	Culture	Surnageant	Culture	Surnageant
<i>S. warneri</i> RK	+	++	-	++	-	++
<i>S. aureus</i> 2850	++	+++	++	+++	++	+++
<i>S. lugdunensis</i> 967	+	+++	+	++	+	++
<i>S. saprophyticus</i> 715	+++	+	+++	+	+++	+
<i>S. hominis</i> 373	+++	++	+++	++	+++	++
<i>S. epidermidis</i> 567	+	+++	+	+++	+	+++
<i>S. xylosus</i> ATCC 700404	++	+	++	+	++	+
<i>S. cohnii</i> 898	+++	+	+++	++	+++	+
<i>S. haemolyticus</i> 2259	+++	++	+++	++	+++	++
<i>S. lentus</i> 982	++	-	+++	-	+++	-
<i>S. equorum</i> 4057C	+	-	+	-	+	-
<i>S. simulans</i> 4334	+	-	+	-	+	+
<i>S. chromogenes</i> AM1	-	-	-	-	-	-
<i>S. carnosus</i> 4251	-	-	-	-	-	-
<i>S. caprae</i> 2534D	-	-	-	-	-	-

« +++ » correspond à un halo d'inhibition ayant un diamètre supérieur à 1 cm ; « ++ » à un diamètre compris entre 0,8 et 1 cm ; « + » à un diamètre compris entre 0,6 et 0,8 cm ; et « - » correspond à une absence d'inhibition.

D'une manière générale, les activités contre les trois *Legionella* testées sont similaires. C'est pour cette raison que seule *L. pneumophila* Lens, souche principalement utilisée au sein du laboratoire, a été utilisée pour l'ensemble de mon travail.

La comparaison des activités hémolytiques et anti-*Legionella* ne fait pas apparaître de corrélation. En effet, certaines souches de *Staphylococcus* comme *S. warneri* RK, *S. aureus* 2850 ou encore *S. lugdunensis* 967 sont hémolytiques et anti-*Legionella* alors que *S. epidermidis* 567 ou encore *S. xylosus* ATCC 700404 par exemple, ne sont pas hémolytiques mais sont tout de même actives contre *Legionella*.

Ces observations ont été confirmées dans la **publication 1** par la caractérisation des peptides actifs et leur ségrégation en un groupe très hémolytique et un groupe peu hémolytique.

2. Spectre d'activité des souches de *Staphylococcus* produisant des peptides anti-*Legionella*

La WRK et les δ -lysines de *S. warneri* RK présentent un spectre d'activité restreint au genre *Legionella* ainsi qu'à *Bacillus megaterium* F04 (Verdon *et al.*, 2008).

Un spectre d'activité des cinq souches à partir desquelles nous avons purifié des peptides anti-*Legionella* a donc été effectué. Pour cela, le surnageant de culture de chaque souche active a été déposé sur des géloses sur lesquelles les suspensions des différentes bactéries testées ont été préalablement étalées. L'activité a été visualisée par la présence ou non d'un halo d'inhibition autour de la zone de dépôt.

Les cinq souches testées présentent un spectre d'activité restreint au genre *Legionella*, excepté *S. aureus* qui présente également une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* 910704 (**Tableau 14**).

Toutefois, le peptide purifié à partir du surnageant de culture de *S. aureus*, la δ -lysine, n'est pas actif contre cette bactérie (données non montrées). Un autre composé, non purifié par notre méthode, pourrait donc être impliqué dans cette activité.

D'autre part, la WRK présente une activité contre *Bacillus megaterium* avec une CMI égale à 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Verdon *et al.*, 2008) alors que le surnageant de culture n'est pas actif contre cette souche (**Tableau 14**). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans nos conditions expérimentales, la WRK présente dans le surnageant de culture n'est pas assez concentrée pour qu'une activité soit détectée.

Tableau 14. Spectre d'activité des cinq souches de *Staphylococcus* productrices de peptides anti-*Legionella*.

	Souche active contre <i>Legionella</i>				
	<i>S. warneri</i> RK	<i>S. aureus</i> 2850	<i>S. epidermidis</i> 567	<i>S. haemolyticus</i> 2259	<i>S. lugdunensis</i> 967
Gram +					
<i>S. aureus</i> 2850	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 567	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> RK	-	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> 2259	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i> 967	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> F04	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-
Gram -					
<i>E. coli</i> MG1655	-	-	-	-	-
<i>L. pneumophila</i> Lens	+	+	+	+	+
<i>L. pneumophila</i> Dallas	+	+	+	+	+
<i>L. longbeachae</i>	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 910704	-	+	-	-	-

« + » correspond à une activité contre la bactérie testée, « - » a une absence d'activité.

3. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire permet notamment de déterminer la structure secondaire adoptée par des peptides en solution ou insérés dans des membranes modèles. Cette technique repose sur la capacité qu'ont des structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche. La **figure 23** présente les spectres dichroïques caractéristiques des structures peptidiques en hélice α , en feuillet β et en pelote statistique (structure non organisée de façon périodique).

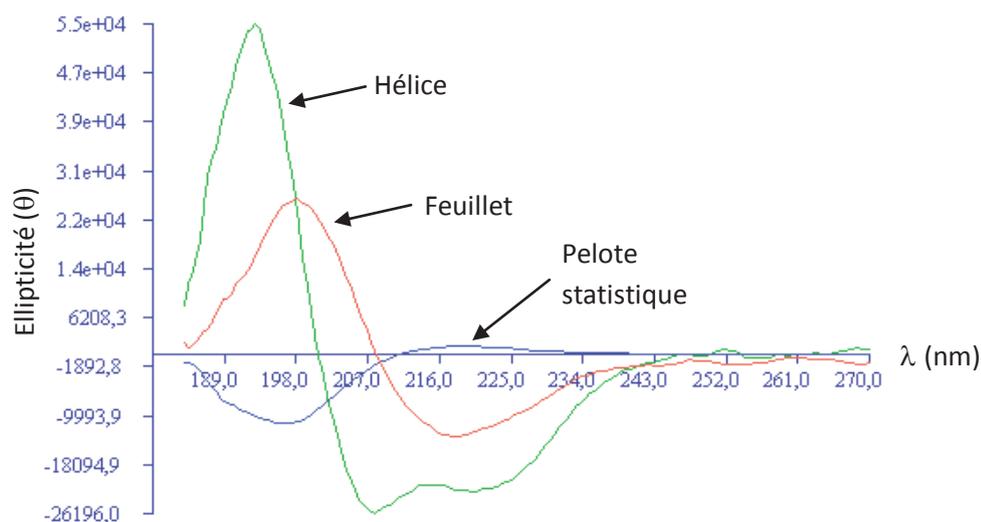


Figure 23. Spectres dichroïques caractéristiques des principales structures secondaires des peptides.

Le spectre caractéristique d'une hélice α présente une bande d'absorption positive à 190 nm et deux bandes d'absorption négatives à 208 et 220 nm.

De plus un ratio $\theta_{220\text{nm}} / \theta_{208\text{nm}}$ proche de 0,8 correspond à un peptide structuré en monomère, alors que lorsque ce rapport tend vers 1, le peptide a tendance à s'agréger (Lau *et al.*, 1984).

Les quatre peptides principaux de notre étude ont été analysés en dichroïsme circulaire. Il s'agit de la WRK formylée ou non et de la PSM α formylée ou non. Les spectres dichroïques obtenus sont présentés dans la **figure 24**.

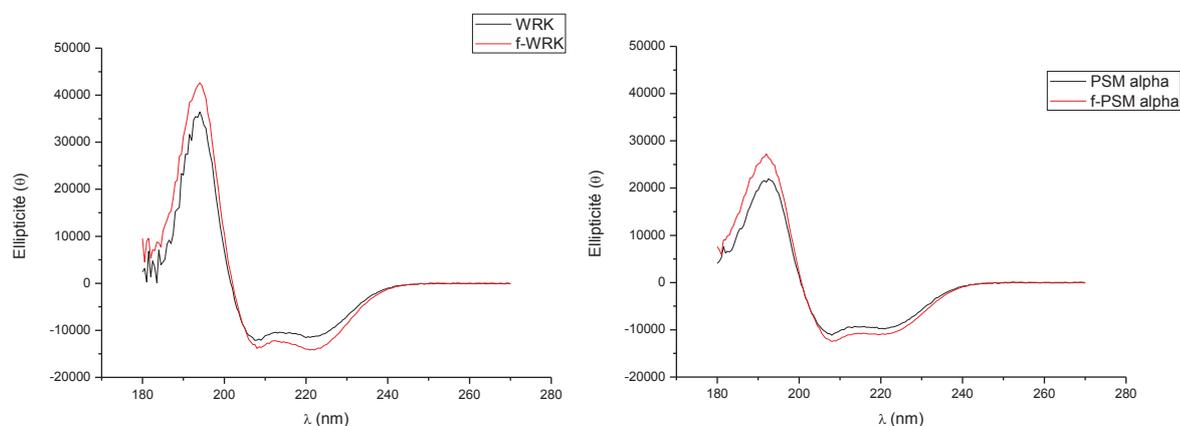


Figure 24. Spectres dichroïques obtenus pour la WRK, la f-WRK, la PSM α et la f-PSM α .

Les peptides (100 μM) ont été repris dans 20 % de TFE et les spectres réalisés à température ambiante.

Les quatre spectres obtenus présentent les caractéristiques de peptides en hélice alpha. Le maximum d'absorption à 190 nm est plus important pour les deux WRK que pour les PSM α ce qui laisse penser que les WRK présentent un pourcentage d'hélice plus important. De plus, pour les mêmes raisons, la formylation des peptides semble favoriser la structuration en hélice des deux peptides testés.

Le calcul du ratio $\theta_{220\text{nm}} / \theta_{208\text{nm}}$ donne un résultat de 0,87 pour les deux PSM α qui seraient donc sous forme de monomère, alors que pour la WRK et la f-WRK, les résultats sont respectivement de 0,95 et 1,01 correspondant à des peptides agrégés dans nos conditions expérimentales. Si ces résultats sont confirmés, cela va confirmerait que les deux peptides ont effectivement des modes d'action différents, comme nous l'avons suggéré dans la **publication 1**.

Pour vérifier la structure secondaire qu'adopte chaque peptide, il faut ensuite déconvoluer les spectres. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le logiciel CDFriend qui a été développé au laboratoire CBMN par Sébastien Buchoux. Celui-ci, contrairement à d'autres logiciels existants permettant l'analyse des protéines, est adapté à celle des peptides (Thèse Lucie Paÿloune Khemtemourian, 2005). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15. Résultats de la déconvolution des spectres des peptides WRK, f-WRK, PSM α et f-PSM α .

	WRK	f-WRK	PSM alpha	f-PSM alpha
Hélice alpha	50,8	60,6	44,9	53,3
Pelote statistique	22,9	8,8	45	38,3
Feuillet beta	26,3	30,5	10	8,3

Les peptides (100 μM) ont été repris dans 20 % de TFE et les spectres réalisés à température ambiante.

La déconvolution a été effectuée avec le logiciel CDFriend.

Les données sont exprimées en % relatif.

Ces résultats confirment les observations effectuées sur les spectres. Les quatre peptides se structurent globalement en hélice alpha. La WRK, notamment sous sa forme formylée, est bien le peptide qui présente le plus fort pourcentage d'hélice alpha. Au contraire, la PSM α , semble moins structurée, avec un pourcentage de pelote statistique qui atteint environ 40 %. Le feuillet β représente un pourcentage non négligeable des warnéricines RK (~ 30 %) alors qu'il n'est que d'environ 10 % chez les PSM α . Cette variation importante pourrait expliquer en partie les différences d'activités observées entre les deux peptides.

La structure de la warnéricine RK a déjà été étudiée par Verdon *et al.* en 2009 (Verdon *et al.*, 2009a). Son analyse par dichroïsme circulaire suggère que le peptide se structure principalement en hélice α en présence de 8 % de TFE. Les proportions déterminées étaient environ de 55 % d'hélice α , 10 % de feuillet β , de 20 % de pelote statistique ainsi que de 15 % de coudes. Les valeurs sont cohérentes avec les nôtres, même s'il existe des différences, qui sont sans doute dues à la méthode de calcul utilisée (logiciel CDSSTR sur le serveur Dichroweb) et aux conditions expérimentales.

II. Etude structure-activité de la WRK et la PSM α , deux peptides anti-*Legionella*

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis de proposer l'existence de deux groupes de peptides anti-*Legionella* représentés par la WRK de *S. warneri* RK et la PSM α de *S. epidermidis*, qui agissent probablement selon des mécanismes différents.

La seconde partie de mon travail a donc consisté à réaliser une étude structure-activité à partir de ces deux peptides pour déterminer les motifs peptidiques responsables de leurs activités anti-*Legionella* et hémolytique. Une partie de ces résultats est présentée dans la **publication 2**.

A. Publication 2: Effect of aminoacid substitution in the staphylococcal peptides warnericin RK and PSM α on their anti-*Legionella* and hemolytic activities

La WRK et la PSM α sont deux peptides structurés en hélice alpha amphiphile qui présentent des similitudes au niveau de leur structure. En effet, leurs projections en roues hélicoïdales révèlent que la structure de la WRK est très proche de celle de la PSM α quand sa séquence est inversée à l'exception des résidus C- et N- terminaux. Ce peptide a été nommé « reverse PSM » (rPSM). De même, la structure de la PSM α est proche de celle de la « reverse WRK » (rWRK). A partir de ces observations, deux familles de peptides ont été élaborées. La “WRK to rPSM family” est constituée de peptides modifiés à partir de la séquence de la WRK pour s'approcher de celle de la rPSM, et les peptides de la “PSM to rWRK family” sont modifiés dans la séquence de la PSM pour s'approcher de celle de la rWRK. Les substitutions réalisées sur les séquences des peptides de ces deux familles impliquent essentiellement des résidus de glycine échangés avec de la lysine ou de l'acide aspartique, et des résidus de phénylalanine échangés avec de la valine ou de l'isoleucine, à la fois sur les faces cationiques et non cationiques des hélices.

Les activités anti-*Legionella* (CMI, CMP et diminution de la viabilité) et hémolytiques de ces peptides ont ensuite été déterminées. Ces résultats ont permis d'identifier des résidus et positions importants pour l'une ou l'autre des activités. Par exemple, la substitution d'un résidu lysine par un résidu glycine en position 9 de la WRK (WRK_K9G) entraîne une diminution de toutes les activités qui deviennent similaires à celles de la PSM α . Au contraire, la substitution inverse, une lysine à la place d'une glycine en position 14 de la PSM α (PSM_G14K), permet de rendre le peptide aussi actif contre *Legionella* que la WRK, tout en conservant une activité hémolytique similaire à celle de la PSM α .

De plus, l'activité anti-*Legionella* a tendance à être plus importante lorsque la charge positive du peptide augmente, contrairement à l'activité hémolytique qui globalement ne varie pas. Ceci est

en cohérence avec la littérature qui décrit qu'une augmentation de la charge va permettre d'augmenter l'interaction des peptides avec les membranes bactériennes chargées négativement, alors que l'interaction avec les membranes eucaryotes, neutres, sera moins impactée (Tossi *et al.*, 2000).

En parallèle, la capacité des peptides à perméabiliser des membranes modèles a été évaluée. Ces membranes sont des liposomes de type MLV (« multilamellar vesicles ») composées d'une part de mélanges à des taux différents des trois principaux phospholipides retrouvés dans la membrane de *Legionella*, à savoir la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la cardiolipide (CL), et d'autre part de phosphatidylglycérol (PG). Ces résultats ont permis de séparer les peptides en trois groupes selon leur capacité à perméabiliser des vésicules avec des membranes modèles de *L. pneumophila*. Les peptides du groupe 1, peu perméabilisants, sont les moins actifs contre *Legionella*, alors que les peptides du groupe 2, les plus perméabilisants, sont les plus actifs. Enfin, le groupe 3, moyennement perméabilisant, contient des peptides aussi différents en termes d'activité que la WRK et la PSM α .

D'autre part, lorsque PC est présent dans les membranes, celles-ci sont plus sensibles à la perméabilisation par les peptides. Or, ce phospholipide qui est retrouvé essentiellement dans les membranes eucaryotes, est également un composant majoritaire des membranes de *Legionella*. Ceci peut donc expliquer en partie la spécificité d'action des peptides contre *Legionella* et les érythrocytes.

Enfin, le calcul des énergies libres de Gibbs a permis d'émettre des hypothèses sur le mode d'action des peptides. Tout d'abord, l'énergie de transfert de l'interface à la membrane $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ permet de prédire le mécanisme de pénétration des peptides dans la membrane. D'après les résultats, il semble que la PSM α pourrait agir en s'insérant dans la membrane et en la déstabilisant, causant ainsi une sortie du contenu cellulaire, de façon progressive en fonction de la quantité de peptide. Au contraire, la WRK pourrait agir selon deux mécanismes. A la fois de façon progressive, comme la PSM, mais elle pourrait également causer la libération du contenu cellulaire selon un mécanisme « tout ou rien ». En effet, le peptide s'accumulerait à la surface membranaire jusqu'à atteindre une concentration seuil permettant la formation de pores de très grande taille et la sortie de la totalité du contenu cellulaire d'un seul coup.

En considérant des membranes artificielles composées uniquement de POPC, le calcul de l'énergie libre de liaison à la membrane ($\Delta G^{\circ}_{\text{if}}$) d'une part, et de l'énergie libre d'insertion dans celle-ci ($\Delta G^{\circ}_{\text{oct}}$) d'autre part permet de penser que, globalement, les peptides de la famille « WRK to rPSM » pourraient être plus actifs que ceux de la famille « PSM to rWRK ». En effet, étant plus hydrophobes et mieux structurés en hélice alpha amphiphile, ils se lieraient mieux à l'interface membranaire et s'inséreraient plus facilement au sein de la membrane artificielle. Les activités biologiques sont globalement en accord avec ces résultats théoriques.

Cette étude structure-activité a donc permis de mettre en évidence quelques résidus importants expliquant la différence d'activité entre la WRK et la PSM α . Toutefois, la modification

d'un résidu ayant une influence sur différents paramètres physico-chimiques des peptides (charge, hydrophobie...), il est difficile de déterminer le (ou les) paramètres réellement en cause.

PUBLICATION 2

Effect of aminoacid substitution in the staphylococcal peptides warnericin RK and PSM α on their anti-*Legionella* and hemolytic activities

Soumis à BBA

Effect of aminoacid substitution in the staphylococcal peptides warnericin RK and PSM α on their anti-*Legionella* and hemolytic activities

Adrienne Marchand, Julien Verdon, Clémence Loiseau, Christian Lacombe, Jean-Marc Berjeaud*

Université de Poitiers, Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau - UMR 6008 CNRS, IBMIG - UFR Sciences fondamentales et Appliquées, 1 rue du Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France.

Abstract

Warnericin RK from *S. warneri* and PSM α from *S. epidermidis* are anti-*Legionella* peptides which were differently classified in a recent study. Warnericin RK is highly hemolytic with a bactericidal mode of action whereas PSM α is poorly hemolytic with a bacteriostatic mode of action towards *L. pneumophila*. A collection of peptides varying in sequence from warnericin RK to PSM α were designed, synthesized and their anti-*Legionella* activities, in terms of growth inhibition, permeabilization and bactericidal effect, as well as their hemolytic activities were measured and compared. The results showed that some residues, in position 14 for both peptides for instance, were of major importance for bactericidal and hemolytic activities. The study of the release of calcein from vesicles when treated by peptides showed that the presence of phosphatidylcholine in the membrane enhanced the permeabilization activity of the peptides.

Keywords

Legionella pneumophila, Anti-*Legionella* peptides, Membrane permeabilization

* **Corresponding author:** Jean-Marc Berjeaud,

Université de Poitiers, Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau - UMR 6008 CNRS, UFR Sciences fondamentales et Appliquées, IBMIG, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France.

Tel : +33 5 49 45 40 06 – Fax : +33 5 49 45 35 03

E-mail : jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr

1. Introduction

Legionella pneumophila is a waterborne pathogenic bacterium responsible for severe pneumonia called Legionnaire's disease [1]. In 2009, there were 5500 reported cases in Europe leading to about 10 % death ca. Susceptible hosts are infected by inhalation of aerosolized water containing the bacteria. Thus, *Legionella* reaches the lungs and multiply into macrophages [2]. *L. pneumophila* can be found at high levels in man-made water systems such as air conditioning and cooling towers, spas, etc. In the environment, *L. pneumophila* is ubiquitously found in fresh water and could survive within biofilms and free-living amoebae [3]. Concerning *L. pneumophila* growth in water systems, various methods of control have been used: chlorine, monochloramine, heat. However, these treatments are not fully efficient and, after a lag period following the treatment, *L. pneumophila* might be able to recolonize the system [4]. Therefore, it is of primary importance to find new treatments to restrain *L. pneumophila* growth.

In a previous study [5], we isolated and characterized 12 staphylococcal peptides active towards *Legionella* as well as red blood cells. Most of these peptides, such as the *S. aureus* δ -hemolysin were previously described but were not known for their antimicrobial, and particularly anti-*Legionella*, activity [6, 7]. Two classes of anti-*Legionella* peptides were proposed according to their mode of action [5]. Most representative members of each class are, *i*: the warnericin RK (WRK) [5, 8], a highly hemolytic peptide with a bactericidal mode of action towards *L. pneumophila* and *ii*: PSM α (Phenol-soluble modulins α) from *S. epidermidis*, which was found poorly hemolytic with a bacteriostatic mode of action. This peptide was previously described as a member of a complex, composed of three peptides (PSM α , β and γ), that displayed a pro-inflammatory activity and was implicated in the *S. epidermidis* biofilm detachment [9-11].

According to the previous results [5] it was hypothesized that WRK could destabilize the membrane of the bacterial cell by a detergent-like mode of action, as suggested earlier [12] whereas PSM α from *S. epidermidis* could form small pores in the bacterial membrane.

Antimicrobial peptides act against bacteria by permeabilizing the membrane or inhibiting metabolism. Many studies have focused on peptide-membrane interactions, leading to distinct mechanisms. In the barrel-stave pore model, the peptides are aggregated to form well-defined transmembrane pores, constituted only with peptidic molecules [13, 14]. The toroidal pore model [15, 16] resembles the barrel-stave model except for the final structure of the pore. Indeed, when peptides penetrate into the bilayer, their hydrophilic parts interact with polar heads of phospholipids inducing a positive curvature of the membrane then the formation of a pore composed of a peptide / lipid complex. In the carpet model [17], peptides lie on the membrane and recover it like a carpet. When a threshold concentration is reached, peptides induce the lysis of the membrane. In the detergent-like model [18], more generalist, it is proposed that at low concentration peptides induce bilayer perturbations of long-range order and exhibit a detergent-like solubilization (formation of disk-shaped structures or micelles) of the membrane at high peptide concentrations, leading to cell lysis. This detergent-like model was proposed for the activities of δ -hemolysin of *S. aureus* and the WRK of *S. warneri* [7].

In the present work, we studied the structure / activities relationships of PSM α and WRK in order to identify the amino acid residues which were important for the anti-*Legionella* and / or hemolytic activities. For this purpose, 16 variants of these two peptides were designed and synthesized. The comparison of their biological activities led us to localize in their peptidic sequences, the positions and residues of particular importance for their activities.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strain, growth conditions, antimicrobial peptides and phospholipids

Legionella pneumophila Lens was routinely grown at 37°C either on Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar plates for 96 h or in Buffered Yeast Extract (BYE) liquid medium for 24-30 h under shaking (150 rpm). All the synthetic non-formylated peptides were purchased

from GenScript (Piscataway, USA) excepted PSM α , rPSM, rWRK and WRK_K9G-G20D which were provided by Dr. T. Jouenne from the PBS laboratory (CNRS UMR 6270, Rouen, France). All the phospholipids were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc.

2.2 Peptide titration

Peptide concentration was determined by the bicinchoninic acid assay as described by the supplier (Sigma) with Bovine Serum Albumin as a standard. 25 μ L of each sample were mixed with 200 μ L of a solution of bicinchoninic acid and copper sulfate 50:1 (v/v). The preparation was incubated at 37°C for 30 minutes and the absorbance at 595 nm was measured by a microtiter plate reader OPSYS MR (ThermoLabsystems).

2.3 Anti-Legionella activity assays. Minimal inhibitory concentration

Minimal inhibitory concentration (MIC) of the different peptides was determined using microtiter plate assays as described previously [19]. MIC represents the lowest concentration of peptide which totally inhibits the growth of *L. pneumophila*.

2.4 Membrane permeabilization assays and cultivability evaluation

Exponentially growing *L. pneumophila* (OD₆₀₀ = 0.4-0.8) were washed and resuspended in BYE at a concentration of 10⁶ CFU/mL. The bacterial suspension was treated with several concentrations, ranging from 0 to 10 μ M of peptides during 45 minutes at 37°C. The generation time, in these conditions, was evaluated and corresponded to 2.5 h (data not shown) (i) One half of the cell suspensions were then analysed using a flow cytometric approach after bacterial staining with a couple of fluorochromes, SYTO9 and propidium iodide (PI), as described previously [12]. Flow cytometric measurements were performed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) with a 488 nm argon excitation laser. A total of 50,000 events were analyzed in each sample, using BD FACSDiVa 6 software (BD Biosciences) for data acquisition and analysis. Optical filters were set up such that PI fluorescence was measured at 670 LP nm and SYTO 9 fluorescence was

measured at 530/30 BP nm. A SYTO 9+/PI-gate was drawn to determine the percentage of non permeabilized cells in the control without peptide. The minimal permeabilization concentration (MPC) of peptides corresponds to the concentration leading to 90 % of permeabilization of *L. pneumophila*. (ii) The other half of the bacteria suspensions was diluted to 1/10, 1/100 or 1/1000 depending on the peptide and then spread on a BCYE agar plate using an automatic spiral plater (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley scientific Ltd). Plates were incubated 96 h at 37°C before colonies numeration using tables provided by the supplier. The results were expressed by the decrease in the *L. pneumophila* cultivability estimated at the maximum peptide concentration.

2.5 Hemolytic activity assays

Hemolytic activity of the peptides was determined by measuring the released hemoglobin from human erythrocytes as described previously [19]. 100 % hemolysis was measured by adding 0.1 % Triton X-100 to the reaction mixture instead of peptides solutions.

2.6 Preparation of phospholipids vesicles

Multi-lamellar vesicles (MLVs) with calcein entrapped were prepared with various ratios of PE di-C16:0, PE di-C16:1, PC di-C16:0, PC di-16:1, CL tetra-C14:0 and CL tetra-C18:1. The dried lipid mixture (10 mg) was hydrated in 100 μ L of 20 mM MOPS buffer (pH7.5) containing 0.01 mM EDTA, 0.02 % NaN₃ and 50 mM calcein as described by Pokorny *et al.* [20]. The suspension was subjected to five freeze-thaw cycles. Then, the calcein-entrapped vesicles were separated from the free calcein by gel filtration using a Sephadex-G25 column with the same buffer supplemented with 100 mM KCl. The fractions containing calcein-entrapped vesicles were pooled and diluted to 25 mM for the calcein efflux measurements.

2.7 Calcein leakage measurements

The leakage of calcein was measured with a FluoroCount™ (Perkin Elmer) which was coupled to a Halogen light source (Pakard). The excitation wavelength was 510 nm, and the

emission one was 460 nm. Various concentrations of peptides were added to 100 μ L of MLVs and the fluorescence intensity was measured each 20 seconds during 30 minutes. 100 % of calcein release was determined by the addition of 2 % (w/v) of Triton X-100.

The MLV lysis concentration (MLC) of peptides corresponds to the concentration leading to 90 % of release of calcein from model membranes (PC/PE/CL (30:40:30)) after 30 minutes.

3. Results

3.1 Design of peptides

The various peptide sequences were drawn after a fine observation of the helical wheel projection of warnericin RK (WRK) and PSM α (PSM). As shown in Figure 1, by reverting the sequences of warnericin RK or PSM α , similar figures were obtained for WRK and rPSM and also PSM and rWRK. However, the regular N and C termini aminoacids were conserved in the reversed sequences. Thus, by comparing the projections of regular peptides with those of reversed peptides, some of the substitutions appearing the most pertinent were chosen and involved glycine residues, exchanged with lysine or aspartic acid, and phenylalanine residues, exchanged with valine or isoleucine, in the cationic and non-cationic faces respectively (Figure 1).

So, two series of peptides were designed: the “WRK to rPSM family” and the “PSM to rWRK family”.

3.2 Effect of aminoacid substitutions on the biological activities

The peptides were assayed for anti-*Legionella* and hemolytic activities. The antibacterial activity was first determined by measuring the minimal inhibitory concentration (MIC) which corresponds to the capacity of a peptide to inhibit the growth of *L. pneumophila*. The minimal permeabilization concentration (MPC) of peptides was also evaluated. It is the concentration which induces the permeabilization of 90 % of the *Legionella*. Briefly, the percentage of permeabilized cells, corresponding to those stained with propidium iodide (IP), was measured using flow cytometry. In parallel, the same samples were assayed, by colony

forming units (CFU) counting, for the impact of the various peptides (at a concentration of 10 μ M) on the cultivability of *L. pneumophila* and was expressed as cultivability decrease but could be considered as a bactericidal activity.

The hemolytic activity was studied on human red blood cells and estimated as the peptide concentration leading to 10 % hemolysis.

Finally, combining the anti-*Legionella* and hemolytic activities, the selectivity, or therapeutic index, was estimated by the ratio 10% hemolysis / MIC. For a given MIC value, higher the selectivity is and more the concerned peptide is potentially interesting in Legionnaire's disease treatment. The results are presented in Table 1.

3.2.1 WRK to rPSM and PSM to rWRK families.

The reversed peptides WRK and rWRK displayed similar biological activities whereas, both the anti-*Legionella* and hemolytic activities of the rPSM peptide were decreased ~3-4 times as compared to PSM so that the selectivity was almost unchanged (Table 1).

The Lys/Gly aminoacid substitution at position 9 in WRK induced a significant decrease in all the activities and thus WRK_K9G looked like rPSM, whereas the Gly/Asp substitution in WRK_G20D was ineffective except a decrease in hemolysis. However, the double substituted peptide WRK_K9G-G20D was fully inactive.

Replacing the Phe residues by the aliphatic aminoacid Val at positions 14 or 19 of WRK was mostly ineffective but would decrease the hemolysis at a level similar to that of PSM. The Phe/Ile substitution in WRK_F15I was rather silent and thus the double substituted peptide WRK_F14V-F15I resembled WRK_F14V suggesting that the only Phe/Val substitution could explain the biological properties of WRK_F14V-F15I (Table 1).

By comparison to wild type peptide, substitution G14K in PSM enhanced anti-*Legionella* activity (MIC, MPC as well as cultivability decrease) but didn't change hemolytic activity. So, this peptide was as active as WRK or rWRK against *Legionella*, but similarly to PSM, displayed a low hemolytic activity. The Asp/Gly substitution at position 3 in PSM increased permeabilization, bactericidal and hemolytic activities. The double substituted peptide

PSM_D3G-G14K was as active as WRK and rWRK and even slightly more, for the inhibition of growth and permeabilization of *L. pneumophila*.

Replacing the Val residue by the aromatic Phe in PSM_V4F, significantly increased its membrane permeabilization and bactericidal activities and decreased its hemolytic activity. This result underlines the importance of the presence of the phenylalanine in position 4, which is outside the helix, for the anti-*Legionella* activity of the peptide. The same substitution, in position 9 (PSM_V9F), was poorly effective except a slight increase in hemolysis. On the opposite, changing the Ile residue for Phe at position 8 (PSM_I8F) significantly decreased all the tested activities except the MPC. Finally, the double variant PSM_I8F-V9F resembled the PSM_I8F peptide suggesting that Phe was more important at position 8 than at position 9 (Table 1).

3.2.2 Comparison of reciprocal aminoacid substitutions.

As shown in Table 1, the Lys substitution for Gly in position 9 decreased all the activities of the WRK_K9G peptide when compared to WRK and the reverse substitution, i.e. G14K, in PSM α , enhanced the activities except hemolysis which was rather unchanged. Changing Gly for Asp at the position 20 in WRK only affected negatively both the permeabilization and the hemolytic activities whereas the replacement of Asp by Gly resulting in PSM_D3G amplified all activities except the MIC. In some manner, the double substitution in WRK_K9G-G20D and PSM_D3G-G14K summarized the results observed with the unique substitutions. These results could indicate the implication of the WRK Lys residue in position 9 in the anti-*Legionella* activity and the Gly in position 20 in the hemolytic activity.

Examination of the replacement of Phe by the aliphatic Ile and Val, and the reciprocal, led to somewhat unclear conclusions. The MIC and MPC were partially increased for WRK_F19V but only MPC decreased for PSM_V4F, while bactericidal activity was unaffected for WRK_F19V but amplified for PSM_V4F. Hemolytic activity decreased for both peptides. The exchange Phe–Val in WRK_F14V affected both the permeabilization and hemolytic activities that decrease whereas the hemolysis power increased and the MIC slightly decreased for

PSM_V9F. The exchange Phe/Ile was rather without effect for WRK_F15I. On the contrary, the anti-*Legionella*, bactericidal and hemolysis activities were decreased for the reciprocal PSM_I8F. Finally, in the WRK_F14V-F15I, the double substitution was with minor effects except decreasing the hemolytic activity whereas in PSM_I8F-V9F, all the activities decreased except the permeabilization which was unaffected (Table 1). Finally, only the Phe residue in position 14, but not 15, seems to be implicated in the hemolytic activity of the WRK. Moreover, the Ile residue in position 8 is important for all the activities of the PSM.

3.3 Relationships between biological activities.

Only few relationships were detected between the studied activities, which were compared using the reversed values (1/MIC, 1/MPC, 1/10 % hemolysis) for graphical representations.

There is a linear relationship existing between the anti-*Legionella* and hemolysis activities but the anti-*Legionella* activity could reach a plateau, corresponding to $1/\text{MIC} = \sim 1 \mu\text{M}^{-1}$, for hemolytic activities above $0.1 \mu\text{M}^{-1}$ (not shown). If there was no correlation between the selectivity and the anti-*Legionella* activity, the selectivity would rapidly decrease as the hemolysis increased (not shown).

Looking at the relationships with the membrane permeabilization no correlation exists with hemolysis (not shown) but relations can be observed with either the anti-*Legionella* (Figure 2A) or bactericidal (Figure 2B) activities. In the former case, the activity rapidly increased with the membrane permeabilization to reach a plateau for values above $0.2 \mu\text{M}^{-1}$. A similar curve shape was observed with the bactericidal activity observed with $2 \mu\text{M}$ peptide (not shown). Moreover, it was interesting to observe that at $10 \mu\text{M}$ peptide, the decrease in cultivable *Legionella* was either below 1 log or above 2.5 log and the frontier was also the $0.2 \mu\text{M}^{-1}$ membrane permeabilization concentration. For anti-*Legionella* activity (Figure 2A), a similar curve shape was observed, with a plateau for values above $1 / \text{MPC} = 0.2 \mu\text{M}^{-1}$.

3.4 Relationships between biological activities and physicochemical properties of the peptides.

The $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ was calculated in order to estimate the interaction of each peptide with membrane and the more specific $\Delta G^{\circ}_{\text{oct}}$ which indicates the membrane insertion of the peptide into the lipid bilayer and $\Delta G^{\circ}_{\text{if}}$ which describes the binding to the interface were also determined (Table 2).

Except for the energy of transfer from the interface to the membrane core $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ (Figure 3) no clear relations were observed between $\Delta G^{\circ}_{\text{if}}$ or $\Delta G^{\circ}_{\text{oct}}$ and biological activities. Since most of the substitutions in the neutral or +2 charged peptides involved aminoacids localized in the non-cationic face of the peptides, only the $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ of the non-cationic face was used. As shown in Figure 3, the anti-*Legionella*, membrane permeabilization and hemolytic activities decreased as the free energy of transfer from the interface to the membrane core increased, but the correlation was very poor for the hemolysis activity of +2 charged peptides. Concerning the bactericidal activity, estimated at low peptide concentration (2 μM), a progressive or rapid decrease in activity was observed when $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ became more unfavorable in +2 charged or neutral peptides, respectively. At a higher concentration (10 μM), neutral peptides displayed a similar shape curve even if more accentuated, but the bactericidal activity of +2 charged peptides was independent of the $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ value (not shown).

3.5 Relationships between membrane composition and permeabilization ability of peptides.

3.5.1 Action of peptides on model membranes of *Legionella pneumophila*.

The three major phospholipids in the membrane of *L. pneumophila* are phosphatidylethanolamine (40%), phosphatidylcholine (30%), and cardiolipin (30%), and the two main fatty acids are C16:0 and C16:1 [21].

So, we decided to prepare multilamellar vesicles (MLVs) representing model membranes of *Legionella* composed with 40 % PE (di-C16:0/di-C16:1 (50:50)), 30 % of PC (di-C16:0/di-C16:1 (50:50)) and 30 % CL (tetra-C14:0/tetraC18:1 (50:50)).

The MLV lysis concentration (MLC), which corresponds to the concentration of peptide leading to 90 % of calcein release, as well as the kinetic of calcein leakage from MLVs were determined for the peptides and the results are presented in Table 1 and Figure 4 respectively. According to these results the peptides were separated in three classes. The group 1 contains the peptides PSM_V8F, WRK_K9G and rPSM, which were poorly permeabilizing, with a calcein released < 20 % (Figure 4A) and a high MLC > 5 μ M (Table 1). The peptides from the group 2, PSM_D3G-G14K, PSM_G14K and rWRK, induced a high permeabilization of MLVs (calcein release > 80%, Figure 4B) and were characterized by a MLC < 1 μ M (Table 1). The peptides with intermediates activities toward MLVs (20 % < calcein release < 80 % and 1 μ M < MLC < 5 μ M) were assembled in group 3 (Figure 4C and Table 1).

No clear relationships were determined between these activities on vesicles and those of the peptides toward *Legionella*. Without surprise, the group 1 peptides are the less active against the bacteria and the group 2 peptides are about the more antibacterial but some peptides of the group 3 displayed activities similar to these of the group 2 peptides, as an example biological activities of rWRK (group 2) WRK (group 3) are equivalent.

Interestingly, the MLCs of the « WRK to rPSM family » peptides are of the same order than their MPCs whereas for the « PSM to rPSM family » peptides MLC values are of the same range than MICs.

3.5.2 Impact of the lipid composition of the membrane on the peptides activities

In order to determine the relationships between the phospholipids composition of the membrane and the subsequent permeabilization ability of the peptides, MLVs were prepared with the following compositions of lipids: PC, CL, PG, PC/CL (50:50), PC/PE (42.8:57.2),

PE/CL (57.2:42.8). The permeabilization of these MLVs was assayed with 0.3, 1.6 and 3 μ M concentrations of each peptide. The Figures 5 and 6 represents the results obtained with WRK and are representatives of the results obtained with all the permeabilizing peptides, which are not shown.

Figure 5A corresponds to kinetic of the calcein release in presence of WRK at the peptide/lipid ratio of 1/8. In this case 100 % of the calcein was released whatever the lipid composition of the MLV. On the contrary, with a ratio 1/80 (Figure 5B) only the MLVs composed of PC were permeabilized. When an intermediate peptide/lipid ratio of 1/15 was used it appeared that the MLVs containing PC are permeabilized in higher amount than those without this phospholipid as illustrated by the results presented in Figure 6. However, the "all-PC" vesicles were more sensitive to the peptides than those containing a mixture (PC-CL in the case of Figure 6). This result suggests that PC rafts of sufficient size are required for the interaction of the peptide with the membrane.

4. Discussion

The fact that WRK and PSM displayed similar activities than their corresponding peptide of reversed sequence indicates that no cell receptors are involved in their recognition mechanism like it was related, for other peptides, to the observation that all-D-amino acid peptides showed the same activity as the natural all-L-amino acid peptides [22, 23]. Thus target cell specificity of WRK and PSM appears to be determined by the lipid bilayer itself.

Peptide-lipid bilayer interactions depend strongly on the polar cationic angle of an amphipathic α -helix [24, 25] and in general, the aggregate size of the translocating species might depend on its value since smaller polar angles should favor smaller aggregates whereas larger polar angles would require more peptides to form an aggregate able to sink into the membrane. So, since δ -lysine with a polar angle of 100° probably insert in the membrane bilayer as a trimer [26, 27], WRK and PSM would require the formation of aggregates of higher size for membrane translocation as their polar angle is about 140° (not

shown). The trimer δ -lysin organization with helices lying side by side in an antiparallel orientation with the hydrophobic faces in contact with the acyl chains of phospholipids and with maximal interactions between the charges on the peptide [27] would probably be transposable to the warnericin RK or PSM α aggregates. Indeed, upon careful observation of WRK and rWRK for example, potential intermolecular ion pairs in the central moiety of the helices can be predicted and expected to be of great consequence in peptide activity.

The Lys/Gly and Asp/Gly substitutions concerned the cationic face as shown on the helical wheel projection (Figure 1) of both WRK and PSM α . However the WRK structure revealed a well-defined α -helix only extending from residue 4 to residue 16 [12] thus suggesting that the Asp/Gly substitution in WRK_G20D and PSM_D3G could be irrelevant to a cationic face modification. Global charge (+1) of WRK_K9G, WRK_G20D, PSM_G14K and PSM_D3G peptides are identical but decreased or increased by one charge unit when compared to their respective parent peptide (+2 for WRK and 0 for PSM α). As these substitutions globally decreased biological activities of WRK derived peptides and on the opposite globally increased those of PSM α variants, the results could reflect a positive effect of the peptide charge corroborated by the enhanced changes in activities of the WRK_K9G-G20D and PSM_D3G-G14K peptides whose charge was decreased or increased by two charge unit. However, beside a charge effect, changes in 3D structure must be involved mainly because these substitutions concerned a glycine residue well known as tilting and/or breaking helical structures. Such an interference would affect the WRK_K9G and PSM_G14K peptide structures for which the substitution was localized in the central part of the sequence. For WRK_G20D and PSM_D3G, whose helix structures are not modified, flexibility of the peptide edge would be necessary for biological activities (Table 1).

The Ile/Phe substitution that is facing the cationic side of the helices, was rather ineffective in WRK_F15I but inhibited the hemolysis and the bactericidal activity in PSM_I8F whereas the Val/Phe substitutions, located in positions adjacent, at a distance of 1 or 2 residues to the cationic face, decreased the hemolysis activity of the WRK_F14V, WRK_F19V and

PSM_V4F peptides except for PSM_V9F. The inefficiency of the replacement of phenylalanine by isoleucine in WRK was supported by the fact that WRK_F14V-F15I resembled WRK_F14V (Table 1).

Finally, since $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ provides a tool for predicting the mechanism of cell-penetrating peptides [28, 29], we also calculated this Gibbs energy of insertion from the surface to lipid core (Table 3). It was proposed that if the Gibbs energy of insertion into the bilayer core $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ is ≤ 20 kcal/mol, the peptides, like δ -Lysin, Tp10, mastoparans, and melittin, are predicted to follow a graded mechanism. They should translocate across the membrane, dissipating the bilayer mass imbalance due to peptide binding, and cause graded efflux in the process. On the other hand, if $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}} \gg 20$ kcal/mol, the peptides, like cecropin A and magainin 2, cannot translocate and cause all-or-none dye release by accumulation on the membrane surface until a pore forms leading to the efflux of the entire vesicle contents. Simultaneously with pore formation, which is probably of a lipidic toroidal type, peptide redistribution across the membrane may also occur. For $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ approximately between 20 and 25 kcal/mol, either mechanism may prevail [28]. So, limiting comparison to our peptides of known 3D structure, PSM α , $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}} = 20.58$ kcal/mol, could cause graded dye efflux whereas warnericin RK, $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}} = 22.48$ kcal/mol, could induce graded and also all-or-none dye efflux upon interaction on artificial membrane.

We have also calculated the Gibbs free energy of binding to the membrane with the program MPEX (Table 3). Since the experimental Gibbs energies of binding to the interface are in excellent agreement with those calculated from the Wimley-White interfacial scale [29, 30], $\Delta G^{\circ}_{\text{if}}$ could be a good estimate of the binding energy of the peptides to the POPC interface. Peptides of the “WRK to rPSM family” would bind better to the membrane interface than peptides of the “PSM to rWRK family” by a Gibbs free energy difference $\Delta\Delta G^{\circ}_{\text{if}} = \sim 3.8$ kcal/mol. As the Gibbs energy of insertion into the bilayer, estimated using Wimley-White octanol hydrophobicity scale, is significantly related to dye release rate [29], we used $\Delta G^{\circ}_{\text{oct}}$ to estimate the efficiency of our peptides on the release of dye from POPC vesicles. Thus as

the energy of insertion became more unfavorable, dye release became slower, the efficiency of PSM peptides would be ~20 times lower than WRK peptides series by a Gibbs free energy difference $\Delta\Delta G^{\circ}_{\text{oct}} = \sim +1.7$ kcal/mol. So, as the energy of binding $\Delta G^{\circ}_{\text{if}}$ and the energy of insertion $\Delta G^{\circ}_{\text{oct}}$ into an artificial bilayer are important factors in dye release [29], WRK peptides would be more active than PSM peptides because they would bind better to the surface and insert easier into the bilayer of a synthetic membrane. This must be a true assumption at least for WRK and PSM α of known 3D structure. Though it is difficult to extrapolate this proposition to natural *Legionella* and human membranes containing only 30-45 % [31, 32] and 30 % phosphatidylcholine (PC), [33] respectively of total phospholipids, it is in good agreement with our results showing that warnericin RK was more permeabilizing, more bactericidal, more growth inhibiting (MIC) against *Legionella* and more hemolytic than PSM α .

Finally, the experiments realized on calcein-loaded MLVs underlined the importance of PC for the permeabilization of the membrane by the peptides. Phosphatidylcholine is a major essential component of eukaryote membranes, but only a fraction of bacterial species synthesize this phospholipid [34]. *L. pneumophila* membranes content between 30 to 45 % of PC whereas the membranes of another Gam-negative bacteria *E. coli* are completely devoid of this phospholipid [35]. Thus, presence of PC in the membranes seems to be required for the activity of WRK since it is active against red cells and *L. pneumophila* but not towards *E. coli*.

5. Conclusion

The present study succeeded in determining specific amino acid residues in the sequence of WRK and PSM which are critical for the activities, anti-*Legionella* and hemolytic, of these peptides. It has to be noticed that the 14th position in both sequences appeared crucial for the hemolytic activity. Indeed the variants WRK_F14V and PSM_G14K appeared to be of particular interest in therapeutic applications because of their high therapeutic index (10.1

and 15.9 respectively) and their bactericidal effect. Moreover, the implication of PC in the lysis activity of the peptides was shown. The mechanisms of action of these peptides and particularly WRK and PSM have to be analyzed eventually via the study of the interaction of these peptides and membrane lipids using solid NMR spectroscopy.

Acknowledgements

A Marchand was supported by a grant from the French Minister of Research. We thank Dr Thierry Jouenne who provided the first synthetic peptides used in our study.

References

- [1] B.S. Fields, R.F. Benson, R.E. Besser, Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical microbiology reviews* 15 (2002) 506-526.
- [2] M. Molmeret, D.M. Bitar, L. Han, Y.A. Kwaik, Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila, *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6 (2004) 129-139.
- [3] P. Borella, E. Guerrieri, I. Marchesi, M. Bondi, P. Messi, Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives, *Biotechnology annual review* 11 (2005) 355-380.
- [4] V. Thomas, T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J.F. Loret, Y. Levi, Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence, *J Appl Microbiol* 97 (2004) 950-963.
- [5] A. Marchand, J. Verdon, C. Lacombe, S. Crapart, Y. Hechard, J.M. Berjeaud, Anti-Legionella activity of staphylococcal hemolytic peptides, *Peptides* 32 (2011) 845-851.
- [6] M.M. Dinges, P.M. Orwin, P.M. Schlievert, Exotoxins of Staphylococcus aureus, *Clin Microbiol Rev* 13 (2000) 16-34, table of contents.
- [7] J. Verdon, N. Girardin, C. Lacombe, J.M. Berjeaud, Y. Hechard, delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide, *Peptides* 30 (2009) 817-823.
- [8] Y. Hechard, S. Ferraz, E. Bruneteau, M. Steinert, J.M. Berjeaud, Isolation and characterization of a Staphylococcus warneri strain producing an anti-Legionella peptide, *FEMS microbiology letters* 252 (2005) 19-23.
- [9] C. Mehlin, C.M. Headley, S.J. Klebanoff, An inflammatory polypeptide complex from Staphylococcus epidermidis: isolation and characterization, *The Journal of experimental medicine* 189 (1999) 907-918.
- [10] C. Vuong, M. Otto, Staphylococcus epidermidis infections, *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4 (2002) 481-489.
- [11] Y. Yao, D.E. Sturdevant, M. Otto, Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms, *The Journal of infectious diseases* 191 (2005) 289-298.
- [12] J. Verdon, M. Falge, E. Maier, H. Bruhn, M. Steinert, C. Faber, R. Benz, Y. Hechard, Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-Legionella peptide, *Biophysical journal* 97 (2009) 1933-1940.
- [13] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nature reviews* 3 (2005) 238-250.

- [14] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacological reviews* 55 (2003) 27-55.
- [15] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation, *Biochemistry* 35 (1996) 11361-11368.
- [16] K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Fujii, K. Miyajima, Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2, *Biochemistry* 34 (1995) 3423-3429.
- [17] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, Y. Shai, Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes, *Biochemistry* 31 (1992) 12416-12423.
- [18] B. Bechinger, K. Lohner, Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochimica et biophysica acta* 1758 (2006) 1529-1539.
- [19] J. Verdon, J.M. Berjeaud, C. Lacombe, Y. Hechard, Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysine I from *Staphylococcus warneri*, *Peptides* 29 (2008) 978-984.
- [20] A. Pokorny, P.F. Almeida, Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysine: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides, *Biochemistry* 44 (2005) 9538-9544.
- [21] J. Verdon, J. Labanowski, T. Sahr, T. Ferreira, C. Lacombe, C. Buchrieser, J.M. Berjeaud, Y. Hechard, Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide, *Biochimica et biophysica acta* 1808 (2011) 1146-1153.
- [22] R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea, I. Shalit, M. Fridkin, All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance, *FEBS letters* 274 (1990) 151-155.
- [23] D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, R.B. Merrifield, All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990) 4761-4765.
- [24] M. Dathe, J. Meyer, M. Beyermann, B. Maul, C. Hoischen, M. Bienert, General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides, *Biochimica et biophysica acta* 1558 (2002) 171-186.
- [25] N. Uematsu, K. Matsuzaki, Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study, *Biophysical journal* 79 (2000) 2075-2083.
- [26] A. Pokorny, P.F. Almeida, Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides, *Biochemistry* 43 (2004) 8846-8857.
- [27] A. Pokorny, T.H. Birkbeck, P.F. Almeida, Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles, *Biochemistry* 41 (2002) 11044-11056.
- [28] P.F. Almeida, A. Pokorny, Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics, *Biochemistry* 48 (2009) 8083-8093.
- [29] A.N. McKeown, J.L. Naro, L.J. Huskins, P.F. Almeida, A thermodynamic approach to the mechanism of cell-penetrating peptides in model membranes, *Biochemistry* 50 (2011) 654-662.
- [30] L.E. Yandek, A. Pokorny, P.F. Almeida, Wasp mastoparans follow the same mechanism as the cell-penetrating peptide transportan 10, *Biochemistry* 48 (2009) 7342-7351.
- [31] G.M. Conover, F. Martinez-Morales, M.I. Heidtman, Z.Q. Luo, M. Tang, C. Chen, O. Geiger, R.R. Isberg, Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants, *Cellular microbiology* 10 (2008) 514-528.
- [32] M.S. Hindahl, B.H. Iglewski, Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane, *Journal of bacteriology* 159 (1984) 107-113.
- [33] P. Maturu, D.R. Vaddi, P. Pannuru, V. Nallanchakravarthula, Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na⁺/K⁺ -ATPase activity in chronic alcoholics, *Molecular and cellular biochemistry* 339 (2010) 35-42.

- [34] P.J. Wilderman, A.I. Vasil, W.E. Martin, R.C. Murphy, M.L. Vasil, *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway, *Journal of bacteriology* 184 (2002) 4792-4799.
- [35] A.J. De Siervo, Alterations in the phospholipid composition of *Escherichia coli* B during growth at different temperatures, *Journal of bacteriology* 100 (1969) 1342-1349.
- [36] D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *Journal of molecular biology* 179 (1984) 125-142.
- [37] W.C. Wimley, S.H. White, Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces, *Nature structural biology* 3 (1996) 842-848.
- [38] C. Snider, S. Jayasinghe, K. Hristova, S.H. White, MPEx: a tool for exploring membrane proteins, *Protein Sci* 18 (2009) 2624-2628.

Figure legends

Figure 1. Sequence alignment of the synthetic peptides and helical wheel projection

(A) Substituted residues are blackened.

(B) It is assumed that the whole peptide sequences were in an ideal helical structure. The hydrophobicity of each helix position was calculated using the Eisenberg normalized consensus scale of hydrophobicity [36]. Polar (■) and non-polar (□) positions.

Figure 2. Relationship between biological activities

Relationship between the permeabilization activity and (A) the anti-*Legionella* activity or (B) the bactericidal activity.

Anti-*Legionella* activity and membrane permeabilization are expressed in μM^{-1} .

Figure 3. Relationships between the Gibbs energy $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ of the non-cationic peptide face and the biological activities

The free energy of binding $\Delta G^{\circ}_{\text{oct-if}}$ in kcal/mol was calculated using the octanol and interfacial hydrophobicity scales of Wimley [37]. (▼) peptides charged +2 and (▽) neutral peptides. PSM_D3G-G14K (1) and WRK_K9G-G20D (2) are included though the substitutions affect the cationic face of the peptides.

Anti-*Legionella* activity and membrane permeabilization are expressed in μM^{-1} .

Figure 4. Calcein release kinetics from *Legionella* model membranes

Percentage of calcein released from model membrane MLVs induced by (A) ⁽¹⁾ PSM_I8F, ⁽²⁾ WRK_K9G and ⁽³⁾ rPSM; (B) ⁽¹⁾ rWRK, ⁽²⁾ PSM_D3G-G14K, ⁽³⁾ PSM_G14K and ⁽⁴⁾ WRK_F15I and (C) ⁽¹⁾ PSM_V9F, ⁽²⁾ PSM, ⁽³⁾ PSM_I8F-V9F, ⁽⁴⁾ WRK, ⁽⁵⁾ WRK_V14F, ⁽⁶⁾ PSM_V4F, ⁽⁷⁾ WRK_F14V-F15I, ⁽⁸⁾ WRK_F19V and ⁽⁹⁾ WRK_G20D.

In all experiments, the peptide concentration was 1.6 μM and the lipid concentration was 25 μM . The curves were normalized by the Triton X-100 release levels

Figure 5. Kinetics of calcein release from MLVs composed with different lipids mixtures

Percentage of calcein released from MLVs composed with: model membranes (PC/PE/CL (30:40:30)), PC, CL, PG, PC/CL (50:50), PC/PE (42.8:57.2) or PE/CL (57.2:42.8).

The curves were obtained with a concentration of WRK equal to (A) 3 μM and (B) 0.3 μM .

In all experiments, the lipid concentration was 25 μM , and the curves were normalized by the Triton X-100 release levels.

Figure 6. Effect of phosphatidylcholine of permeabilization of peptides

Percentage of calcein released from MLVs composed with (1) PC; (2) PC/CL (50:50) and (3) CL.

In all experiments, the peptide concentration (rWRK in this case) was 1.6 μM and the lipid concentration was 25 μM .

The curves were normalized by the Triton X-100 release levels.

Table 1. Activities of peptides towards *L. pneumophila* and red blood cells

Peptide	Peptide charge	MIC μM	90% MPC μM	Bacterial cultivability decrease \log^a	10% Hemolysis μM	Selectivity (therapeutic index) 10% hemolysis/MIC	90% MLC μM	
WRK to rPSM	WRK	2	1.22	3.05	2.78	2.28	1.42	
	WRK_K9G	1	3.70	0.88	> 20	> 5.4	5.34	
	WRK_F19V	2	2.08	3.24	11.1	5.33	2.94	
	WRK_G20D	1	1.19	3.85	2.93	9.09	2.58	
	WRK_K9G-G20D	0	19.6	> 20	0.00	> 20	> 1.02	ND
	WRK_F14V	2	1.23	2.49	3.43	12.5	10.1	2.15
	WRK_F15I	2	1.23	1.51	3.63	2.63	2.13	1.54
	WRK_F14V-F15I	2	1.26	2.70	2.87	8.33	6.61	2.50
	rPSM	0	5.08	11.1	0.68	20	3.94	>10
PSM to rWRK	PSM	0	1.27	0.67	7.14	5.62	2.54	
	PSM_G14K	1	0.62	6.25	2.63	9.88	15.9	0.77
	PSM_V4F	0	1.25	5.26	3.05	10	8.00	2.91
	PSM_D3G	1	1.30	5.26	2.92	3.70	2.85	0.40
	PSM_D3G-G14K	2	0.94	1.41	3.08	3.125	3.32	0.52
	PSM_V9F	0	1.85	12.5	0.57	4.76	2.57	1.52
	PSM_I8F	0	5.01	11.1	0.15	> 20	> 3.99	6.04
	PSM_I8F-V9F	0	2.44	12.5	0.21	> 20	> 8.19	2.41
	rWRK	2	1.22	2.13	3.33	4	3.28	0.85

AoN: all or nothing. Pro: progressive. ND: not determined.

All the values correspond to the mean of three independent assays.

^a In our experimental conditions the maximum value was 6.0 (no CFU).

Table 2. Gibbs free energy ΔG° of peptide partitioning from water to a artificial membrane

	Interface ΔG°_{if} ^a	Octanol ΔG°_{oct} ^a	Oct-Inter ΔG°_{oct-if} ^a	Interface ΔG°_{if} ^b	Octanol ΔG°_{oct} ^b	Oct-Inter ΔG°_{oct-if} ^b
	Whole peptide			Non-Cationic face		
	Peptide charge +2					
WRK	-4.14	18.34	22.48	-4.97	-0.41	4.56
rWRK	-4.14	18.34	22.48	-4.97	-0.41	4.56
WRK_F19V	-2.94	19.59	22.53	-3.77	0.84	4.61
WRK_F14V	-2.94	19.59	22.53	-3.77	0.84	4.61
WRK_F15I	-3.32	18.93	22.25	-4.15	0.18	4.33
WRK_F14V-F15I	-2.12	20.18	22.30	-2.95	1.43	4.38
PSM_D3G-G14K	0.84	20.82	19.98	-1.34	2.73	4.07
	Peptide charge +1					
WRK_K9G	-5.12	16.69	21.81	-4.97	-0.41	4.56
WRK_G20D	-2.92	20.83	23.75	-4.97	-0.41	4.56
PSM_G14K	2.06	23.31	21.25	-1.34	2.73	4.07
PSM_D3G	-0.14	19.17	19.31	-1.34	2.73	4.07
	Peptide charge 0					
PSM	1.08	21.66	20.58	-1.34	2.73	4.07
rPSM	1.08	21.66	20.58	-1.34	2.73	4.07
PSM_V4F	-0.12	20.41	20.53	-2.54	1.48	4.02
PSM_V9F	-0.12	20.41	20.53	-2.54	1.48	4.02
PSM_I8F	0.26	21.07	20.81	-2.16	2.14	4.30
PSM_I8F-V9F	-0.94	19.82	20.76	-3.36	0.89	4.25
WRK_K9G-G20D	-3.9	19.18	23.08	-4.97	-0.41	4.56

The free energy of binding ΔG°_{if} and ΔG°_{oct} in kcal/mol were calculated using the interfacial and octanol hydrophobicity scales of Wimley [37]. ΔG°_{oct-if} is the Gibbs energy of insertion from the interface into the core of the membrane. $\Delta G^\circ_{oct-if} = \Delta G^\circ_{oct} - \Delta G^\circ_{if}$.

^a Values were estimated using MPEX [38] assuming ionized termini and a percent helicity for the warnericin RK and PSM α peptides of 59% [12] and 55% (unpublished circular dichroism result) respectively. These percent helicities were applied to their respective derivatives. ΔG°_{if} correspond to an estimate of the free energy of partitioning between water and POPC bilayer interface. The partitioning free energy is being more favorable by 0.4 kcal/mol per residue in helix. The Gibbs energy of transfer of a peptide from water to octanol ΔG°_{oct} is approximately not dependent of the folding state.

^b excepted warnericin RK, 3D structure of the peptides were unknown, so the Gibbs energy were estimated with charged termini since N-ter and C-ter aminoacids are constitutive of the non-cationic face.

A

WRK to rPSM family				PSM to rWRK family			
WRK	MQFITDLIKK	AVDFFKGLFG	NK	PSM	MADVIAKIVE	IVKGLIDQFT	QK
WRK_K9G	MQFITDLIGK	AVDFFKGLFG	NK	PSM_G14K	MADVIAKIVE	IVKKLIDQFT	QK
WRK_F19V	MQFITDLIKK	AVDFFKGLVG	NK	PSM_V4F	MADFIKIVE	IVKGLIDQFT	QK
WRK_G20D	MQFITDLIKK	AVDFFKGLFD	NK	PSM_D3G	MAGVIAKIVE	IVKGLIDQFT	QK
WRK_K9G-G20D	MQFITDLIGK	AVDFFKGLFD	NK	PSM_D3G-G14K	MAGVIAKIVE	IVKKLIDQFT	QK
WRK_F14V	MQFITDLIKK	AVDVFVKGLFG	NK	PSM_V9F	MADVIAKIVE	IVKGLIDQFT	QK
WRK_F15I	MQFITDLIKK	AVDFIKGLFG	NK	PSM_I8F	MADVIAKIVE	IVKGLIDQFT	QK
WRK_F14V-F15I	MQFITDLIKK	AVDVIKGLFG	NK	PSM_I8F-V9F	MADVIAKIVE	IVKGLIDQFT	QK
rPSM	MQTFQDILGK	VIEVIKAIVD	AK	rWRK	MNGFLGKFFD	VAKKILDTIF	QK

B

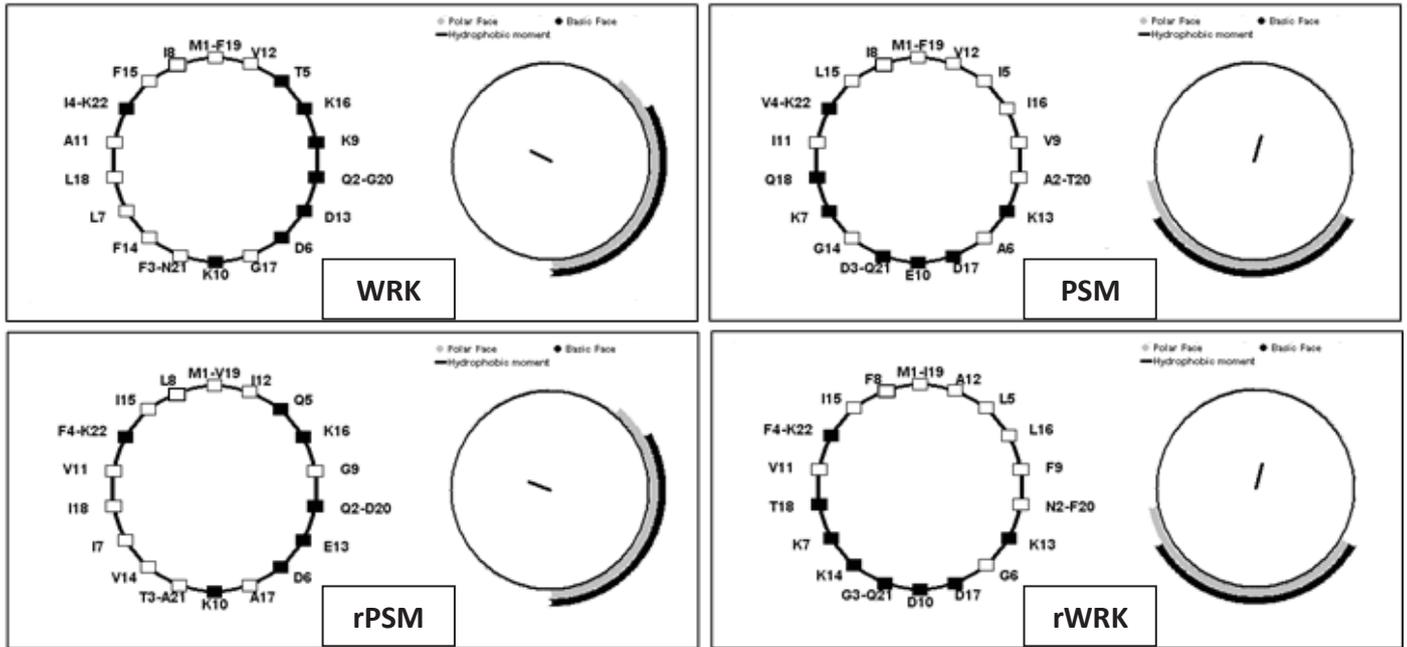


Figure 1.

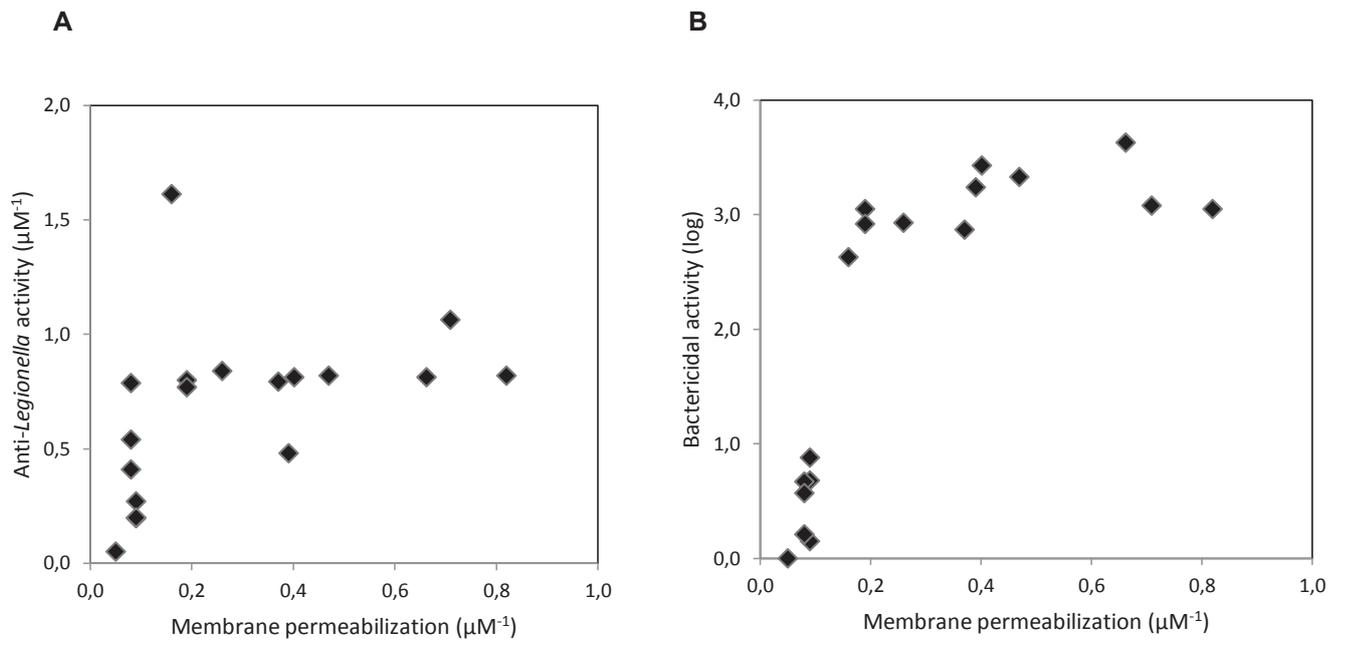


Figure 2.

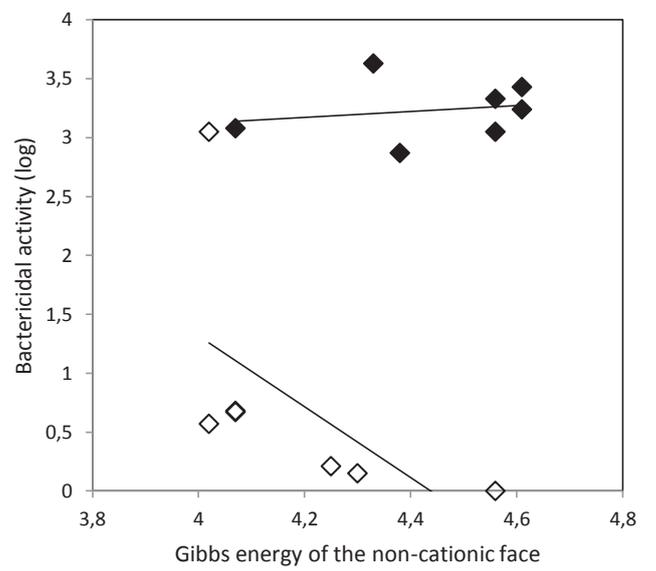
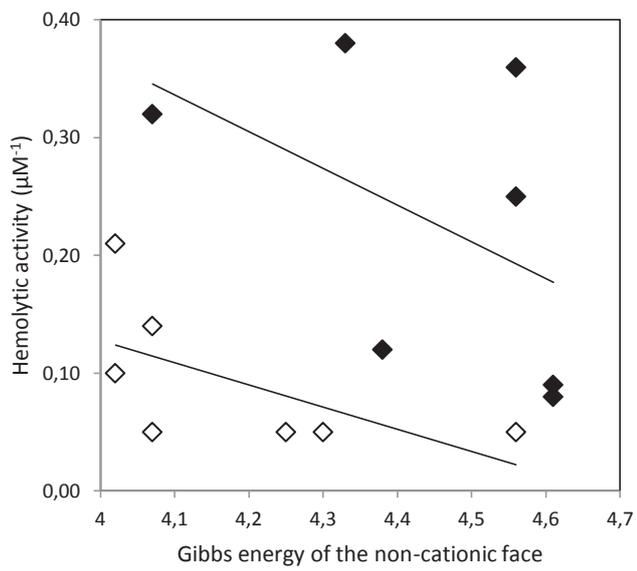
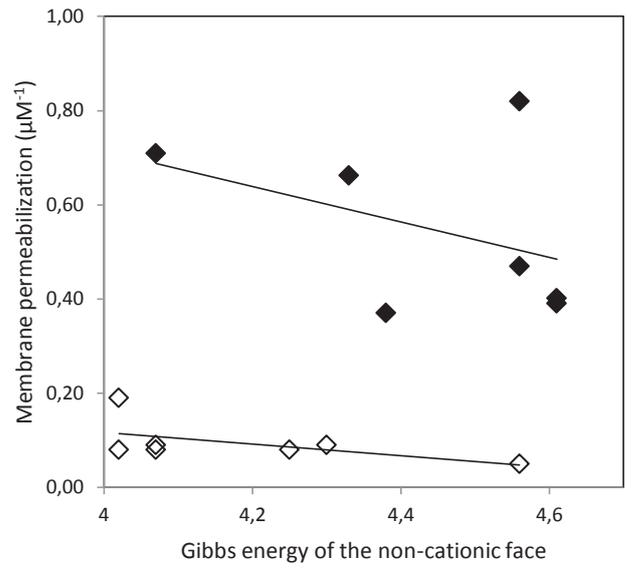
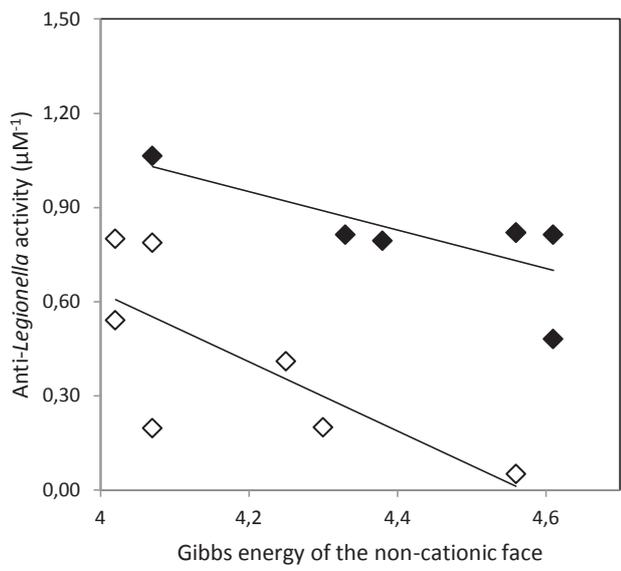


Figure 3.

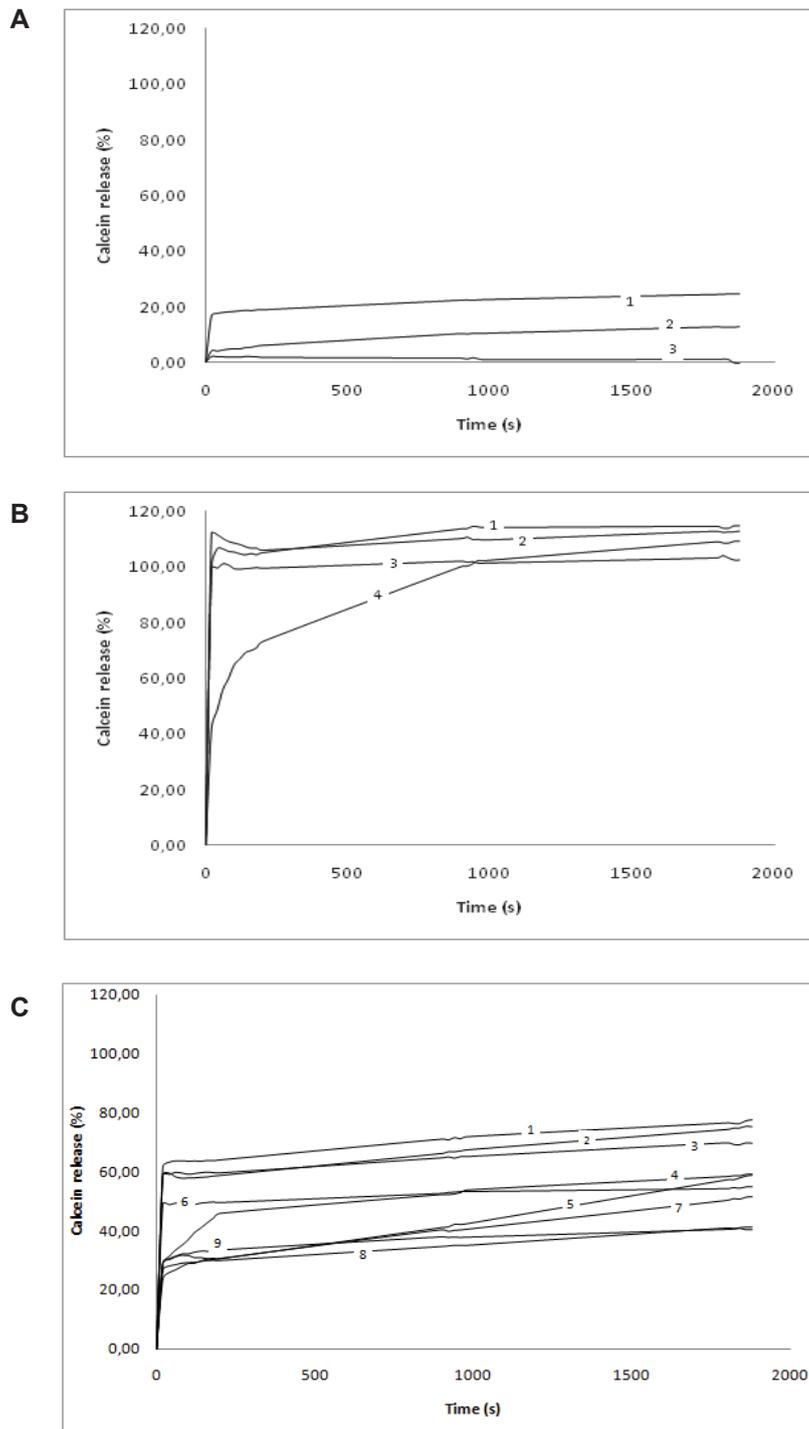


Figure 4.

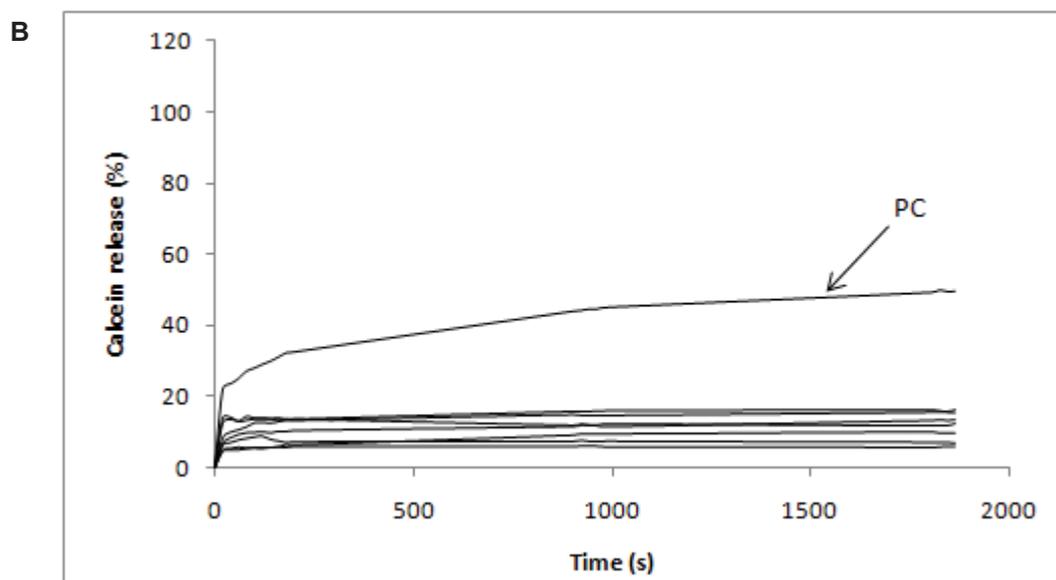
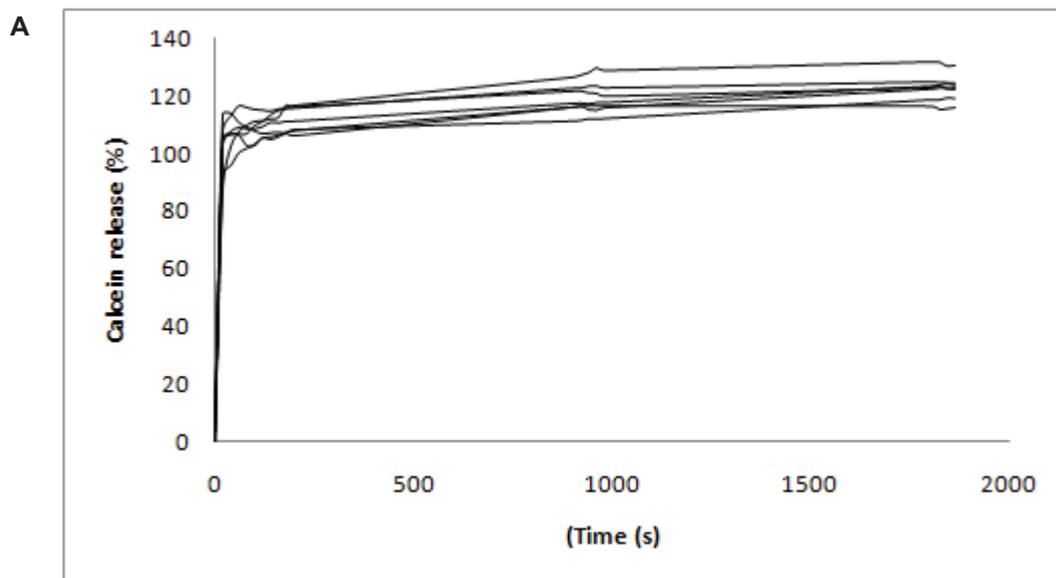


Figure 5.

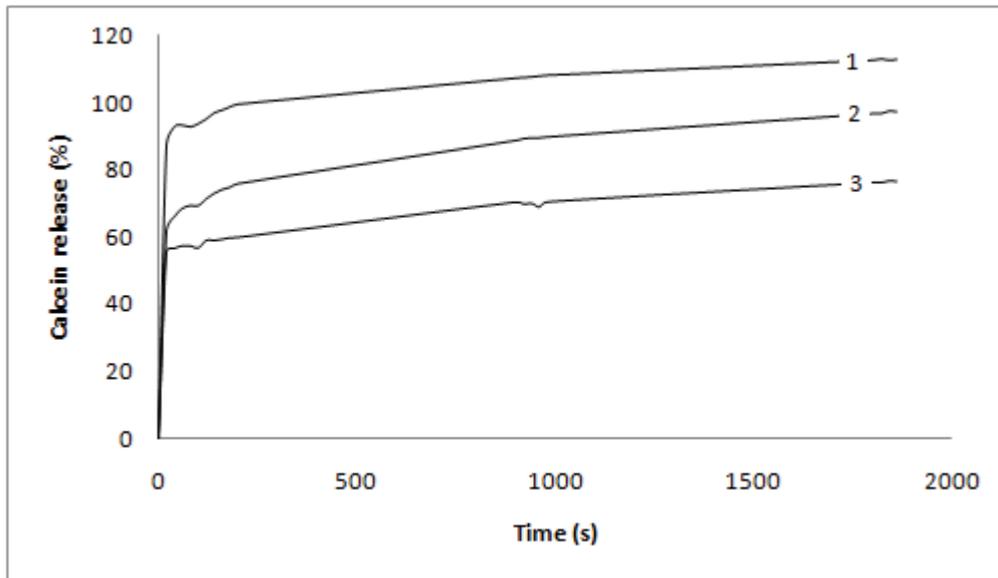


Figure 6.

B. Résultats complémentaires

1. Rôle de la lysine chez la PSM α

Dans la **publication 2**, deux familles de peptides ont été présentées. Cependant, une troisième a été réalisée. Il s'agit de la « PSM-K to PSM-R family ». Celle-ci a été dessinée suite à l'étude des séquences de l'ensemble des peptides anti-*Legionella* produits par les *Staphylococcus* dans lesquels l'arginine n'est jamais retrouvée (**Publication 1**), alors qu'elle représente 5,66 % des séquences des peptides antimicrobiens en général (Wang & Wang, 2004). Dans cette troisième famille de peptides, les lysines de la PSM α ont donc été remplacées par des arginines, selon toutes les combinaisons possibles (**Figure 25**), afin de déterminer si la présence de cette dernière peut modifier les activités du peptide.

PSM-K to PSM-R	
PSM	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQK
PSM_22R	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQR
PSM_13R	MADVIAKIVEIVRGLIDQFTQK
PSM_7R	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQR
PSM_13R-22R	MADVIAKIVEIVRGLIDQFTQR
PSM_7R-22R	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQR
PSM_7R-13R	MADVIAKIVEIVRGLIDQFTQK
PSM_7R-13R-22R	MADVIAKIVEIVRGLIDQFTQR

Figure 25. Alignement des séquences des peptides synthétiques de la famille « PSM-K to PSM-R ».

Les résidus substitués sont surlignés en noir.

Tout comme dans la **publication 2**, les activités anti-*Legionella* et hémolytiques, ainsi que la capacité des peptides à perméabiliser des membranes modèles ont été déterminées (**Tableau 16**).

Tableau 16. Activités des peptides « PSM-K to PSM-R » envers *L. pneumophila* Lens, les érythrocytes et des membranes modèles.

Peptide	CMI	90% CMP	Diminution de la cultivabilité	10 % hémolyse	Index thérapeutique	90 % CLM
PSM-K to PSM-R	μM	μM	\log^a	μM	10% hémolyse/CMI	μM
PSM	1,27	> 10	0,67	7,14	5,62	2,54
PSM_22R	1,25	> 10	0,82	> 20	> 16,0	2,48
PSM_13R	5,02	> 10	0,34	> 20	> 3,98	6,43
PSM_7R	10,05	> 10	0,34	> 20	> 1,99	ND
PSM_13R-22R	2,48	> 10	0,51	12,36	4,98	3,30
PSM_7R-22R	1,24	> 10	0,38	10,04	8,10	2,14
PSM_7R-13R	9,94	> 10	0,40	> 20	> 2,01	6,26
PSM_7R-13R-22R	1,23	> 10	0,38	9,20	7,48	4,87

^a Dans nos conditions expérimentales, la valeur maximale était de 6 log (pas de colonies).

ND : Non déterminé

Toutes les valeurs correspondent à trois expériences indépendantes.

Comme décrit pour la « PSM to rWRK family », les valeurs de 90 % CLM obtenues sont proches de celles de la CMI. Les peptides de la famille « PSM-K to PSM-R » semblent donc agir comme la PSM.

De plus, d'une manière générale, lorsque le remplacement d'une ou plusieurs lysines par des arginines a un effet, c'est plutôt dans le sens d'une diminution de toutes les activités. Toutefois, la substitution en position 22 semble avoir un effet positif sur l'activité anti-*Legionella*. En effet, la PSM_22R a non seulement la même CMI que la PSM α , contrairement aux PSM_7R et PSM_13R, dont la CMI augmente, mais en plus, comparée à la PSM α , elle entraîne une diminution de la cultivabilité de *L. pneumophila* ainsi qu'une diminution de l'activité hémolytique. De plus, lors des double ou triple substitutions, elle suffit à rétablir l'activité anti-*Legionella*. Par exemple, la PSM_13R a une CMI de 5,02 μM et diminue la cultivabilité de *L. pneumophila* de 0,34 log alors que la PSM_13R-22R a une CMI de 2,48 μM et diminue la cultivabilité de 0,51 log.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'hypothèse suivante.

L'arginine est plus électropositive que la lysine car son point isoélectrique est supérieur. Ainsi, les interactions électrostatiques vont être plus fortes entre les membranes procaryotes chargées négativement et l'arginine, qu'avec la lysine.

Lorsqu'une lysine est substituée par une arginine en position 7 ou 13, c'est-à-dire au sein de l'hélice, le peptide aurait tendance à se lier plus fortement à la membrane de façon parallèle à celle-ci, ce qui pourrait rendre plus difficile l'insertion du peptide dans la bicouche lipidiques et ainsi diminuer ainsi l'activité anti-*Legionella*.

Mais quand une arginine est ajoutée à l'extrémité du peptide (en position 22), l'interaction de cet acide aminé avec la membrane permettrait de faire légèrement plonger le peptide dans la membrane ce qui faciliterait son insertion et réaugmenterait l'activité anti-*Legionella* (**Figure 25**).

Ainsi, la perte d'activité anti-*Legionella* observée avec les substitutions en position 7 ou 13 serait compensée par celle en position 22.

Pour les membranes eucaryotes, non chargées, ce sont les interactions hydrophobes, et non plus électrostatiques qui entrent en jeu dans l'interaction initiale du peptide à la membrane. La lysine est plus hydrophobe que l'arginine donc la substitution de la lysine par l'arginine, où qu'elle soit située, peut diminuer l'interaction avec ces membranes et donc diminuer l'activité hémolytique.

Cette hypothèse pourrait également expliquer les observations réalisées pour les peptides qui sont plus actifs contre *Legionella* lorsque leur méthionine en position N-terminale est formylée (**Publication 1**). En effet, le groupement formyl bloque la charge positive de la méthionine en se liant à son atome d'azote, la partie N-terminale du peptide devenant ainsi moins électropositive. La partie C-terminale du peptide (lysine), plus électropositive, pourrait donc interagir plus fortement avec la membrane, chargée négativement, faisant plonger le peptide dans celle-ci (**Figure 26**).

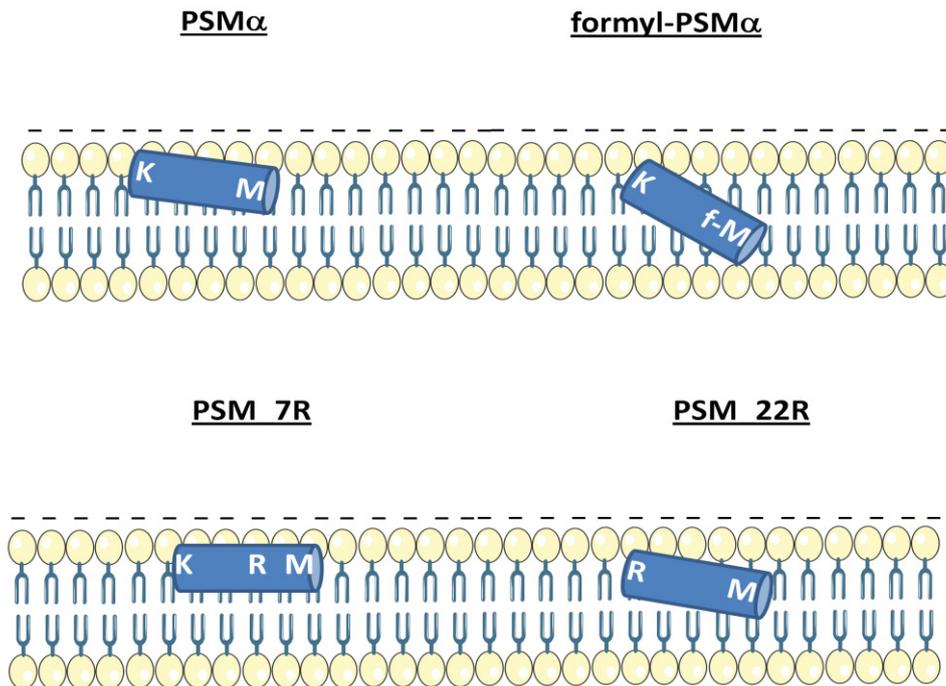


Figure 26. Représentation schématique de l'insertion des peptides PSM α , f-PSM α , PSM_7R et PSM_22R dans les membranes de *Legionella*.

Les peptides (cylindres bleus), chargés positivement, se lient aux membranes bactériennes, négatives, par des interactions électrostatiques. Les peptides vont plus ou moins plonger au sein des membranes en fonction de la différence de charge de chacune de leurs extrémités.

2. Spectre d'activité

Lors de la caractérisation de la warnéricine RK, Verdon *et al.* (Verdon *et al.*, 2008) a réalisé un spectre d'activité de ce peptide contre de nombreuses souches à Gram positif et négatif.

Nous avons voulu comparer ce spectre à celui de la PSM α . Les activités de la PSM-G14K, et de la PSM-22R, deux peptides intéressants en termes d'activité de notre étude, ont également été déterminées. Les résultats sont présentés dans le **tableau 17**.

Tableau 17. Spectre d'activité des peptides WRK, PSM α , PSM-G14K, et PSM-22R.

	Sensibilité à			
	WRK	PSM α	PSM-G14K	PSM-22R
Gram-positive bacteria				
<i>Bacillus megaterium</i> F04	+	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i> 583	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2850	-	-	-	-
<i>Staphylococcus chromogenes</i> AM1	-	-	-	-
<i>Staphylococcus cohnii</i> 898	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 567	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 2259	-	-	-	-
<i>Staphylococcus hominis</i> 373	-	-	-	-
<i>Staphylococcus lentus</i> 982	-	-	-	-
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> 967	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 715	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> 447	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> RK	-	-	-	-
Gram-negative bacteria				
<i>Enterobacter cloacae</i> D03	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> MG1655	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0502083	-	-	-	-
<i>Legionella bozemanii</i> ATCC 33217	+	+	+	+
<i>Legionella dumofii</i> ATCC 33279	+	+	+	+
<i>Legionella feeleeii</i> ATCC 35072	+	+	+	+
<i>Legionella</i> like bacteria (LLAP10)	+	+	+	+
<i>Legionella longbeachae</i> ATCC 33484	+	+	+	+
<i>Legionella micdadei</i> ATCC 33218	+	+	+	+
<i>Legionella oakridgensis</i> ATCC 33761	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> Corby (sg1)	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> Lens (sg1)	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> Paris (sg1)	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33155 (sg3)	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33216 (sg5)	+	+	+	+

	Sensibilité à			
	WRK	PSM α	PSM-G14K	PSM-22R
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33215 (sg6)	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ1128	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 910704	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-

95 μ L de suspension bactérienne (10^6 bactéries/mL) ont été mis en présence de 5 μ L de solutions de peptides (20 μ M), puis incubées 24 ou 96 heures à 37 °C.

La sensibilité d'une souche correspond à une totale inhibition de celle-ci en présence de peptide.

Le spectre d'activité de la WRK a été refait, et les résultats sont identiques à ceux de la publication (Verdon 2008).

Tout comme la warnéricine RK, les trois PSM ont un spectre d'activité restreint au genre *Legionella*. En effet, toutes les bactéries à Gram positif, ainsi que toutes celles à Gram négatif n'appartenant pas au genre *Legionella*, sont insensibles aux peptides testés. Au contraire, toutes les *Legionella* testées sont sensibles.

La seule différence observable avec les résultats de la warnéricine RK est que ce dernier est actif contre *Bacillus megaterium* alors que les PSM testées ici ne le sont pas. Ceci pourrait être lié à la différence de mode d'action entre la PSM et la WRK. La capacité de perméabilisation des membranes par les PSM, qui est plus faible que celle de la warnéricine RK, pourrait également être une explication à ce phénomène.

3. Résultats préliminaires : capacité des peptides à perméabiliser différents types de liposomes.

Dans la **publication 2**, la capacité des peptides à perméabiliser des membranes de vésicules modèles de *L. pneumophila* (nommées « MLV_MM » par la suite) composées de phospholipides synthétiques a été déterminée.

Des liposomes de type MLV, constitués des lipides naturels extraits de membranes de *L. pneumophila* Lens (nommés « MLV_Lp ») ont également été réalisés.

De plus, suite à l'étude des membranes artificielles, la présence de PC au sein de celles-ci est apparue comme importante pour leur sensibilité aux peptides anti-*Legionella*. Nous avons donc émis l'hypothèse que la résistance de *E. coli* à ces peptides pouvait être due à l'absence de PC dans sa membrane. Ainsi, des liposomes constitués d'une part des lipides naturels extraits de membranes de *E. coli*, et d'autre part de ces mêmes lipides supplémentés de PC ont été réalisés. Toutefois, le fort pourcentage de PE (80 %) dans les membranes de cette bactérie a posé un

problème pour former des liposomes stables. En effet, PE, de part sa forme en cône inversé, a tendance à se structurer en solution sous forme de micelles inversées plutôt qu'en bicouche. Pour limiter ce phénomène, une quantité croissante de PG, le second phospholipide majoritaire de la membrane de *E. coli*, a été rajouté jusqu'à obtenir des liposomes relativement stables. Ainsi, 30 % de PG ont été ajoutés aux lipides extraits de *E. coli* (MLV_Ec-PG). Pour les liposomes supplémentés de PC (MLV_Ec-PC), nous avons choisi d'en ajouter 30 % (di-C16 :0/di-C16 :1 (50:50)) afin d'en avoir la même proportion que dans les membranes de *L. pneumophila*. Ces résultats, présentés dans le **tableau 18**, ne sont que préliminaires. Les peptides choisis dans un premier temps ont été WRK, PSM α et les peptides inversés rWRK et rPSM, ainsi que les plus intéressants en termes d'activité au sein de chacune des trois familles de peptides.

Tableau 18. Mesure de la perméabilisation de liposomes par différents peptides.

Peptide		90% CLM (μ M)			
		MLV_MM	MLV_Lp	MLV_Ec-PG	MLV_Ec-PC
WRK to rPSM	WRK	1,42	2	1,92	1,92
	WRK_F15I	1,54	1,88	1,78	1,96
	rPSM	> 10	> 10	2,86	3,12
PSM to rWRK	PSM	2,54	1,78	1,92	2,22
	PSM_G14K	0,77	1,59	1,54	1,59
	PSM_D3G-G14K	0,52	1,18	1,30	1,30
	PSM_V9F	1,52	2	2,17	2,13
	rWRK	0,85	1,20	1,23	1,23
PSM-K to PSM-R	PSM_22R	2,5	2,05	1,51	1,41
	PSM_7R-13R-22R	5	3,57	2,17	3,33

MLV_MM : membranes modèles de *L. pneumophila*, **MLV-Lp** : MLVs composés des lipides extraits des membranes de *L. pneumophila*, **MLV_Ec-PG** : MLVs composés des lipides extraits des membranes de *E. coli* supplémentés de 30 % de PG et **MLV_Ec-PC** : MLVs composés des lipides extraits des membranes de *E. coli* supplémentés de 30 % de PC.

D'une manière générale, les résultats obtenus avec les vésicules composées de lipides naturels extraits de *L. pneumophila* sont similaires à ceux obtenus avec les vésicules modèles. Les différences observables peuvent être expliquées en grande partie par les méthodes de dosage utilisées. En effet, avec les membranes modèles composées de lipides commerciaux, la concentration indiquée par le fournisseur est fiable et précise. Au contraire, les lipides extraits

des membranes bactériennes ont été dosés selon une technique peu précise, et dont le résultat peut varier en fonction de la nature des lipides. Elle donne donc une estimation de la quantité et non une mesure précise. D'après les résultats obtenus (le 90% CLM des MLV_Lp étant généralement plus élevé que celui des MLV_MM), nous pouvons penser que la quantité de lipides dosés est sous-estimée. Cette méthode devra donc être optimisée avant de renouveler cette expérience. Malgré ces légères différences, notre modèle de membrane modèle de *L. pneumophila* semble valide.

En ce qui concerne les liposomes constitués de lipides naturels de *E. coli*, il n'y a pas de réelle différence entre les deux échantillons. Mais il n'est pas possible de conclure sur un effet ou non de PC car l'ajout de 30 % de PG aux membranes témoins n'est pas négligeable, d'autant plus que des liposomes constitués uniquement de PG peuvent être lysés par les peptides testés (**Publication 2**).

4. Sensibilité de *L. pneumophila* Lens à différents composés chimiques

Les peptides utilisés dans la **publication 2**, ainsi que ceux de la « PSM-K to PSM-R family » ont du être solubilisés pour l'étude de leurs activités. Or, pour certains d'entre eux, il n'a pas été possible de les solubiliser dans l'eau. Une étude de l'activité de différents composés chimiques envers *L. pneumophila* Lens, puis la détermination du pourcentage permettant la meilleure solubilisation possible ont donc été réalisées.

La mesure des CMI de divers composés chimiques envers *L. pneumophila* Lens a donc été réalisée et les résultats sont présentés dans la **figure 27**.

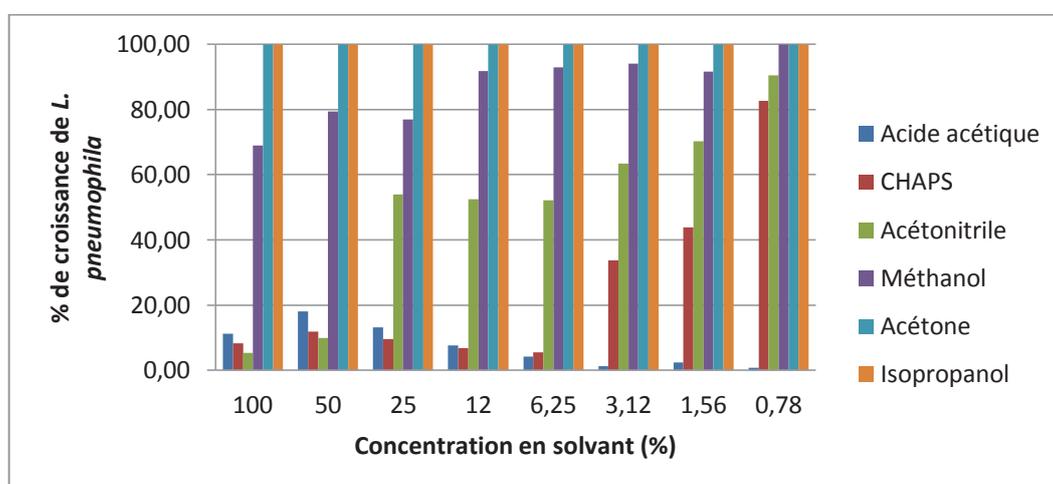


Figure 27. Mesure des CMI de différents composés chimiques.

Seuls l'isopropanol et l'acétone n'inhibent pas la croissance de *Legionella* même à la plus forte concentration testée (100 %). L'isopropanol a donc été choisi pour solubiliser les peptides.

Pour déterminer le pourcentage de composé chimique permettant la meilleure solubilisation des peptides, la PSM_{13R} a été solubilisée dans différentes solutions d'isopropanol (25, 50 ou 75 %) puis injectée sur une colonne HPLC en phase inverse (Figure 28).

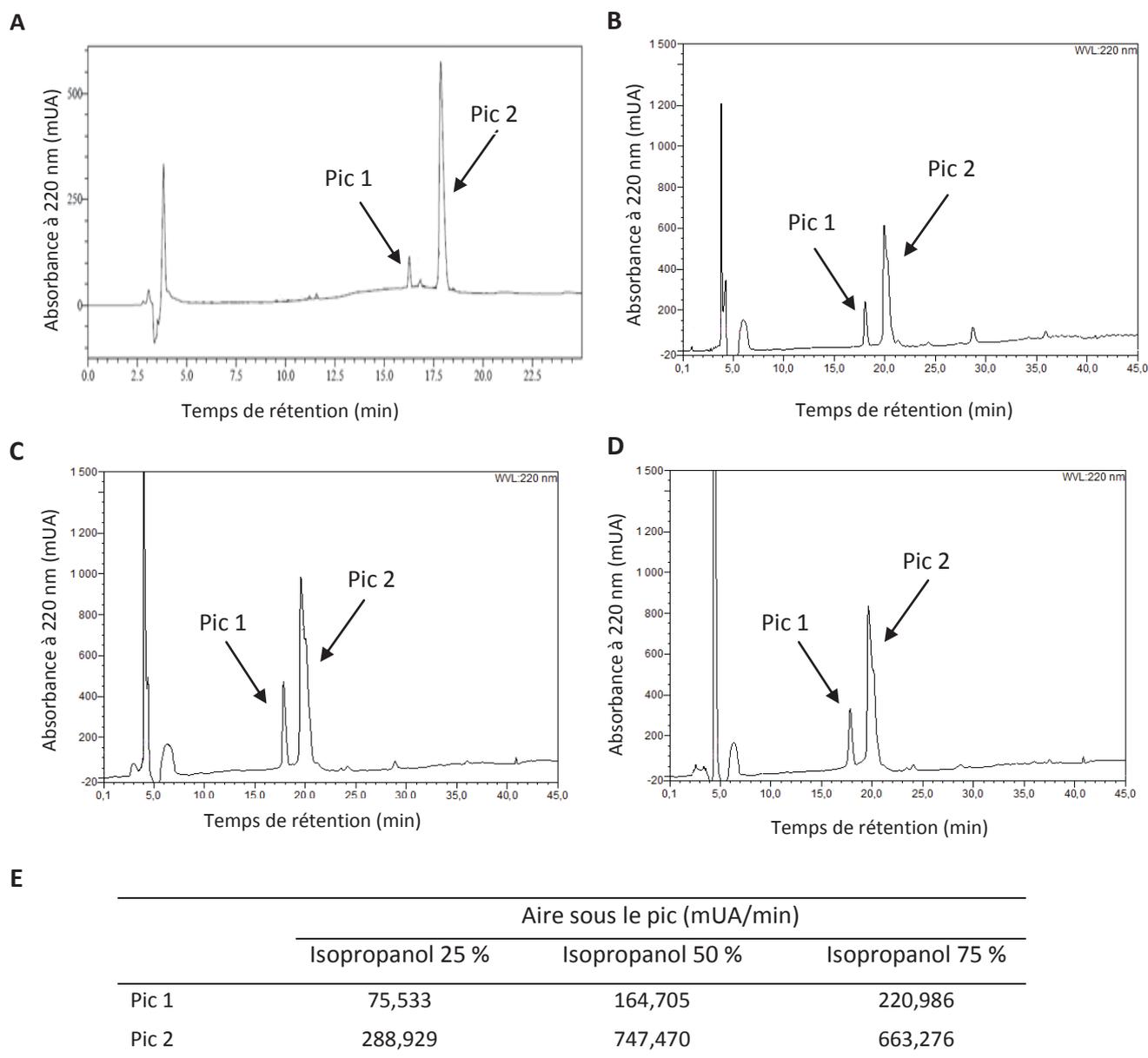


Figure 28. Profils d'éluion de la PSM_{13R} en fonction des conditions de solubilisation.

(A) Chromatogramme fourni par Genscript ; (B) peptide repris dans 25 % isopropanol, 75 % eau ; (C) peptide repris dans 50 % isopropanol, 50 % eau et (D) peptide repris dans 75 % isopropanol, 25 % eau.

(E) Aire et pourcentage relatif des pics dans chaque condition testée.

Le pic 2 correspond à la PSM_{13R} solubilisée.

La même quantité de peptide (400 μ g) a été injectée pour chaque expérience.

C'est donc le mélange à 50 % d'isopropanol qui permet la meilleure solubilisation du peptide (Pic 2, **Figure 28**). Ainsi, chaque peptide a été repris dans 50 % d'isopropanol puis injecté sur une colonne HPLC en phase inverse afin de récupérer le pic correspondant à chaque peptide.

III. Résultats complémentaires concernant la WRK

A. Interaction du peptide avec les membranes

1. Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

Dans les résultats précédents, l'interaction de la WRK avec des membranes a été étudiée par mesure de la perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* et par mesure de la libération de calcéine de vésicules modèles.

Pour compléter ces résultats, nous avons étudié l'effet du peptide sur la bicouche membranaire par RMN du solide du phosphore (^{31}P) et du deutérium (^2H). Cela a été effectué en présence de concentrations variables de peptide sur des liposomes de type MLV (« multilamellar vesicles ») représentatifs de membranes modèles de *Legionella* d'une part, et sur des vésicules constituées de lipides naturels extraits de *L. pneumophila* d'autre part.

a) Principe de la RMN

La résonance magnétique nucléaire des solides est une technique permettant notamment d'obtenir des informations sur les interactions peptides/membranes.

Elle repose sur la notion de spin nucléaire (moments magnétiques) qui dépend du nombre d'orientations que peut prendre un noyau d'un atome (proton, phosphore, deutérium...) au sein d'un champ magnétique (**Figure 29**). En effet, en présence d'un champ magnétique, les moments magnétiques vont adopter un certain nombre d'orientations privilégiées (deux dans l'exemple ci-dessous). Ainsi, une aimantation résultante, M_0 , est obtenue.

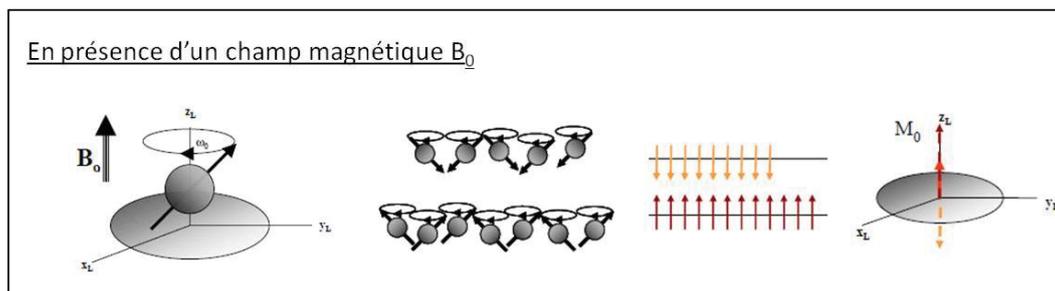


Figure 29. Orientation des noyaux au sein d'un champ magnétique B_0 orienté parallèlement à l'axe z.

L'aimantation résultante, M_0 , est indiquée par la flèche rouge en trait plein.

Une expérience RMN comprend trois phases (**Figure 30**) :

- **L'équilibre**

En présence d'un champ magnétique B_0 , les spins nucléaires se répartissent sur les niveaux d'énergie magnétique selon la statistique de Boltzmann. Une aimantation résultant de l'addition vectorielle des projections sur la direction du champ magnétique est ainsi obtenue, le long de l'axe z.

- **La perturbation**

L'aimantation résultante est perturbée par une impulsion de champ radiofréquence B_1 , appliquée perpendiculairement à B_0 , le long de l'axe x ou y. L'aimantation bascule alors dans le plan perpendiculaire au champ magnétique.

- **La relaxation**

Lorsque l'impulsion de champ B_1 cesse, le système retourne progressivement à l'état initial. Ce retour à l'équilibre se décompose en une relaxation longitudinale, de type exponentiel, le long de l'axe z, et en une relaxation transverse, le long de l'axe y, de type cosinusoidal et exponentiel. La mesure de cette dernière permet d'obtenir une FID (« Free induction decay »).

Cette FID est mesurée pour chaque noyau de l'échantillon (des atomes ^{31}P ou ^2H dans notre cas), puis une transformée de Fourier est réalisée sur la somme des FID afin d'obtenir un spectre RMN composé de raies qui permet d'obtenir des informations sur la dynamique et l'assemblage des molécules étudiées.

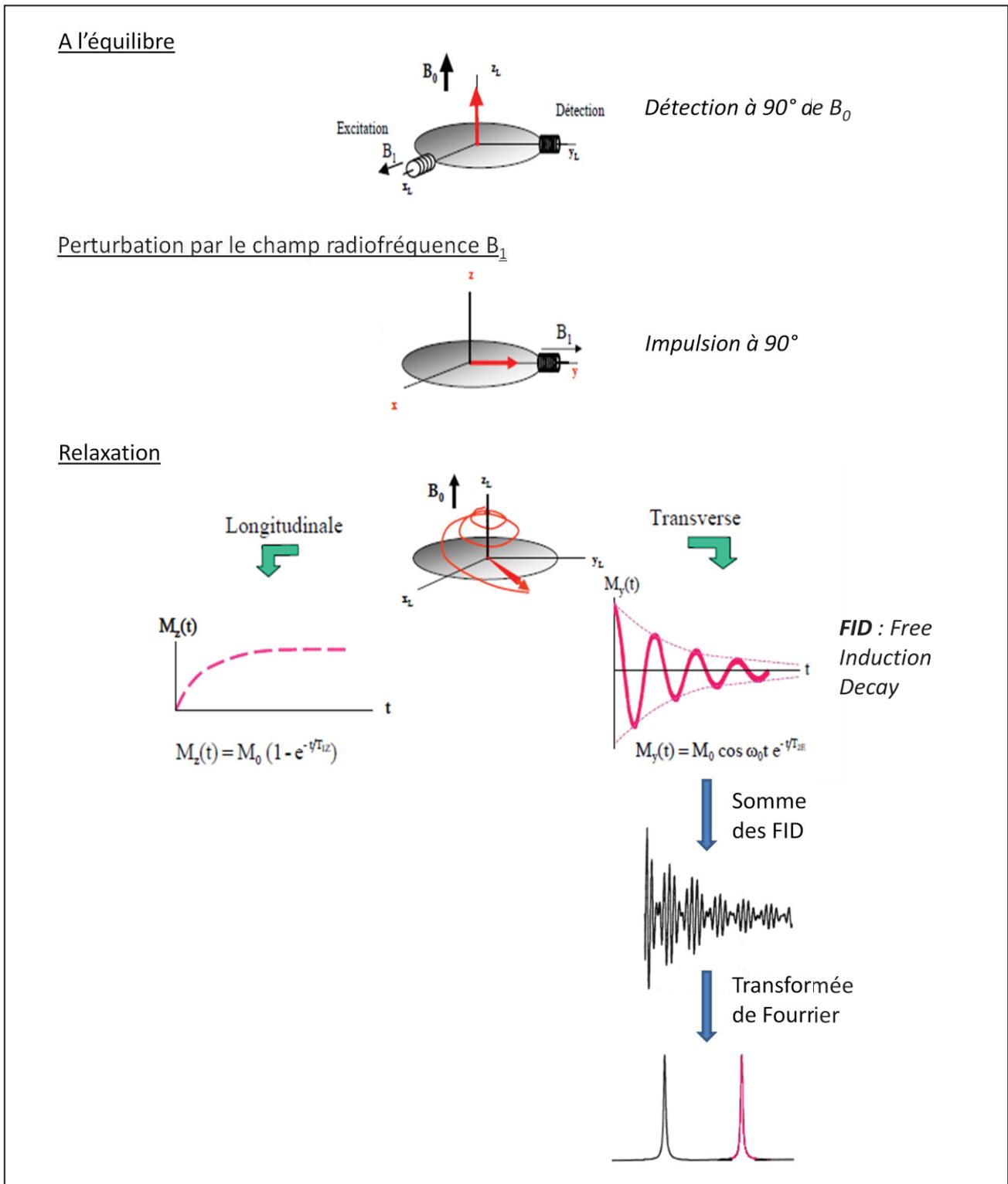


Figure 30. Représentation des trois principales étapes d'une expérience de RMN (équilibre, perturbation, relaxation) et de l'obtention du spectre RMN.

L'aimantation résultante est indiquée par la flèche rouge en trait plein.

Dans cette étude, les deux noyaux choisis sont le phosphore (^{31}P) et le deutérium (^2H). Le phosphore (^{31}P) est retrouvé dans les membranes plasmiques au niveau des têtes polaires des phospholipides. Ainsi, la RMN du phosphore va permettre d'étudier l'orientation et la dynamique des têtes polaires. L'abondance naturelle du phosphore 31 étant proche de 100 %, ces noyaux peuvent être observés directement en RMN, sans marquage isotopique préalable. Au contraire, l'abondance naturelle du deutérium est de l'ordre de 0,01 %. Ainsi, ces noyaux ne peuvent pas être observés directement en RMN, et le marquage des lipides avec du deutérium est nécessaire. Cette incorporation se fait au niveau des chaînes d'acides gras dont la dynamique sera donc étudiée en RMN du deutérium.

Selon le noyau observé, les spectres auront un profil différent. Les spectres qui peuvent être obtenus en RMN du phosphore sont représentés dans la **figure 31**.

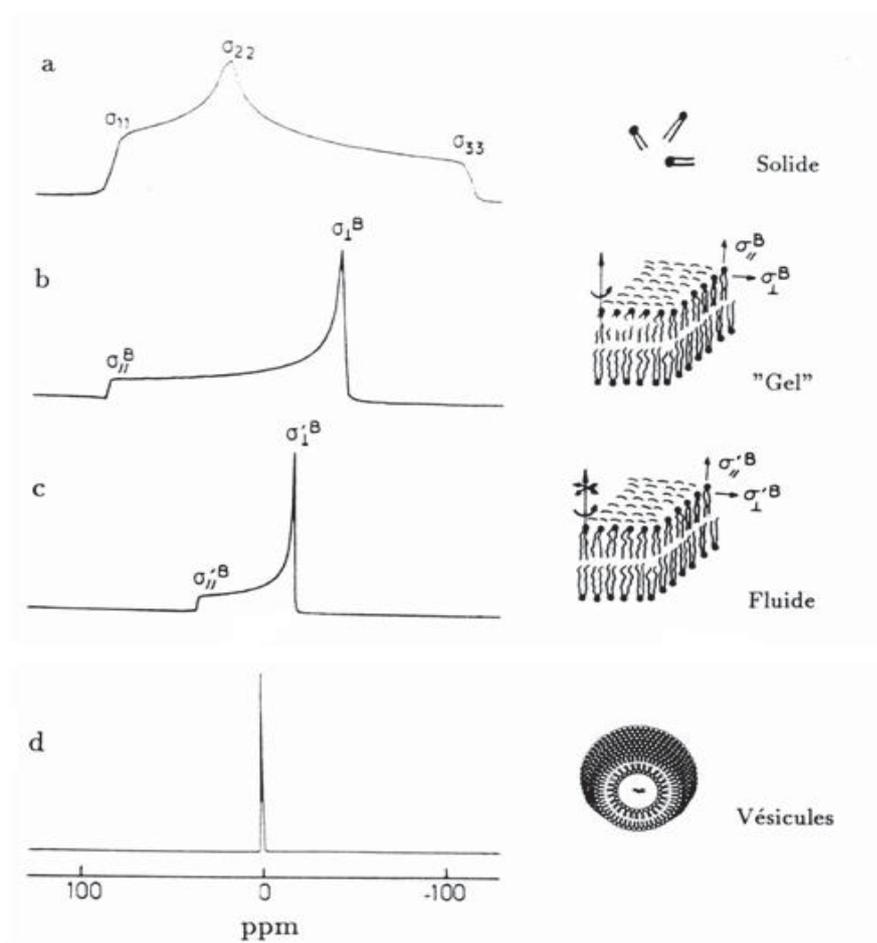


Figure 31. Formes des spectres RMN du phosphore en fonction de la phase lipidique (Dufourc, 1986).

a. échantillon ne possédant aucun mouvement, **b.** phase lamellaire « gel » L_{β} , **c.** phase lamellaire fluide L_{α} , **d.** petites vésicules isotropes

Les différences visibles sont fonction du type de phase lipidique dans laquelle se trouve la membrane. Globalement, plus la membrane est dans un état fluide, plus le spectre est étroit, jusqu'à l'obtention d'une raie fine (à l'abscisse 0), appelée raie isotrope, lorsque la membrane est sous forme de petites vésicules, de moins de 100 nm de diamètre, pouvant tourner très vite dans le champ magnétique. Cette raie est représentative d'un système isotrope dont les propriétés physico-chimiques ne dépendent pas de la direction de la mesure, les mouvements moléculaires de celui-ci étant très rapides et toutes ses orientations étant équiprobables.

Comme pour la RMN du phosphore, l'état de la membrane et l'amplitude des mouvements moléculaires possibles va influencer la forme des spectres obtenus en RMN du deutérium (**Figure 32**).

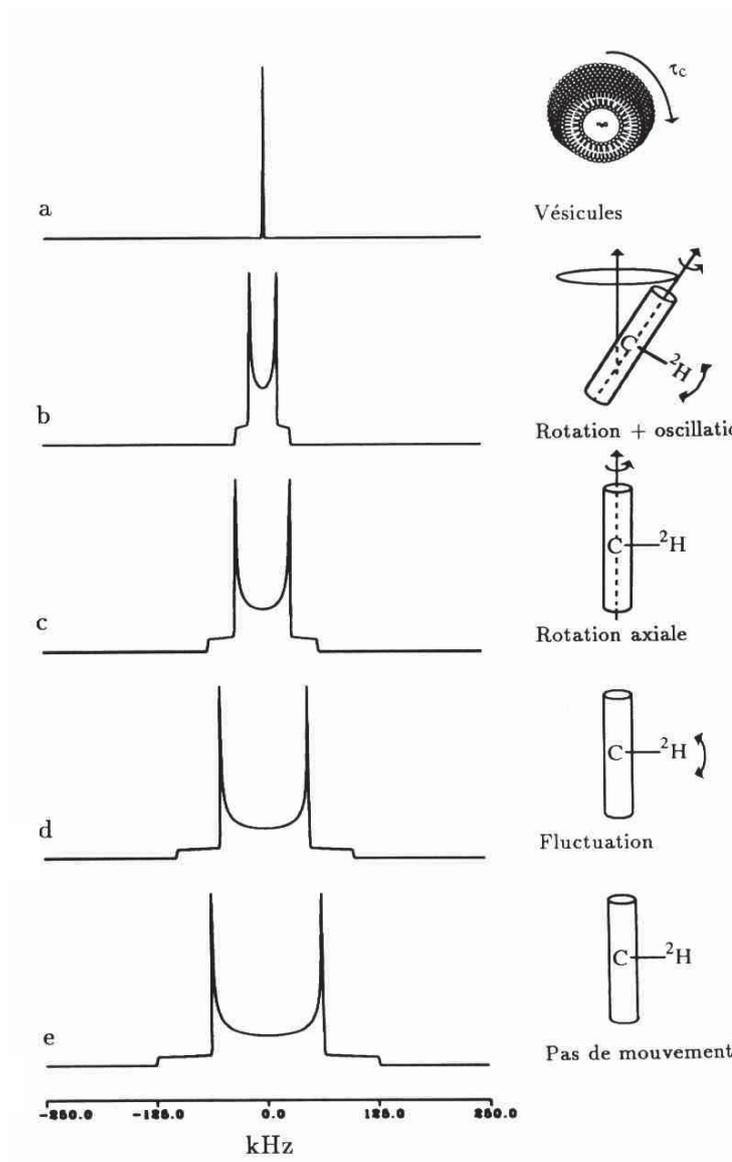


Figure 32. Formes des spectres RMN du deutérium en fonction des mouvements moléculaires des lipides (Dufourc, 1986).

Les épaulements de chaque côté du spectre correspondent à des lipides, des grands liposomes, orientés à 0°. Les pics correspondent aux orientations à 90°. Cette forme de spectre traduit la dépendance orientationnelle des spectres en RMN des solides. On parle de spectres de poudre ou de doublets de Pake. Plus le système est fluide, plus l'écart entre ces raies et la largeur globale du spectre sont faibles. Dans le cas de petites vésicules, dont les mouvements sont considérés comme isotropes, une seule raie isotrope est observée sur le spectre RMN.

Plusieurs paramètres peuvent être déterminés à partir des spectres RMN.

- **La mesure des éclatements quadrupolaires (RMN du deutérium).**

Lorsque l'on possède des lipides perdeutériés sur les chaînes d'acides gras (chaînes palmitiques en C16 ici), un doublet de Pake est obtenu pour chaque deutéron. L'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q$, mesuré entre les raies à 90° de chaque doublet de Pake, correspond à l'écart (en kHz) entre deux raies correspondant à une position marquée sur la chaîne, notamment en bout de chaîne carbonée (position 16) et au plus près du glycérol (position plateau, C2 à C8) (**Figure 33**). On trouve des éclatements quadrupolaires intermédiaires pour les autres positions (C9 à C15). Les éclatements quadrupolaires diminuent quand le désordre et donc la microfluidité augmente (fluctuation, rotation axiale, oscillation...) au niveau de chaque chaînon carboné. Ainsi, la mesure des éclatements quadrupolaires aux positions 16 et plateau renseigne sur la fluidité de la chaîne d'acide gras, au cœur de la membrane (C16) et proche de l'interface (plateau).

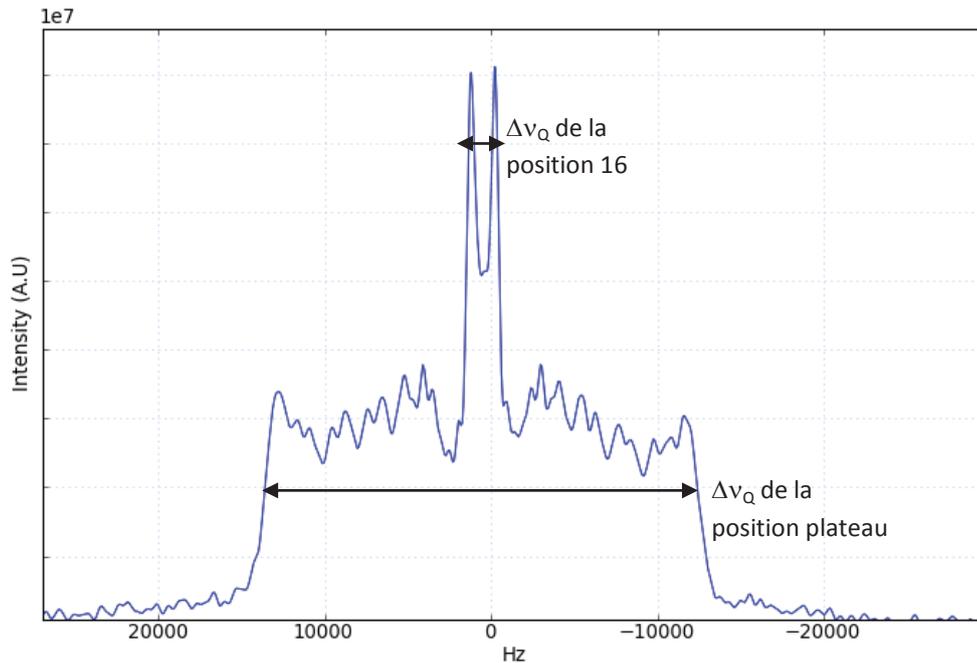


Figure 33. Exemple de détermination de l'éclatement quadrupolaire de la position plateau et de la position 16 sur un spectre RMN du deutérium.

La position 16 correspond aux deutériums en bout de chaîne d'acide gras, les plus mobiles. La position plateau correspond aux deutériums les plus proches du squelette glycérol, les moins mobiles (positions C2 à C8).

- **La mesure du paramètre d'ordre S^{CD} (RMN du deutérium).**

Le paramètre d'ordre décrit l'amplitude des mouvements moléculaires membranaires et permet donc de quantifier l'état d'organisation d'un système (Seelig, 1977).

Il est calculé grâce à la relation :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} A_Q S^{CD}$$

avec $\Delta\nu_Q$ correspondant à l'éclatement quadrupolaire, et $A_Q = 167$ kHz pour les liaisons méthylènes C-D (Burnett & Muller, 1971).

Les valeurs du paramètre d'ordre sont comprises entre 0 (système très mobile, chaînes d'acides gras à l'état liquide isotrope) et 1 (système rigide, chaînes étirées en position all-trans).

- **Le calcul des moments spectraux (RMN du deutérium et du phosphore).**

L'éclatement quadrupolaire est un moyen d'estimer le paramètre d'ordre S^{CD} à un endroit déterminé d'une molécule, une position précise de la chaîne acyle. Toutefois, selon les spectres, il est parfois difficile de mesurer ces paramètres. Afin d'analyser de manière quantitative de tels

spectres, une méthode fondée sur le calcul des moments spectraux a été développée par Bloom et Davis (Davis *et al.*, 1979).

Les moments peuvent être déterminés à l'aide d'une formule mathématique complexe qui, pour simplifier et dans le cas du premier moment, M_1 , correspond à l'intensité du pic multipliée par sa distance par rapport à l'abscisse 0.

Le calcul du premier moment en RMN du deutérium permet de suivre la dynamique globale de la chaîne deutérée alors que celui du second moment, en RMN du phosphore, la dynamique de la tête polaire (Dufourc *et al.*, 1992).

Parmi ces trois paramètres, les deux premiers (mesure des éclatements quadrupolaires et mesure du paramètre d'ordre) ne prennent en compte que la phase fluide des systèmes, alors que le calcul des moments tient compte à la fois des phases fluides et des phases gels.

b) Résultats

Dans ce travail, nous avons étudié l'action de la warnéricine RK sur des liposomes de type MLV (« multi-lamellar vesicles ») représentatifs de deux types de membranes :

- **Les « membranes modèles »**, dont la composition en phospholipides commerciaux mime celle des membranes naturelles de *L. pneumophila*. Leur composition est détaillée dans le **tableau 19**.

Tableau 19. Composition en phospholipides des membranes modèles et températures de transition de phase de chaque phospholipide.

Phospholipide	% relatif	Température de transition de phase (°C)
DPPC C16:0-C16:0 d31	15 %	41,5
PC di-C16:1	15 %	-36
DPPE di-C16:0	20 %	65
PE di-C16:1	20 %	33,5
CL tétra-C14:0	15 %	59
CL tétra-C18:1	15 %	< 59

La DPPC di-C16:0 retrouvée dans la membrane de *L. pneumophila* a été remplacée par de la PC deutérée (DPPC C16:0-C16:0 d31), nécessaire à une analyse en RMN du deutérium.

- Les « membranes naturelles » sont composées des lipides directement extraits de la membrane de *L. pneumophila* auxquels ont été ajoutés 10 % de PC deutériée (DPPC C16:0-C16:0 d31). Seulement 10 % ont été ajoutés afin de pouvoir étudier les membranes en RMN du deutérium tout en perturbant le moins possible le système naturel.

Les lipides constituant ces vésicules ont été dosés par la méthode déjà utilisée pour doser les MLVs contenant de la calcéine (cf **paragraphe II-A-3**). Cette méthode n'étant pas précise, il est possible que les ratios peptide/lipide utilisés en RMN pour les membranes naturelles soient donc légèrement sous-estimés. Ainsi, au ratio $R_i = 10$ par exemple, il y a peut être un peptide pour un peu plus que 10 lipides.

Chaque échantillon membranaire a été étudié à la fois en RMN du deutérium et en RMN du phosphore afin d'observer l'action du peptide sur la globalité de la membrane (têtes polaires et acides gras).

Les échantillons membranaires seuls ont tout d'abord été étudiés ($R_i = \infty$), puis la warnéricine RK a été ajoutée aux deux types de vésicules en faisant varier le ratio moléculaire peptide/lipide de 1/500 à 1/10 ($R_i = 500 ; 100 ; 10$). De plus, pour chaque condition, les mesures ont été effectuées à différentes températures allant de 20 à 50°C, puis de 50°C à 20°C. La descente en température permet de contrôler que les phénomènes observés à haute température sont réversibles lors d'un retour à température ambiante. Toutefois, pour alléger les résultats et puisque toutes les conditions étudiées sont effectivement réversibles, seules les « montées en température » seront présentées par la suite. La totalité des spectres est néanmoins disponible en **annexe**.

Par ailleurs, il faut noter que le ratio $R_i = 10$ pourrait être considéré comme peu significatif biologiquement, la concentration en peptide étant bien plus élevée que ce qui peut être en moyenne retrouvé *in vivo*. Toutefois, elle peut correspondre à ce qui arrive dans le cas d'un amas de peptide localisé sur une partie de la membrane (concentration locale).

(1) Membranes modèles

La **figure 34** représente les différents spectres obtenus pour les membranes modèles en RMN du phosphore.

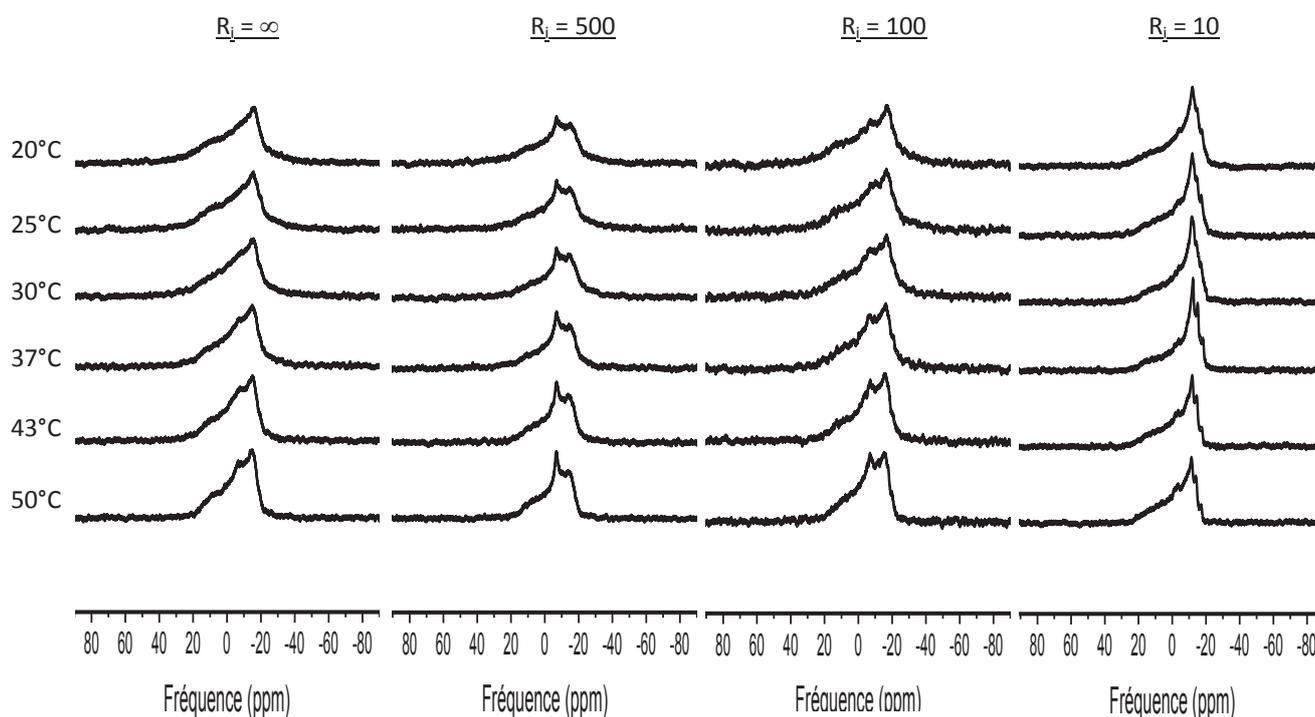


Figure 34. Spectres RMN du phosphore des membranes modèles en présence de différentes concentrations de WRK.

Les spectres sont obtenus sur un spectromètre 500 MHz (soit une fréquence de 202,47 MHz pour le Phosphore-31) à l'aide de la séquence d'Echo de Hahn (Rance & Byrd, 1983) en découplant les protons. La longueur de l'impulsion de 90° est de 4 μ s (pour une puissance de 6 dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 5 s. 5120 acquisitions sont additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 100 Hz) est appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures sont réalisées de 20°C à 50°C, avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- 0,5°C). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport à H₃PO₄ (0 ppm).

A $R_i = \infty$ (sans peptide), les spectres sont caractéristiques de bicouches engagées dans un environnement lamellaire de grande taille (MLV de diamètre micrométrique). La largeur des spectres, mesurée par l'anisotropie de blindage électronique de l'ordre de 50 ppm, indique que la tête polaire des lipides est relativement dynamique. La largeur d'un spectre statique est de 220 ppm. Le spectre observé est en fait la résultante de trois spectres provenant de 3 têtes polaires différentes : PC, PE et CL. Les anisotropies de déplacement chimique de ces spectres sont légèrement différentes, mais on ne peut pas les distinguer ici, dans ces conditions expérimentales. Lorsque la température augmente, les spectres deviennent plus étroits, ce qui indique que globalement les têtes deviennent plus mobiles. On note aussi l'apparition d'une faible raie isotrope centrée sur 0 ppm lorsque la température augmente. Celle-ci est attribuable à la présence de très petites vésicules de quelques dizaines de nanomètres. Le pourcentage de

raie isotrope peut être calculé en simulant le spectre (programme Fortran, E.J. Dufourc). A ce ratio, cette raie représente moins de 5 % du système. La formation de ces vésicules phospholipidiques à haut rayon de courbure est souvent rencontrée et peut être attribuée à une faible dégradation chimique des lipides en lysolipides qui déstabilisent les bicouches. Les répulsions électrostatiques des CL pourraient aussi être responsables de cette vésicularisation à haute température, la dynamique des chaînes aidant à l'effet de courbure.

A $R_i = 500$ et $R_i = 100$, la raie isotrope est plus importante (5-10 %) alors que la largeur du spectre n'est pas modifiée. Cela signifie que la présence du peptide semble « solubiliser » une petite partie de la membrane sans en modifier la structure globale. Il faut noter que même si la raie isotrope semble plus importante à $R_i = 500$, elle représente néanmoins le même pourcentage qu'à $R_i = 100$, cette dernière étant plus large, et donc de moindre amplitude.

Au contraire, en augmentant encore la quantité de peptide jusqu'à $R_i = 10$, celui-ci semble stabiliser la phase lamellaire, la raie isotrope devenant moins importante (< 5 %). A ce ratio, trois pics sont visibles sur le spectre en plus de la raie isotrope. Ils correspondent aux trois anisotropies de déplacement chimique $\Delta\sigma$ des phospholipides constituant les membranes modèles (PC, PE et CL). Ceux-ci ne sont visibles qu'à ce ratio qui a été étudié après un réglage fin réalisé sur l'appareil de RMN. Ces trois $\Delta\sigma$ sont de 32 ppm, 45 ppm et 54 ppm. Globalement on constate que même à forte teneur en peptide, la structure et la dynamique des têtes des phospholipides ne sont pas perturbées de manière importante.

La RMN du deutérium décrit ce qui se passe au niveau des chaînes d'acides gras. Toutefois, il ne faut pas oublier que seules les chaînes de PC, marquées, sont directement observées. Pour PE et CL, c'est une observation indirecte qui est effectuée, leur état impactant celui de PC.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 35**.

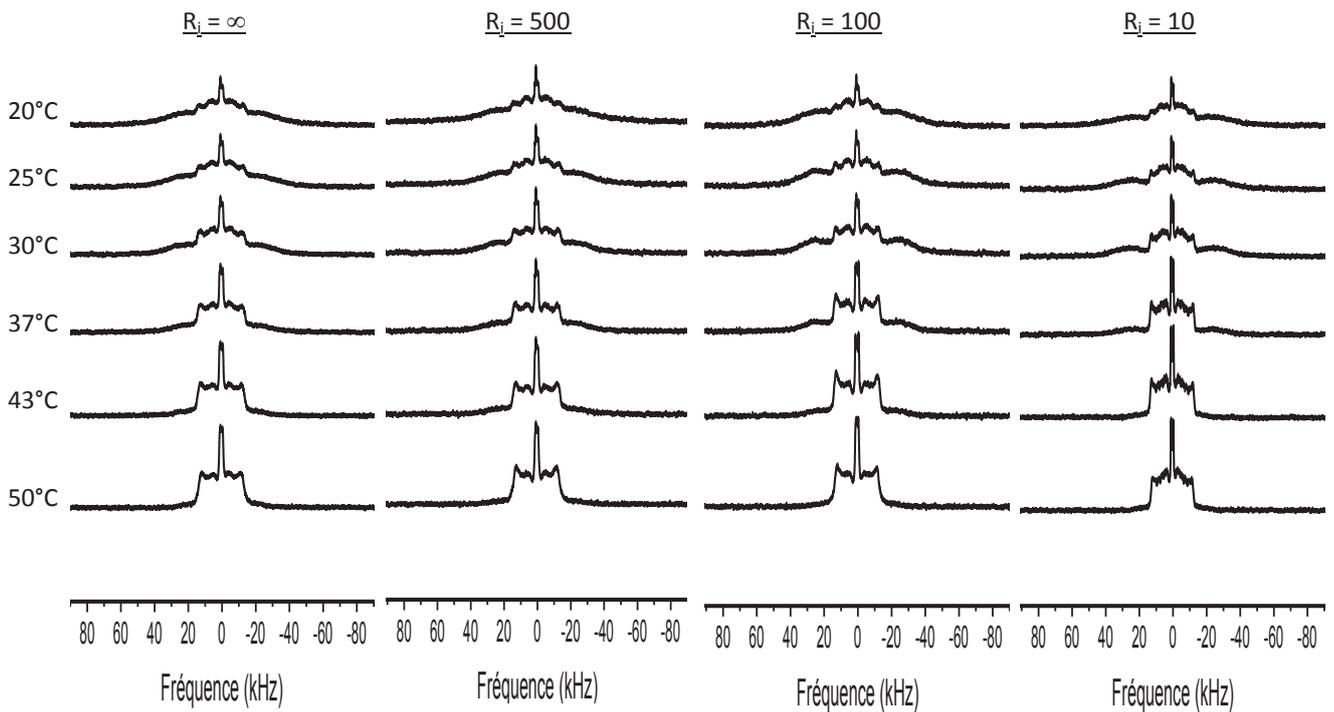


Figure 35. Spectres RMN du deutérium des membranes modèles en présence de différentes concentrations de WRK.

Les spectres sont obtenus sur un spectromètre 800 MHz (soit une fréquence de 122,8 MHz pour le deutérium) à l'aide de la séquence d'Echo solide (Davis *et al.*, 1976). La longueur de l'impulsion de 90° est de 4,5 μ s (pour une puissance de 0dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 2 s. 5120 acquisitions sont additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 150 Hz) est appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures sont réalisées de 20°C à 50°C avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- 0,5°C). Le milieu du spectre est arbitrairement placé à 0 kHz.

En absence de WRK ($R_i = \infty$), et à température ambiante, le spectre est complexe et constitué d'une composante très large s'étendant jusqu'à +/- 40 kHz et un spectre plus étroit contenant une structure fine. Ce spectre est caractéristique d'une coexistence de deux phases lipidiques de dynamique, rapportée par les chaînes acyles des PC, différente. Le spectre large est attribuable à une phase lamellaire gel et le spectre étroit et résolu à une phase lamellaire fluide. Cette coexistence de phases est observée entre 20 et 37 °C, avec cependant une diminution de la phase gel lorsque la température augmente. Lorsque la température dépasse les 37°C, l'absence de composante spectrale large indique que la membrane est majoritairement dans une phase fluide.

Ceci peut s'expliquer par l'observation de la température de transition de phase des phospholipides constituant les membranes modèles (**Tableau 16**) (Cevc, 1983). Elle correspond à la température à laquelle survient la transition phase gel / phase fluide pour des lipides hydratés

et considérés individuellement. Par exemple, à 20°C, la plupart des lipides étudiés sont en phase gel alors qu'ils sont pour la plupart en phase fluide, quand la température atteint 50°C. Dans le mélange on observe une zone importante de coexistence des phases rigides et fluide et la présence de lipides insaturés contribue vraisemblablement à abaisser la température de transition de la membrane dans son ensemble. De manière intéressante cela indique que la membrane modélisant les membranes naturelles est hétérogène en dynamique (domaines rigides et fluides) à température ambiante et entièrement fluide et homogène à une température légèrement plus élevée que la température physiologique.

A $R_i = 500$ et $R_i = 100$, on constate peu de modifications spectrales détectées par PC deutérié. De manière intéressante, il n'y a pas de raie isotrope centrée sur 0 kHz comme on en voyait en RMN ^{31}P , sous l'effet de la WRK. La faible vésicularisation produite par la warnéricine RK, à faible concentration, pourrait agir sur PE et/ou CL mais pas sur PC (seul lipide observé en RMN du deutérium).

A $R_i = 10$, comparé au ratio sans peptide, la composante large, représentant la phase gel, n'est pas modifiée, alors que la partie des spectres correspondant à la phase fluide est plus étroite (**Figure 36**). Cela signifie que la WRK, quelque soit la température, a tendance à désorganiser la phase fluide sans toucher la phase gel. Ces résultats sont confirmés par le calcul des éclatements quadrupolaires (**Figure 37**) qui indiquent que, notamment à faible température, la phase fluide est plus désorganisée à $R_i = 10$ ($\Delta\nu_Q$ plus faible) qu'aux autres ratios. A très forte concentration, le peptide augmente donc le désordre au sein de la membrane sans pour autant la désagréger totalement.

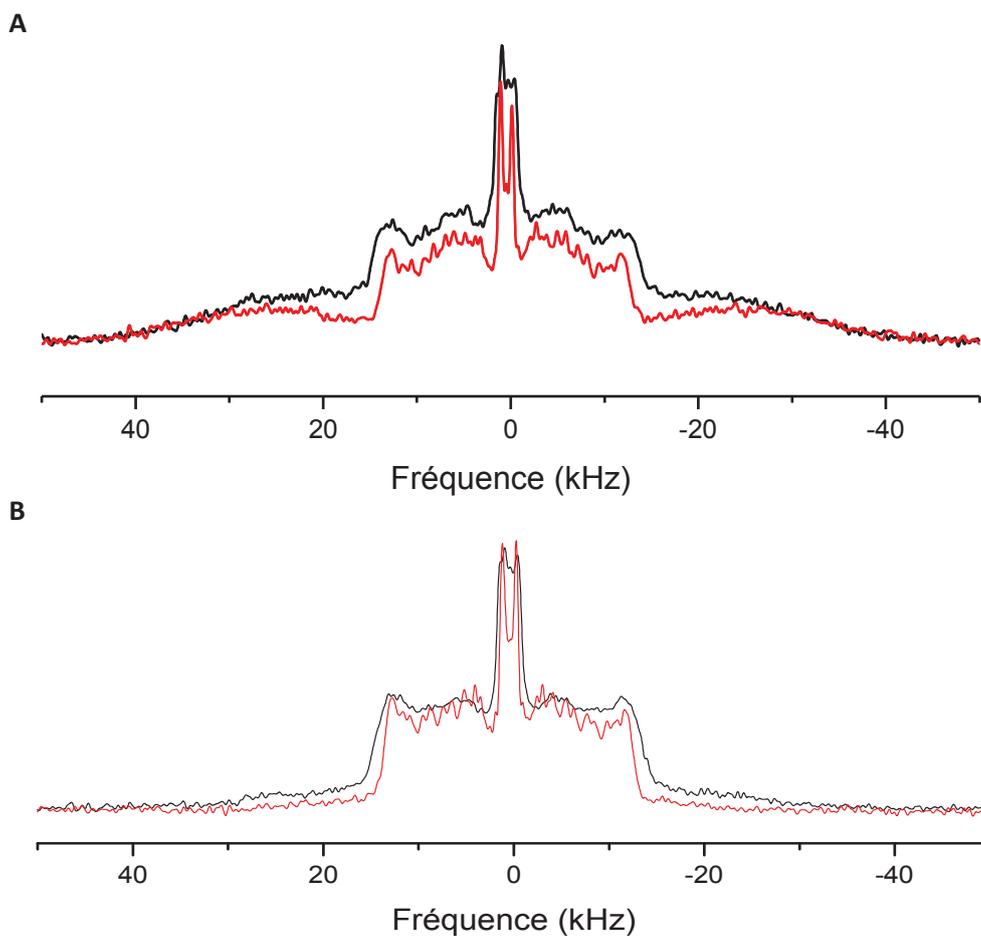


Figure 36. Superposition des spectres obtenus pour les membranes modèles (A) à 30°C et (B) à 43°C, à $R_i = \infty$ (en noir) et $R_i = 10$ (en rouge).

Les spectres présentés ici sont des agrandissements de ceux de la **figure 32**. Les superpositions ont été réalisées à l'aide du logiciel Origin.

Les parties « gel » des deux spectres se superposent, alors que la partie « fluide » du spectre obtenu à $R_i = 10$ est plus étroite qu'à $R_i = \infty$.

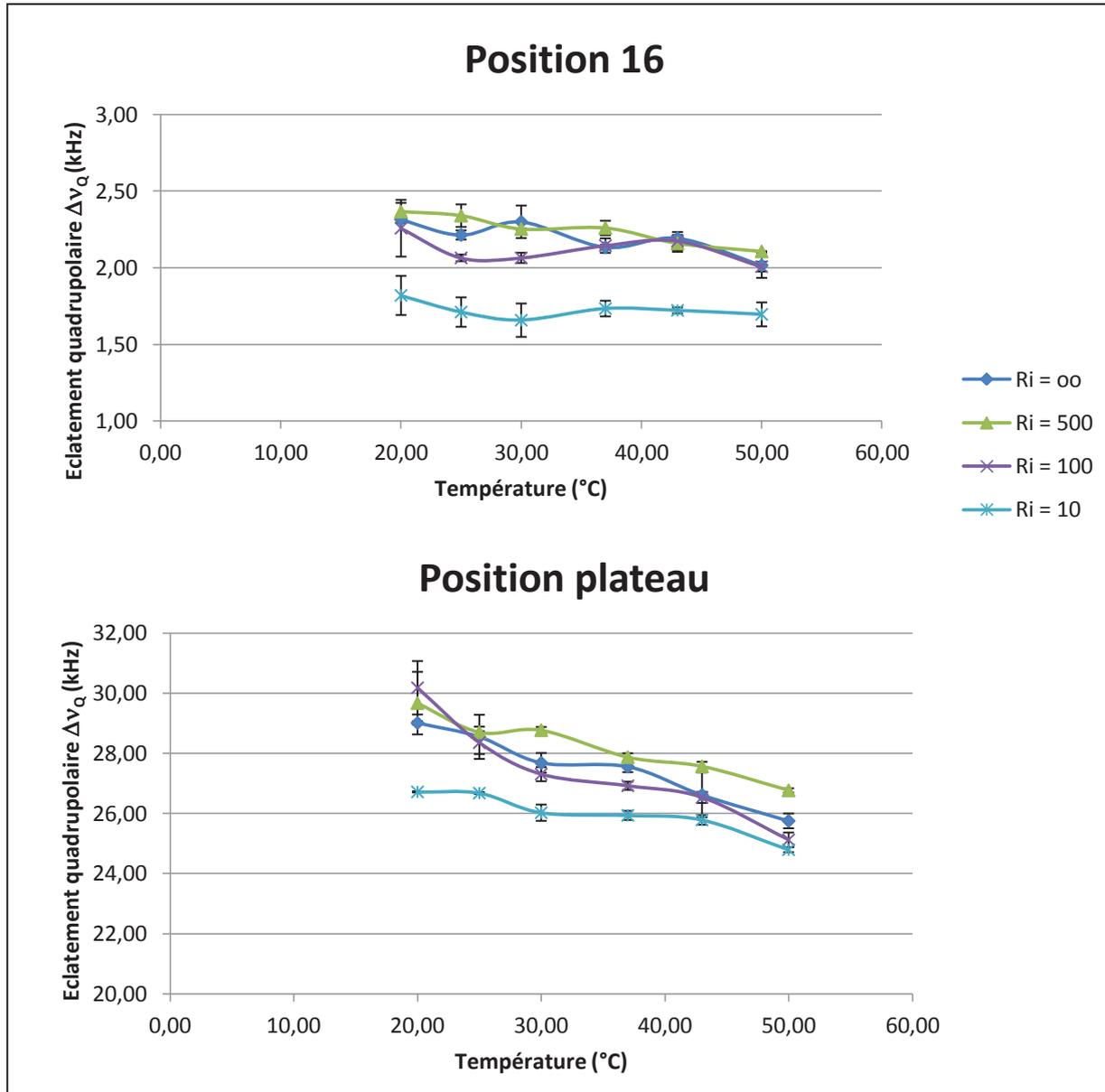


Figure 37. Éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions 16 et plateau des spectres du deutérium des membranes modèles en fonction de la température.

Les éclatements quadrupolaires ne prennent en compte que la partie des systèmes se trouvant en phase fluide, y compris pour les températures auxquelles il existe une coexistence phase fluide/phase gel.

Les valeurs de $\Delta\nu_Q$ sont les plus faibles à $R_i = 10$, ce qui signifie que le système est plus fluide.

Afin de déterminer si effectivement la WRK interagit sélectivement avec un des trois phospholipides constituant les membranes modèles, nous avons réalisé des spectres de RMN ^{31}P en rotation à l'angle magique. Cette technique consiste à faire tourner très rapidement (10 kHz) l'échantillon autour d'un angle de $54,7^\circ$ par rapport à la direction du champ magnétique. On supprime alors les interactions anisotropes conduisant en RMN des solides à la détection de spectres de poudre ou doublets de Pake. On obtient des spectres uniquement constitués de

raies fines comme en RMN des liquides, l'échantillon restant cependant sous forme membranaire. Dans le cas de la membrane constituée de lipides de 3 natures différentes (PC, PE, CL), on s'attend globalement à trois pics différents. Ainsi, la comparaison des spectres obtenus en présence ou non de peptide permet d'identifier le ou les lipides affectés par la WRK. En effet, si la proximité du peptide modifie l'environnement d'un phospholipide, cela peut, d'une part, déplacer la raie correspondant au phospholipide, et d'autre part, élargir celle-ci (si le peptide réduit la mobilité de la tête polaire).

La **figure 38** correspond aux spectres obtenus pour les membranes modèles à $R_i = \infty$ et $R_i = 10$, avec une rotation de 10 kHz.

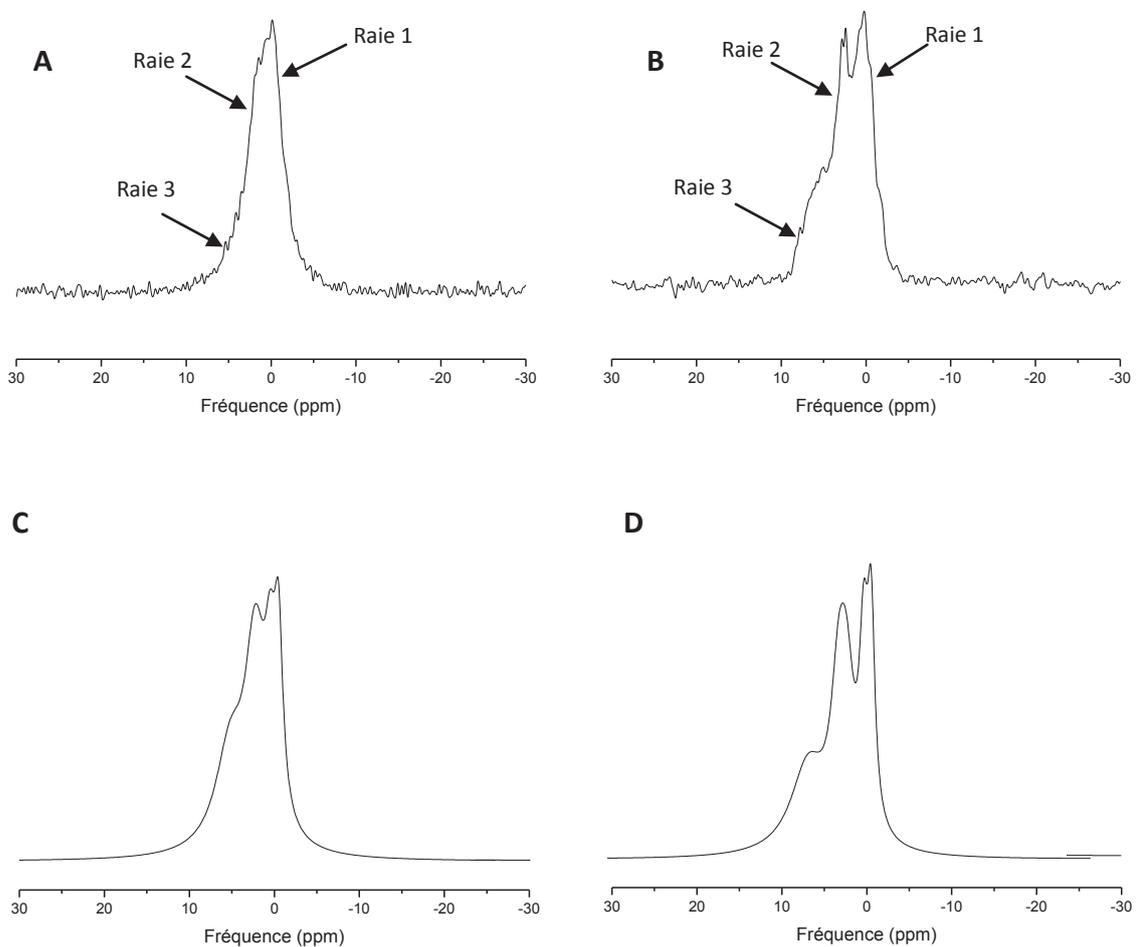


Figure 38. Résultats de l'analyse par RMN du phosphore en rotation à 10 kHz des membranes modèles à $R_i = \infty$ (A) et $R_i = 10$ (B), et résultats de la simulation de ces spectres à l'aide d'un programme en FORTRAN (C-D).

Tableau 20. Caractéristiques des spectres obtenus en RMN en rotation à 10 kHz des membranes modèles à $R_i = \infty$ et $R_i = 10$.

	Déplacement chimique (ppm)		Largeur de raie (ppm)	
	Simulation	Simulation	Simulation	Simulation
	$R_i = \infty$	$R_i = 10$	$R_i = \infty$	$R_i = 10$
Raie 1 (30 %)	-0,39	-0,34	1,42	1,51
Raie 2 (40 %)	+0,95	+1,94	2,85	2,85
Raie 3 (30 %)	+2,73	+5,15	4,23	6,42

Ces caractéristiques ont été obtenues par simulation des spectres expérimentaux (programme Fortran, E.J. Dufourc)

Le spectre en rotation obtenu pour le ratio $R_i = \infty$ (**Figure 38-A**) met en évidence trois raies représentant chaque espèce lipidique étudiée. Les données retrouvées dans la littérature concernant le déplacement chimique des phospholipides, c'est-à-dire la distance de la raie par rapport à 0, décrivent que la PC a le déplacement le plus négatif, suivi de PE puis CL (Merchant & Glonek, 1992; Sani *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 1995). Ainsi, la raie 1, présentant un déplacement chimique de -0,39 ppm pourraient correspondre à PC, la raie 2 (+0,95 ppm) à PE et la raie 3 (+2,73 ppm) à CL.

Lorsque le peptide est ajouté à $R_i = 10$, le profil du spectre change considérablement, notamment au niveau des raies 2 et 3, donc peut-être PE et CL. La simulation des spectres obtenus (**Figures 38-C et -D**) permet de mesurer ces changements (**Tableau 20**). La raie 1 n'est que très peu affectée par la présence du peptide. Au contraire, la raie 2 est déplacée vers des ppm plus positifs (+1,94 ppm), et la raie 3 est à la fois déplacée vers des valeurs de déplacement chimique positives (+5,15 ppm) et élargie en présence du peptide (augmentation de 2,2 ppm). La WRK pourrait donc perturber les environnements de PE et CL, et également réduire la mobilité du phosphate de CL (la raie étant élargie). A l'opposé, le peptide n'interagirait pas avec PC. Ceci est en accord avec ce qui a été observé pour les expériences de RMN statiques.

Pour conclure, les résultats obtenus sur les membranes artificielles indiquent donc que la WRK interagit avec les membranes, sans doute de manière sélective avec PE et CL. Toutefois, cette interaction n'entraîne pas une désagrégation totale de la membrane, contrairement à ce qui a pu être observé pour la mélittine par exemple. En effet, à $R_i < 15$ sur un système en phase gel, ou $R_i < 5$ sur un système en phase fluide, la mélittine entraîne une conversion de la totalité de la membrane en petits objets, quelque soit la température testée (Faucon *et al.*, 1995). En plus d'un choix sélectif de lipides (CL et PE), il semblerait que la WRK désorganise les phases fluides à forte concentration. Elle n'a que peu d'effet sur les phase ordonnées, à l'inverse

également de la mélittine qui a une préférence à solubiliser les membranes rigides et contenant du cholestérol (Pott & Dufourc, 1995).

(2) Membranes naturelles

Suite aux résultats obtenus avec les membranes modèles, les membranes naturelles ont été étudiées afin, tout d'abord, de valider notre modèle de membrane, mais aussi de nous rapprocher des conditions rencontrées *in vivo*.

Les résultats obtenus en RMN du phosphore sont présentés dans la **figure 39**.

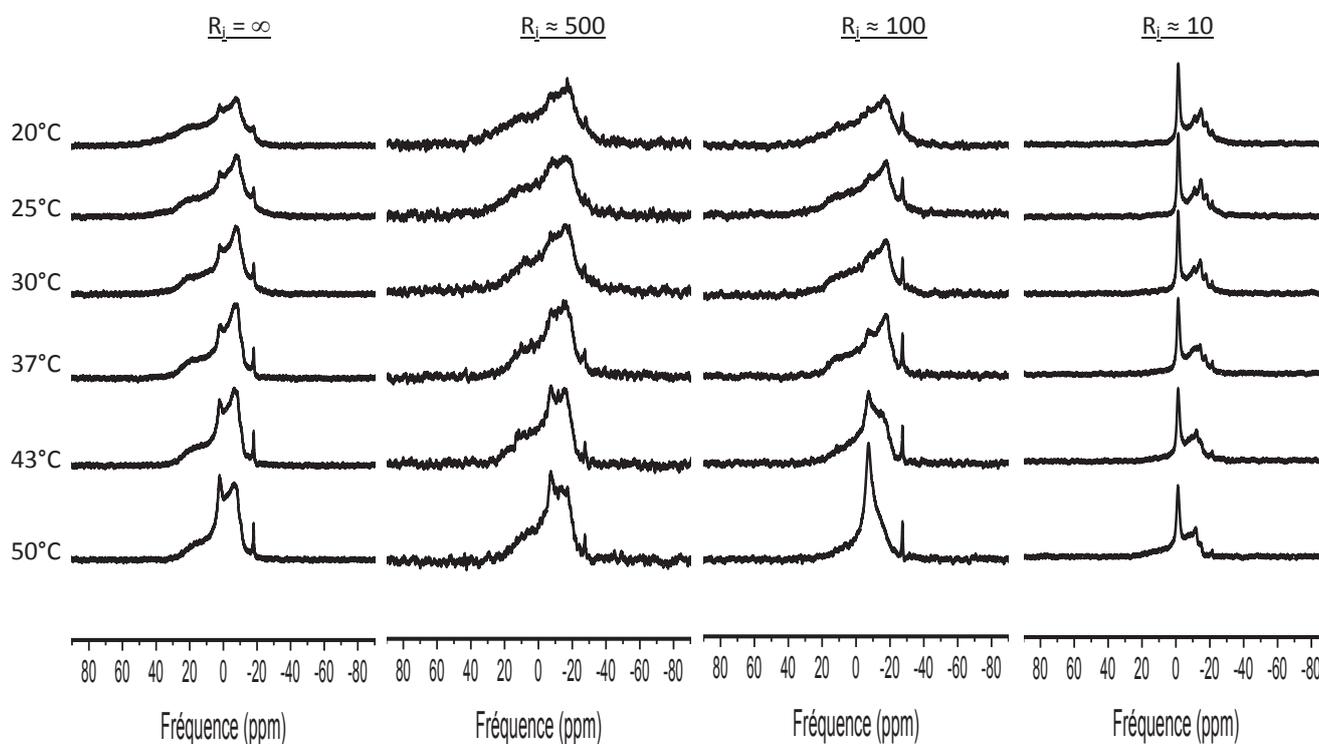


Figure 39. Spectres RMN du phosphore des membranes naturelles en présence de différentes concentrations de WRK.

Les spectres sont obtenus sur un spectromètre 500 MHz (soit une fréquence de 202,47 MHz pour le Phosphore-31) à l'aide de la séquence d'Echo de Hahn (Rance & Byrd, 1983) en découplant les protons. La longueur de l'impulsion de 90° est de 4 μ s (pour une puissance de 6 dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 5 s. 5120 acquisitions sont additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 100 Hz) est appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures sont réalisées de 20°C à 50°C, avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- 0,5°C). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport à H₃PO₄ (0 ppm).

A $R_i = \infty$, le système est comparable à celui des membranes modèles avec, notamment, une raie isotrope représentant moins de 5 % du système. Ceci permet de valider notre modèle de membrane. Toutefois, un pic très fin est présent à environ -20 ppm. Celui-ci pourrait correspondre à un métabolite contenant du phosphate, extrait en même temps que les phospholipides. Ce pic pourrait être par exemple de l'ATP, notamment son phosphate β qui possède un déplacement chimique de -20,5 ppm (Twyman, 2005). Cette raie ne correspondant pas à un lipide, elle ne sera donc pas prise en compte dans l'analyse des résultats.

A faible concentration ($R_i \approx 500$), le peptide ne semble pas avoir d'effet sur la membrane, la largeur du spectre et la proportion de raie isotrope étant quasiment inchangées.

A $R_i \approx 100$, la raie isotrope augmente fortement pour atteindre 55 % du spectre à 50 °C. Toutefois, cette raie étant dépendante de la température, elle correspond sans doute à la formation de vésicules de taille moyenne ($\approx 500 \mu\text{m}$). En effet, quelque soit la température, les MLVs (grosses vésicules de l'ordre du μm) sont immobiles dans le champ magnétique alors que les petites vésicules (de l'ordre du nm) tournent très vite. Ainsi, si la raie isotrope observée correspondait à une vésicularisation du système, elle serait visible à toutes les températures testées. Dans notre cas, cette raie isotrope augmente avec la température donc elle est représentative d'objets de taille moyenne (de l'ordre de 500 nm) qui sont immobiles à basse température, mais vont pouvoir tourner de plus en plus vite quand celle-ci augmente.

Ainsi, à $R_i \approx 100$, le peptide agit donc sur le système pour convertir les MLVs ($\approx 1 \mu\text{m}$) en objets de taille moyenne ($\approx 500 \text{ nm}$), et non en petites vésicules. La membrane n'est donc pas complètement désagrégée. Il est intéressant de noter que ce phénomène ne se produit qu'à haute température, avec une membrane dont la dynamique des chaînes est élevée.

Au contraire, à $R_i \approx 10$, la raie isotrope qui représente environ 40 % du système est présente indépendamment de la température. Dans ce cas, il s'agit donc bien de la conversion d'une grande partie de la phase lamellaire en petites vésicules. Les 60 % restants du système sont toujours sous forme lamellaire. De plus, les trois anisotropies de blindage électronique observées à ce ratio pour les membranes modèles (**Figure 34**) sont également visibles chez les membranes naturelles. Toutefois la superposition de ces spectres (**Figure 40**) semble indiquer une modification des $\Delta\sigma$ pour les membranes naturelles qui peut être expliqué par une différence de l'environnement lipidique des deux types membranaires, les membranes naturelles présentant une plus forte variabilité en lipides. Il est néanmoins difficile d'attribuer chaque pic à l'un ou l'autre des phospholipides. Pour cela, il faudrait réaliser les mêmes expériences avec des MLVs constitués d'un des phospholipides à la fois.

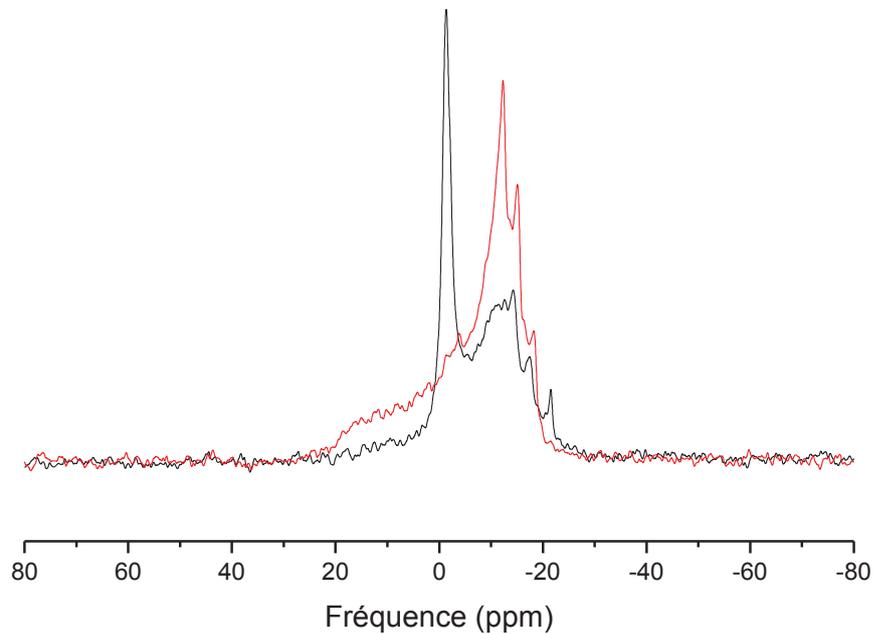


Figure 40. Superposition des spectres RMN du phosphore obtenus à $R_i = 10$ à 37°C , pour les membranes modèles (en rouge), et pour les membranes naturelles (en noir).

Les spectres présentés ici sont des agrandissements de ceux des **figures 34 et 39**. Les superpositions ont été réalisées à l'aide du logiciel Origin.

Ces résultats de RMN du phosphore permettent de conclure que, à faible concentration en peptide, notre modèle reflète bien ce qui est observé pour les membranes naturelles. Toutefois, à partir de $R_i \approx 100$, les résultats obtenus diffèrent entre les deux types membranaires. Ceci peut être expliqué par le fait que pour la composition des membranes modèles, nous n'avons pas pris en compte les acides gras branchés ($\approx 25\%$ des acides gras) ou à chaînes courtes ($\approx 8\%$). Ces composants pourraient donc jouer un rôle dans la perméabilisation des membranes naturelles de *L. pneumophila* par la WRK.

Les membranes naturelles ont ensuite été étudiées en RMN du deutérium (**Figure 41**).

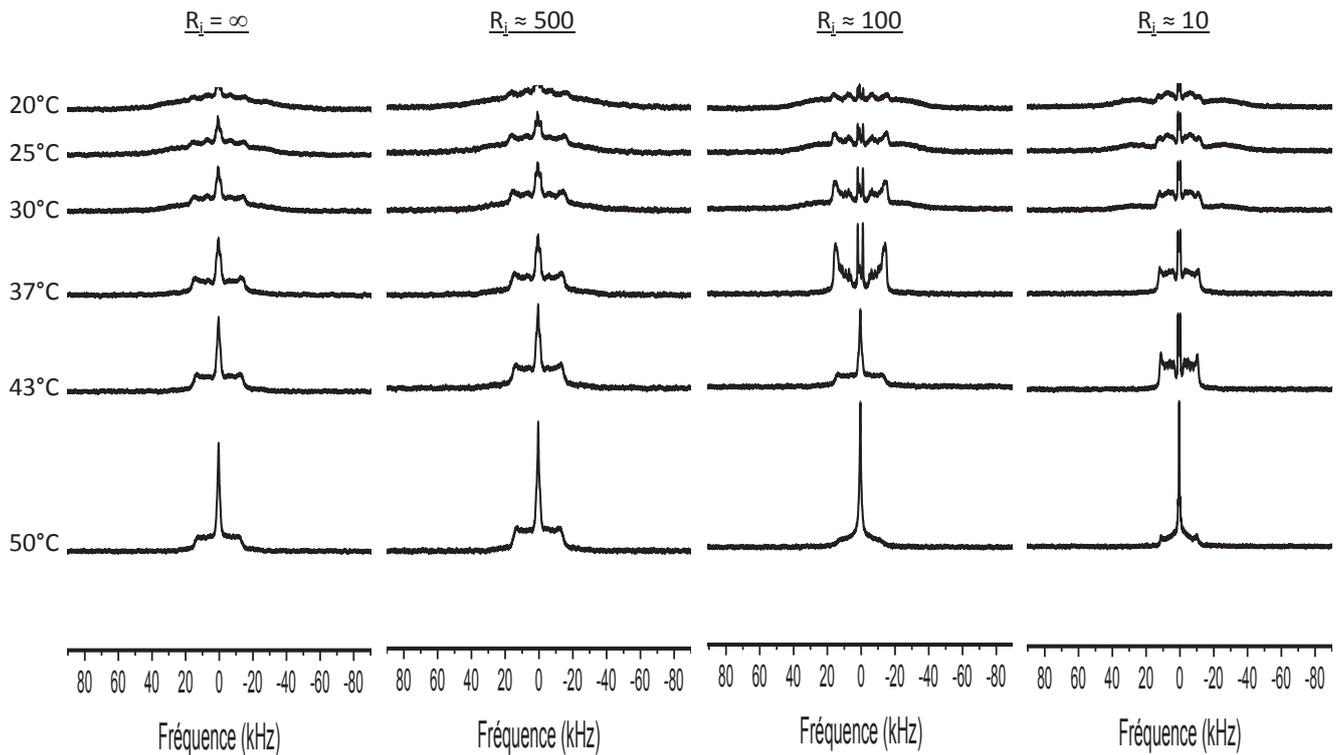


Figure 41. Spectres RMN du deutérium des membranes naturelles en présence de différentes concentrations de WRK.

Les spectres sont obtenus sur un spectromètre 800 MHz (soit une fréquence de 122,8 MHz pour le deutérium) à l'aide de la séquence d'Echo solide (Davis *et al.*, 1976). La longueur de l'impulsion de 90° est de 4,5 μ s (pour une puissance de 0dB) et la durée entre les impulsions de la séquence d'écho de 40 μ s. Le délai de relaxation est de 2 s. 5120 acquisitions sont additionnées pour chaque spectre. Un filtrage du bruit (LB= 150 Hz) est appliqué avant transformée de Fourier. Pour chaque expérience, les mesures sont réalisées de 20°C à 50°C avec un temps d'attente entre chaque expérience de 15 minutes pour assurer l'équilibre thermique (précision +/- 0,5°C). Le milieu du spectre est arbitrairement placé à 0 kHz.

A $R_i = \infty$, les spectres sont similaires à ceux obtenus avec les membranes modèles, mis à part la présence d'une fine raie isotrope, correspondant à une vésicularisation basale de notre échantillon, qui représente un très faible pourcentage du système. Ces vésicules peuvent être formées par les lipides, présents chez *L. pneumophila*, que nous n'avons pas intégré aux membranes modèles (acides gras branchés ou à chaînes courtes). D'autre part, la membrane est majoritairement en phase fluide dès 37°C au lieu de 43°C pour les membranes modèles. Ceci n'est pas très étonnant étant donné qu'il y a davantage de composants qui, même en faible quantité, contribuent à abaisser la température de la transition. Ces observations sont confirmées par le calcul des moments spectraux (**Figure 42 et annexe**). En effet, il y a peu de différence entre les valeurs des premiers moments des deux types membranaires. Toutefois, les valeurs pour les membranes naturelles sont légèrement plus faibles en phase gel (températures

basses) et légèrement plus élevées en phase fluide (températures hautes) que celles pour les membranes modèles.

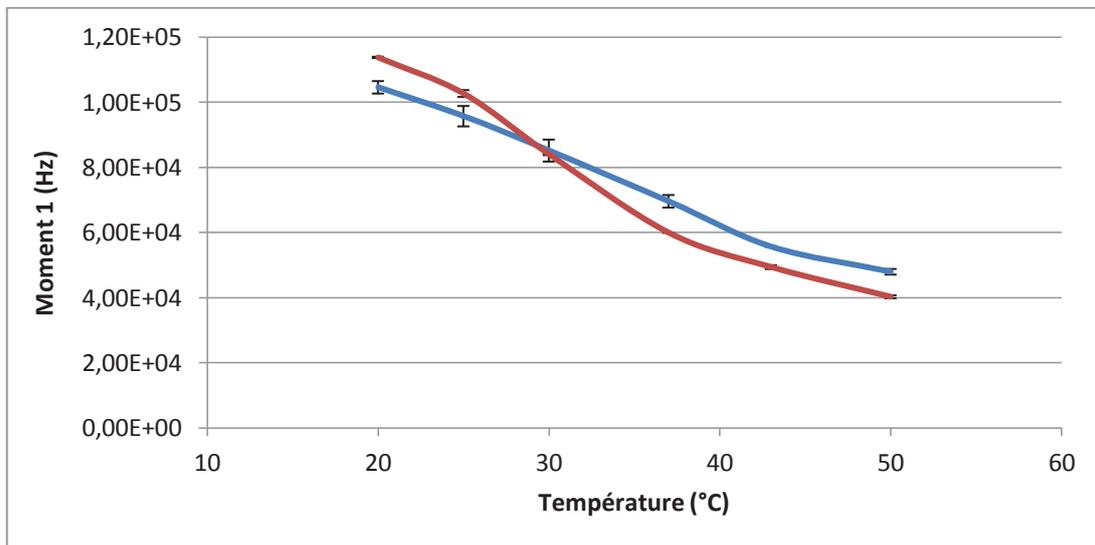


Figure 42. Calcul des premiers moments spectraux en fonction de la température pour les membranes modèles (rouge) et naturelles (bleu) à $R_i = \infty$ (sans peptide) en RMN du deutérium.

Malgré les légères différences observées, on peut cependant conclure que notre modèle de membrane constitué à partir des trois composants lipidiques majeurs représente une bonne modélisation du système naturel.

Tout comme en RMN du phosphore, le peptide, à faible concentration ($R_i \approx 500$), ne semble pas avoir d'effet sur la membrane, alors qu'il la modifie fortement lorsque sa concentration augmente ($R_i \approx 100$) (Figure 41). En effet, à faible température ($< 37^\circ\text{C}$), la phase isotrope en très faible proportion observée à $R_i = \infty$ n'est plus visible. De plus, à 37°C , le spectre obtenu est caractéristique d'un système qui subit une influence du champ magnétique. Les spectres sont en effet caractéristiques de liposomes légèrement déformés sous forme d'ellipsoïdes de révolution prolates dans le sens du champ magnétique. Ce phénomène a déjà été rencontré par Seelig (Seelig & Seelig, 1985) sur des membranes naturelles extraites et reconstituées. Enfin, lorsque la température augmente encore, le spectre s'arrondit à la base et une raie fine centrée sur 0 kHz apparaît. Ceci est caractéristique d'un système où l'effet de la rotation isotrope des liposomes commence à affecter la forme du spectre. La WRK conduit vraisemblablement, comme observé en RMN ^{31}P à la formation d'objets de taille moyenne qui tournent de plus en plus vite quand la température augmente. Ceci ne se produit qu'à haute température, lorsque toute la membrane est en phase fluide.

Le même phénomène est observé à $R_i \approx 10$. De plus, contrairement à ce qui a été remarqué en RMN du phosphore, aucune raie isotrope n'est visible, pour les basses températures, ce qui signifie que s'il y a effectivement une vésicularisation de la membrane à $R_i \approx 10$, PC, le seul phospholipide observé en RMN du deutérium, n'est pas retrouvé dans les petits objets créés. D'autre part, comme pour les membranes modèles, la partie « fluide » des spectres est plus étroite (**Figure 43**), et les éclatements quadrupolaires plus faibles (**Figure 44**) à $R_i \approx 10$ qu'aux autres ratios. Ceci confirme que le peptide, à très forte concentration, augmente le désordre au sein de la membrane.

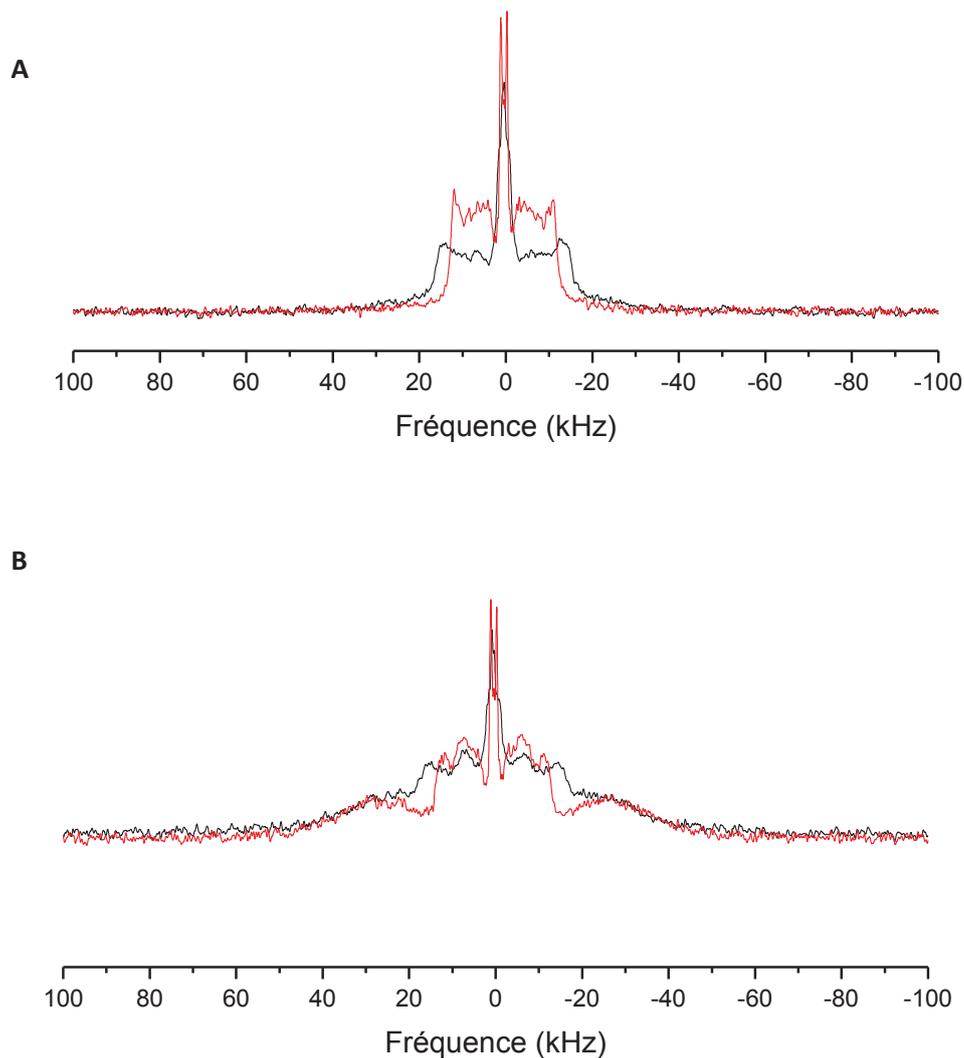


Figure 43. Superposition des spectres obtenus pour les membranes naturelles (A) à 30°C et (B) à 43°C, à $R_i = \infty$ (en noir) et $R_i = 10$ (en rouge).

Les spectres présentés ici sont des agrandissements de ceux de la figure 32. Les superpositions ont été réalisées à l'aide du logiciel Origin.

Les parties « gel » des deux spectres se superposent, alors que la partie « fluide » du spectre obtenu à $R_i = 10$ est plus étroite qu'à $R_i = \infty$.

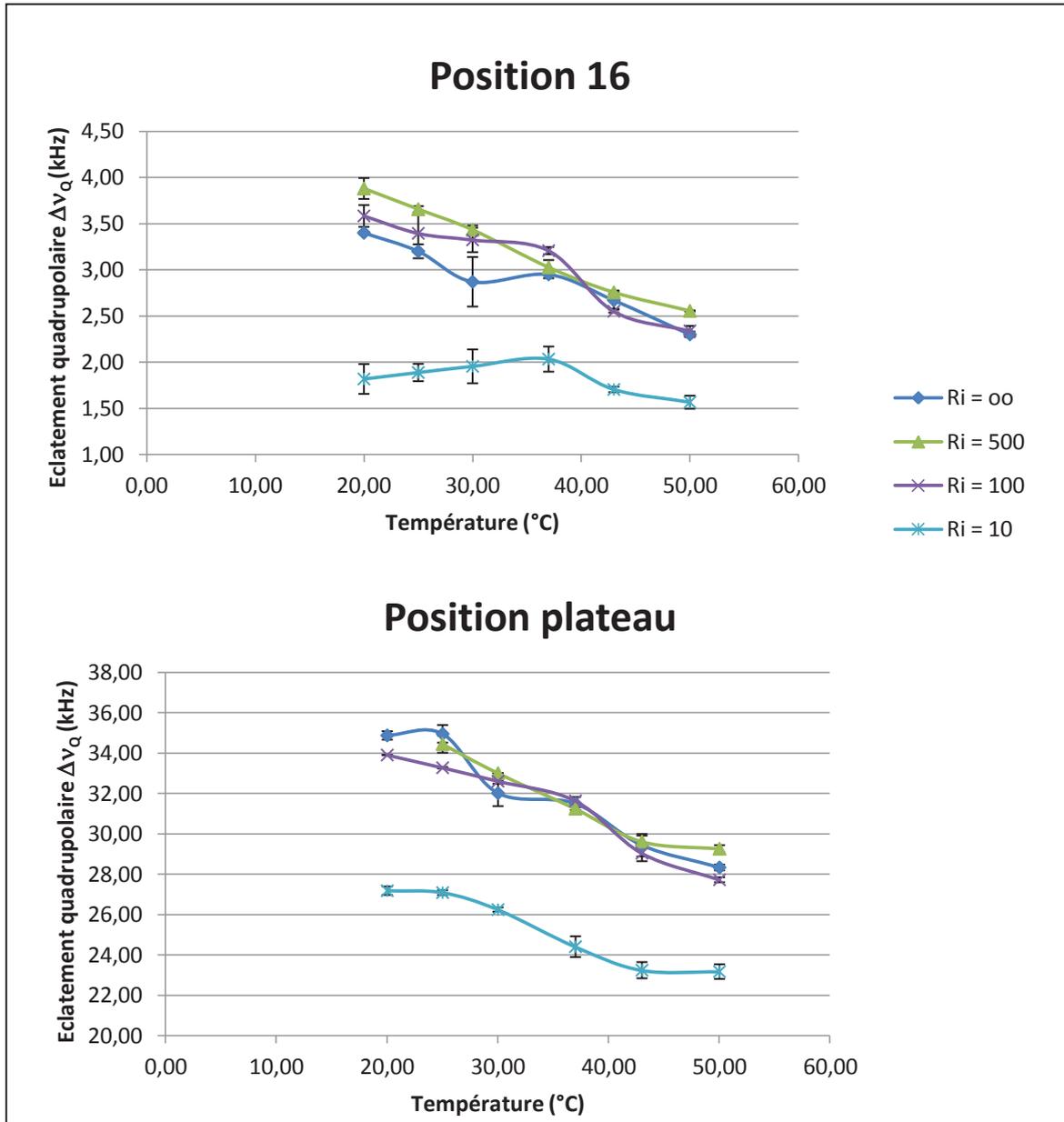


Figure 44. Éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ des positions 16 et plateau des spectres du deutérium des membranes naturelles en fonction de la température.

Les éclatements quadrupolaires ne prennent en compte que la partie des systèmes se trouvant en phase fluide, y compris pour les températures auxquelles il existe une coexistence phase fluide/phase gel.

Les valeurs de $\Delta\nu_Q$ sont les plus faibles à $R_i = 10$, ce qui signifie que le système est plus fluide.

La comparaison de l'ensemble de ces résultats permet de tirer plusieurs conclusions.

- **Validation du modèle membranaire.**

La confrontation des données pour les échantillons sans peptide ($R_i = \infty$) met en évidence que les spectres présentent des caractéristiques similaires. Ceci a été confirmé par la mesure des moments, qui sont du même ordre de grandeur, quelles que soient les conditions testées (**Figure 42 et annexe**). Ces résultats permettent de valider notre modèle de membrane. Par ailleurs, il faut noter que les valeurs des éclatements quadrupolaires sont légèrement plus élevées (15-20 %) pour les membranes naturelles, ce qui signifie que celles-ci sont globalement plus rigides et ordonnées que les membranes modèles. Cette observation, ainsi que les différences visibles entre les spectres sont dues au fait que les membranes naturelles ont une composition plus complexe que les membranes modèles puisqu'elles contiennent un pourcentage faible de lipides divers (acides gras branchés et à chaînes courtes) pouvant avoir une influence sur la structuration de la membrane.

Finalement, un lien peut être fait entre toutes ces observations et les résultats biologiques précédemment obtenus. La warnéricine RK présente une activité contre *Legionella* dont elle peut perméabiliser la membrane. Verdon *et al.* en 2009 ont suggéré que son mode d'action était de type « detergent-like » (Verdon *et al.*, 2009a).

Les résultats RMN confirment le fait que le peptide perméabilise les membranes. En effet, l'augmentation de la quantité de peptide cause une déstabilisation de la membrane qui aboutit, à $R_i \approx 100$, à une conversion importante de la phase lamellaire en objets de taille moyenne. Si la concentration en warnéricine RK augmente à $R_i \approx 10$, une grande partie de la phase lamellaire est alors convertie en petites vésicules. Toutefois, ce ratio n'étant pas significatif biologiquement, il est difficile de relier ces résultats à une activité biologique.

En revanche, le mode d'action « detergent-like » du peptide ne peut pas être confirmé à 100 % sur l'ensemble de la membrane.

Suite aux résultats obtenus en RMN, une hypothèse peut être réalisée sur le mode d'action de la WRK.

S'il existe une coexistence des forces électrostatiques et hydrophobes, le peptide pourrait interagir avec la membrane et s'y enfoncer légèrement, créant ainsi un « effet de coin », écartant localement les lipides (**Figure 45**). Ceci entraînerait une courbure de la membrane pouvant expliquer la conversion des MLVs ($\approx 1 \mu\text{m}$) en objets de taille moyenne ($\approx 0.5 \mu\text{m}$) chez les membranes naturelles à $R_i = 100$. En effet, une augmentation de la courbure de la membrane a tendance à favoriser la formation d'objets plus petits (ayant une membrane plus courbée).

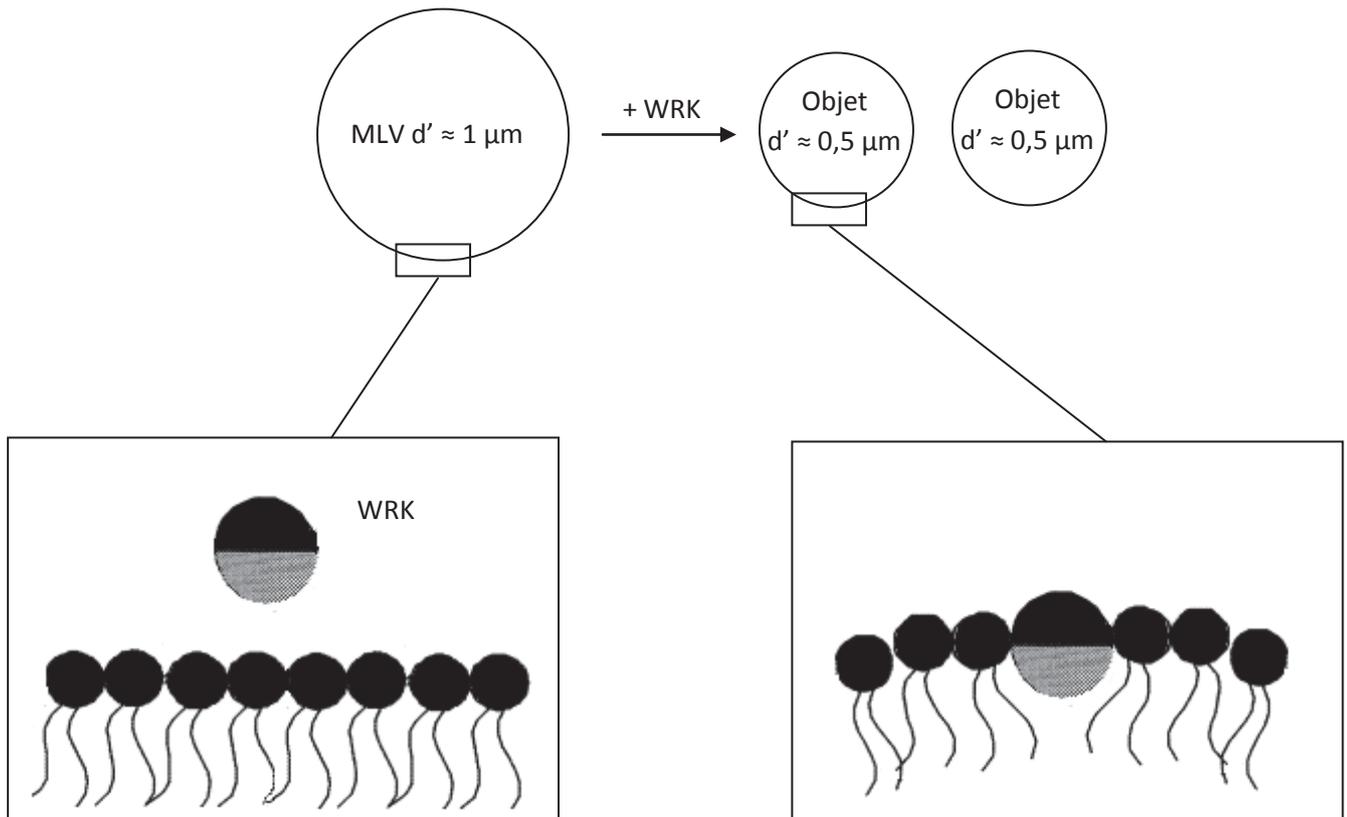


Figure 45. Schéma représentant « l'effet de coin » pouvant être induit par l'interaction de la WRK à la membrane.

La face hydrophobe de la WRK (en gris) interagit avec la partie hydrophobe de la membrane (acides gras) alors que la partie hydrophile (en noir) interagit avec les têtes polaires hydrophiles.

Si ce sont les interactions hydrophobes qui prédominent, plusieurs peptides pourraient s'associer pour former un pore traversant la bicouche lipidique. S'il existe une différence entre la longueur de la partie hydrophobe de l'hélice peptidique et l'épaisseur de la partie hydrophobe de la bicouche lipidique, un phénomène de « mismatch » hydrophobe peut alors avoir lieu (Kandasamy & Larson, 2006; Ramadurai *et al.*, 2010). Dans ce cas, plusieurs mécanismes sont mis en place afin que la membrane et le peptide aient la même épaisseur. La WRK est un peptide de 22 acides aminés, structuré en hélice alpha amphiphile des résidus 4 à 16, soit sur 14 acides aminés. La distance entre deux acides aminés dans une hélice α étant de 1,5 Å, l'hélice de la WRK mesure environ 21 Å de long. Quant à la bicouche lipidique, elle est composée majoritairement d'acides gras en C16, soit une épaisseur d'environ 25 Å (de Planque *et al.*, 1998). La membrane étant plus épaisse que l'hélice du peptide, un « mismatch » hydrophobe négatif peut donc avoir lieu (**Figure 46**).

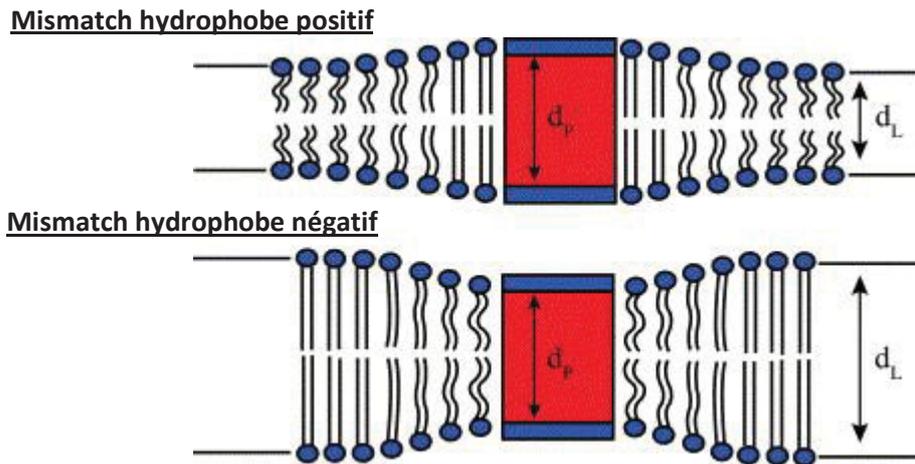


Figure 46. Représentation du phénomène de « mismatch » hydrophobe lorsque le peptide est plus long (en haut) ou plus court (en bas) que l'épaisseur de la membrane (Jensen & Mouritsen, 2004).

Parmi les différents mécanismes mis en place pour que les parties hydrophobes des lipides et du peptide correspondent, il y a la diminution de l'épaisseur de la membrane par fluidification de celle-ci ou recrutement d'acides gras à chaînes courtes à proximité du site d'insertion du peptide (Ramadurai *et al.*, 2010). La formation de micelles mixtes peptide/lipide étant ainsi favorisée, notamment avec des acides gras à chaînes courtes. Cette hypothèse est en accord avec ce qui a été observé à $R_i = 10$, c'est-à-dire une raie isotrope absente des membranes modèles (ne contenant pas d'acides gras à chaînes courtes), mais représentant environ 40 % du système chez les membranes naturelles (possédant ces acides gras). Ainsi, la WRK pourrait effectivement avoir un effet « detergent-like » à forte concentration mais seulement localement, dans des zones riches en acides gras courts.

Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait renouveler les expériences de RMN en utilisant des MLVs constitués d'acides gras à chaînes courtes, et regarder si la présence de peptide à forte concentration convertit l'ensemble de la membrane en petits objets. Si c'est le cas, cela prouverait l'implication des acides gras à chaîne courte dans la perméabilisation des membranes de *Legionella* par la WRK.

2. Microscopie électronique à balayage

A la suite des résultats obtenus en RMN du solide, nous avons souhaité observer l'effet de la warnéricine RK directement sur des *Legionella* vivantes et non plus sur des vésicules mimant les membranes de cette bactérie.

Pour cela, des suspensions de *L. pneumophila* en phase exponentielle de croissance ont été mises en présence de 0,6 ou 2,5 μM de warnéricine RK. Les bactéries ont ensuite été fixées au glutaraldéhyde puis déposées sur lamelle. Après séchage, elles ont pu être observées en microscopie électronique à balayage.

Ces concentrations ont été choisies en fonction des résultats obtenus lors de l'étude des activités anti-*Legionella* du peptide (Publication 2). En effet, ses CMI et CMP sont égales à 1,2 μM . Cela signifie qu'à partir de cette concentration, le peptide inhibe la croissance de 100 % des *Legionella* et perméabilise les membranes de plus de 90 % d'entre elles.

Ainsi, à 2,5 μM , le double des CMI et CMP, nous espérons observer une destruction totale des bactéries, alors qu'à 0,6 μM (la moitié de ces activités), un effet modéré du peptide pourrait être observé.

Les images obtenues en microscopie électronique à balayage sont présentées dans la **figure 47**.

En absence de peptide (WRK 0 μM), les *Legionella* sont sous forme bacillaire et mesurent environ 0,5 μm de large et de 2 à plus de 10 μm de long, ce qui correspond aux données de la littérature. Leur membrane est globalement lisse et homogène.

Quand la WRK est ajoutée en concentration modérée (0,6 μM), les bactéries sont clairement affectées. Des morceaux entiers de membranes, d'un diamètre pouvant aller jusqu'à 0,4 μm , semblent avoir été arrachés. Toutefois, les bactéries conservent encore une forme globalement bacillaire.

Au contraire, quand le peptide est ajouté à forte concentration (2,5 μM), la plupart des *Legionella* sont totalement désagrégées. Parmi cet amas de débris cellulaires, quelques bactéries sont encore observables. La plupart de celles-ci, totalement intactes, font peut-être partie d'une population résistante au peptide.

Ces résultats confirment les hypothèses émises, c'est-à-dire une perméabilisation modérée de la membrane à faible concentration en WRK et une destruction totale de celle-ci lorsque le peptide est présent à forte concentration. Ces résultats de microscopie sont donc en accord avec les activités anti-*Legionella* déterminées précédemment (**Publication 2**).

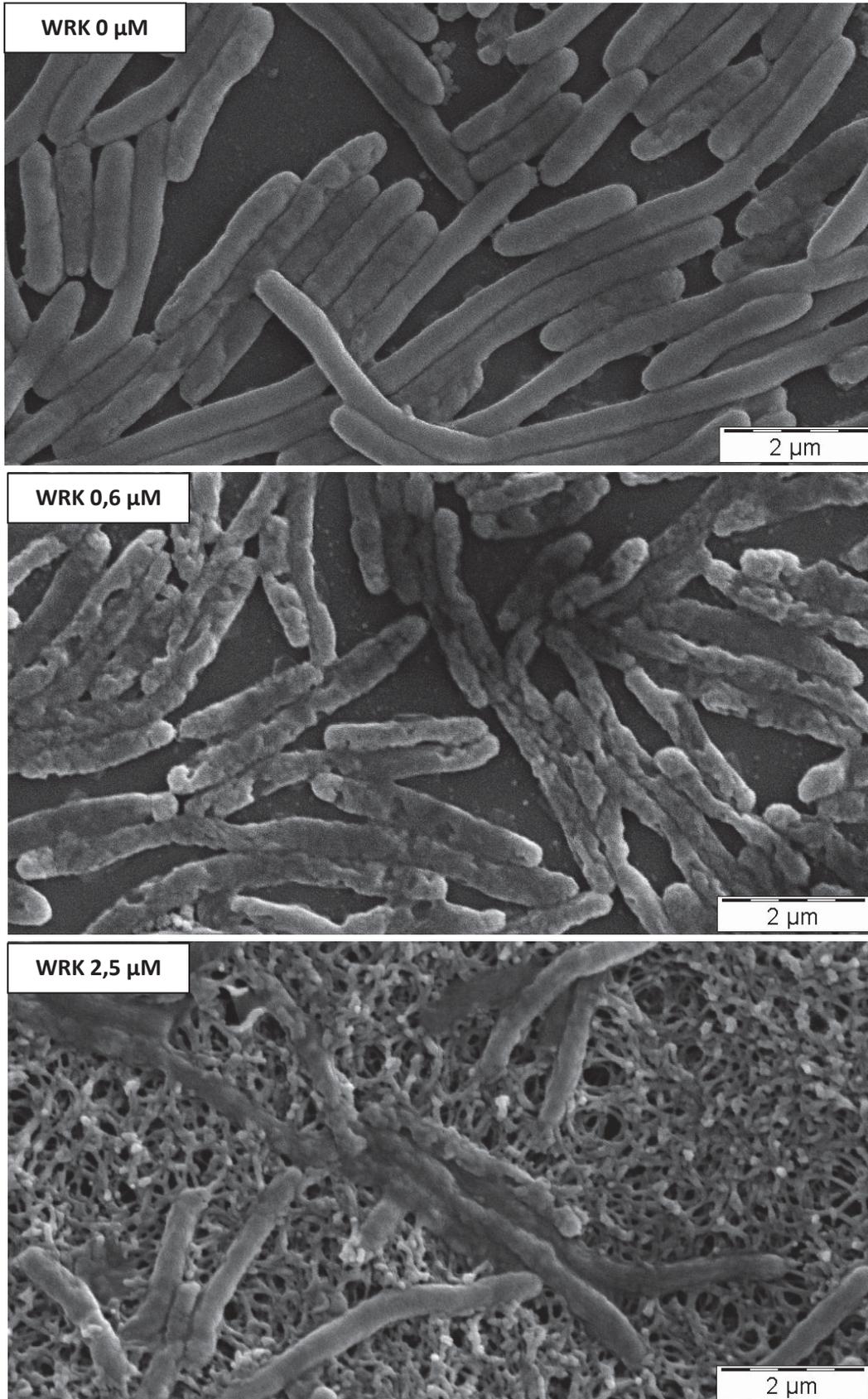


Figure 47. Microscopie électronique à balayage de *L. pneumophila* en présence de différentes concentrations de WRK.

B. Activité anti-cancéreuse de la warnéricine RK

Parmi les peptides antimicrobiens, certains présentent également une activité anti-cancéreuse. Ils sont classés en deux groupes, ceux qui sont très actifs contre les bactéries et les cellules cancéreuses mais inactifs contre leurs équivalents non cancéreux (cécropine, magainine...), et ceux qui sont actifs contre les bactéries, les cellules cancéreuses et leurs équivalents non cancéreux (mélittine...) (Chen *et al.*, 1997; Cruciani *et al.*, 1991; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Hui *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1994).

La warnéricine RK présentant une activité anti-microbienne mais également une activité hémolytique, donc contre des cellules eucaryotes, nous avons voulu savoir si elle présentait également une activité anti-cancéreuse.

Ce travail a été réalisé par une stagiaire en Master 2 recherche, Clémence Loiseau, sous ma direction.

1. Activité de la WRK contre des cellules cancéreuses.

Les trois types cellulaires utilisés dans cette étude sont des lignées leucémiques. Les leucémies sont des affections hématologiques malignes caractérisées par la prolifération incontrôlée, dans la moelle osseuse, de cellules hématopoïétiques. Ces dernières sont notamment à l'origine des leucocytes (globules blancs), qui jouent un rôle important dans l'immunité, et qui sont séparés en deux groupes : les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les cellules mononuclées (lymphocytes T et B, et monocytes).

Quatre types de leucémies ont été décrits, selon leur évolution (aigüe ou chronique) et la lignée cellulaire impliquée (cellules lymphoïdes ou myéloïdes) (**Figure 48**).

Les leucémies aigües sont caractérisées par une évolution clinique rapide et par la prolifération de cellules bloquées à un stade précoce de leur différenciation, appelées « blastes » alors que les leucémies chroniques sont caractérisées par une évolution clinique plus longue et par la prolifération de cellules à un stade avancé de leur différenciation vers les globules du sang.

Les cellules lymphoïdes sont les précurseurs des lymphocytes T et B, alors que les cellules myéloïdes sont ceux des érythrocytes, polynucléaires et monocytes.

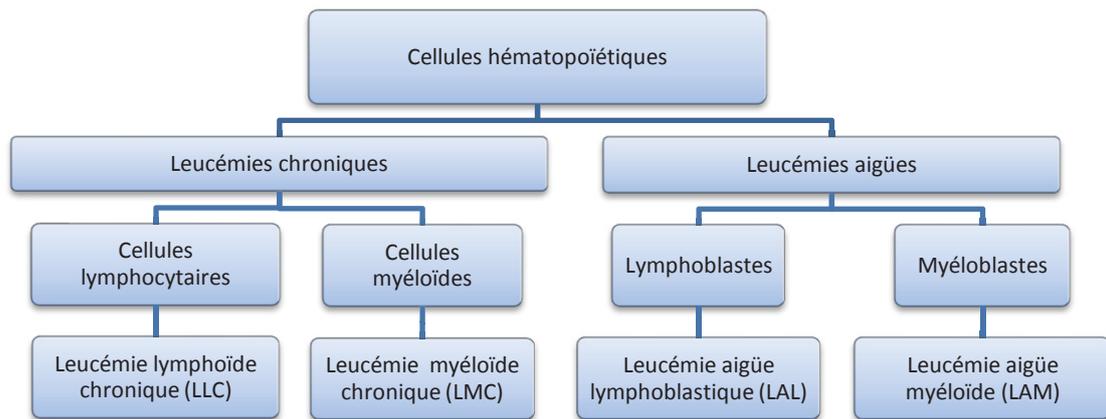


Figure 48. Les quatre grands types de leucémie (d'après <http://www.ligue-cancer.net>).

LLC : leucémie lymphoïde chronique ; **LMC** : leucémie myéloïde chronique ; **LAL** : leucémie aiguë lymphoblastique et **LAM** : leucémie aiguë myéloïde.

Dans ce travail, trois des quatre types de leucémies ont pu être étudiés. Il s'agit des leucémies aiguës lymphoblastiques représentées par la lignée cellulaire **JURKAT**, des leucémies aiguës myéloïdes représentées par des cellules de la lignée **KG1** et enfin des leucémies myéloïdes chroniques représentées par la lignée cellulaire **K562**.

La capacité de perméabilisation de chacune de ces lignées cellulaire par la warnéricine RK a été étudiée par cytométrie en flux (**Figure 49**).

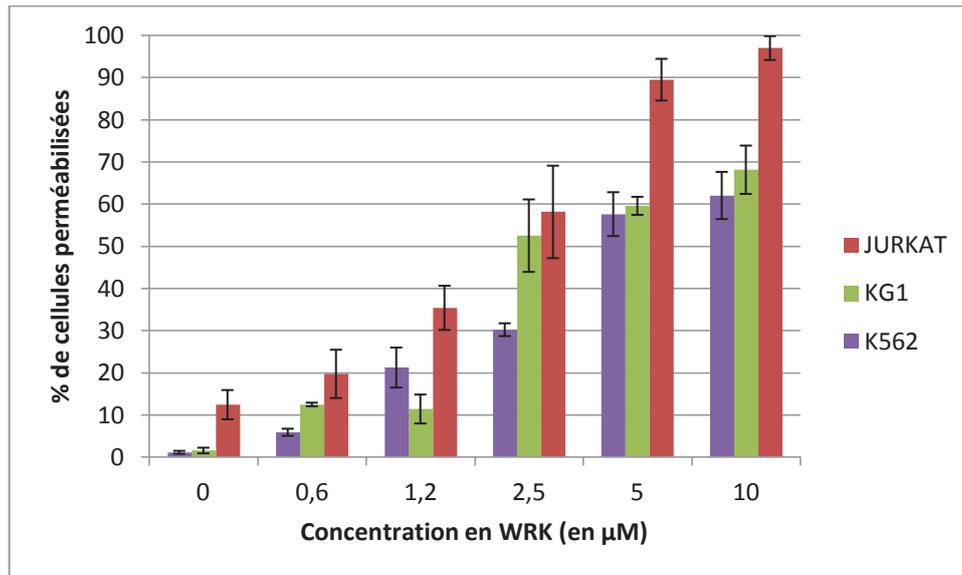


Figure 49. Pourcentage de perméabilisation de cellules JURKAT (rouge), KG1 (vert) et K562 (violet) en présence de concentrations croissantes de warnéricine RK.

Ces résultats correspondent à deux expériences indépendantes.

Plus de 50 % des cellules JURKAT et KG1 sont perméabilisées dès que la concentration en warnéricine RK atteint 6 μM , et 12 μM pour les cellules K562. La warnéricine RK possède donc une activité anti-cancéreuse, et notamment contre les cellules JURKAT pour lesquelles la perméabilisation atteint plus de 90 % à 25 μM de WRK.

Pour chaque condition, la viabilité cellulaire a été déterminée par comptage des cellules après marquage au bleu de Trypan (marqueur de viabilité) (données non montrées) ce qui a permis de confirmer que la perméabilisation membranaire observée en cytométrie est bien liée à une mort cellulaire.

L'effet de la warnéricine RK a ensuite été observé par microscopie (**Figure 50**).

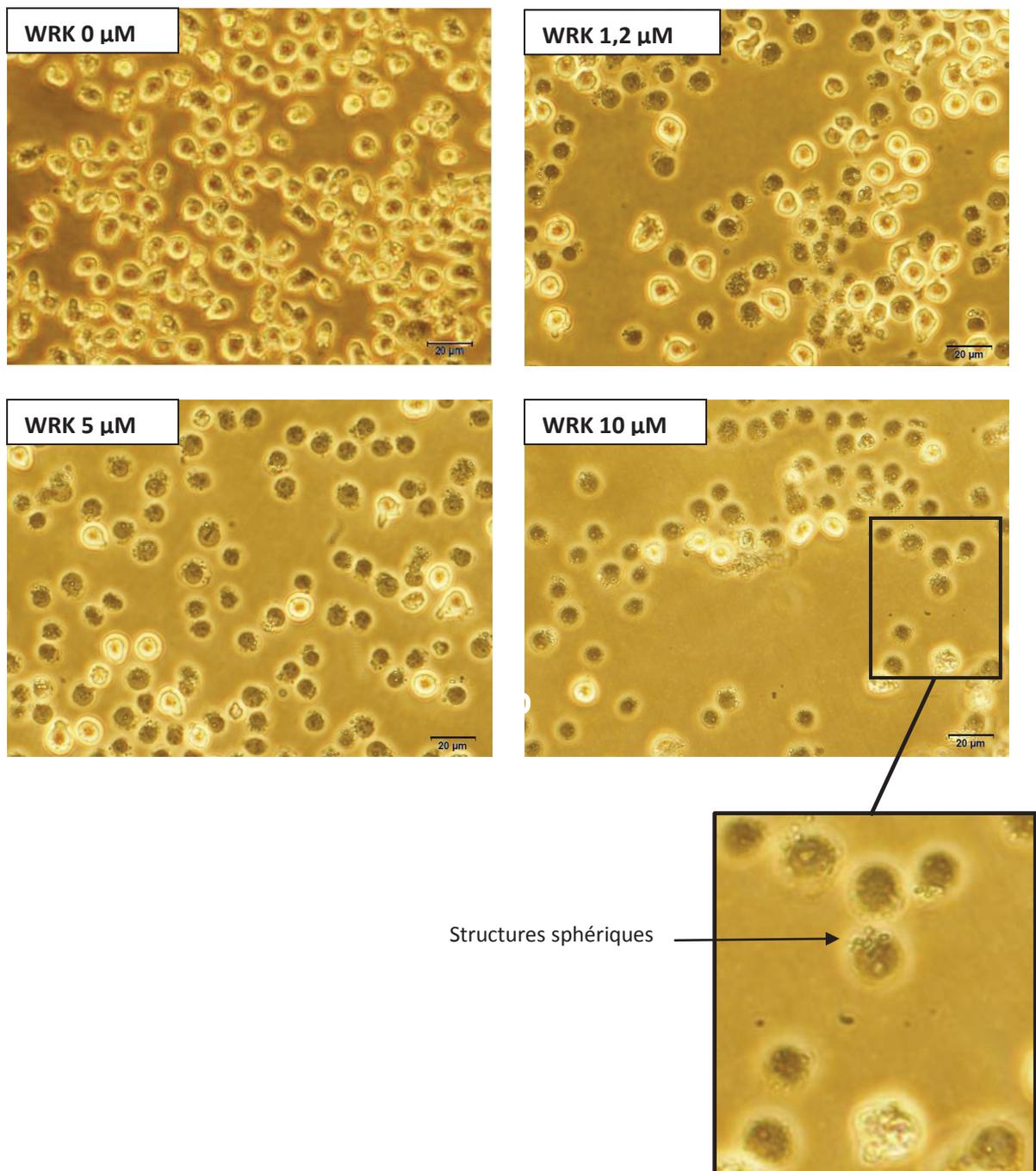


Figure 50. Observation microscopique de cellules leucémiques KG1 en présence de concentrations croissantes de warnéricine RK.

Des structures sphériques sont observées à la surface des cellules affectées par le peptide (photo zoomée)

En absence de peptide, les cellules présentent les caractéristiques de cellules vivantes, puisqu'elles sont réfringentes et de formes hétérogènes. Lorsque la concentration en peptide augmente, les cellules s'arrondissent, perdent leur réfringence et la densité cellulaire globale diminue, ce qui confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux et en comptage des cellules, à savoir une activité inhibitrice de la warnéricine RK contre ces cellules.

De plus, les cellules affectées par le peptide semblent perdre leur intégrité membranaire. En effet, des structures sphériques (**Figure 50, photo zoomée**) sont observées à leur surface. Elles pourraient correspondre à des vésicules membranaires qui se séparent des cellules, pouvant indiquer une lyse de celles-ci par le peptide. Il est à noter que la proportion de cellules lysées augmente avec la concentration en warnéricine RK.

2. Activité de la WRK contre des cellules mononuclées saines.

Les cellules mononucléées humaines saines (CMN) sont l'équivalent non cancéreux des cellules testées précédemment. Elles constituent une partie des leucocytes dont les principaux représentants sont les monocytes et les lymphocytes.

L'activité de la warnéricine RK sur ces cellules a été étudiée, comme précédemment, par cytométrie en flux (**Figure 51**) et par comptage des cellules après leur marquage au bleu de Trypan.

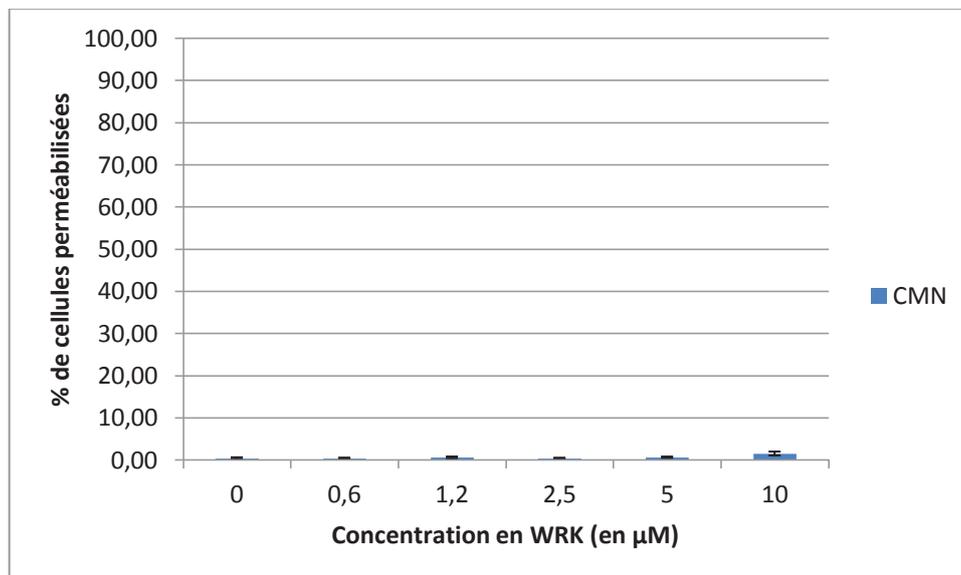


Figure 51. Pourcentage de perméabilisation de cellules mononucléées humaines saines (CMN) en présence de concentrations croissantes de warnéricine RK.

Ces résultats correspondent à deux expériences indépendantes.

La warnéricine RK, quelle que soit sa concentration, n'a aucun effet sur les CMN, résultat confirmé par comptage cellulaire.

Une des différences entre les CMN et les cellules leucémiques est l'augmentation du taux de phosphatidylsérine au sein des membranes des cellules cancéreuses. Ceci entraîne une augmentation de la charge négative de ces membranes, ce qui peut faciliter leur interaction avec la warnéricine RK, cationique, et ainsi expliquer en partie l'activité sélective du peptide.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure à une activité anti-cancéreuse de la warnéricine RK. Tout comme la cécropine et la magainine, ce peptide est très actif contre les cellules cancéreuses mais totalement inactif contre leurs équivalents sains (cellules mononucléées). Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet, sous la référence 1000114697 (Berjeaud *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les trois objectifs de cette étude étaient de rechercher des peptides anti-*Legionella* produits par diverses souches de *Staphylococcus*, puis d'identifier les motifs peptidiques responsables des activités anti-*Legionella* et hémolytiques de la WRK et de la PSM α et enfin de poursuivre l'étude du mécanisme d'action de la WRK.

La première partie de l'étude concernant la recherche de nouveaux peptides anti-*Legionella* a permis d'en identifier onze nouveaux (en plus de la WRK), produits par cinq souches de *Staphylococcus*. Les activités anti-*Legionella* et hémolytiques de ces peptides ont été déterminées, ce qui a permis de les séparer en deux groupes. Les peptides du groupe 1, représentés par la WRK, peptide bactéricide et très hémolytique, pourraient agir selon un mécanisme « detergent-like » à forte concentration, mais par formation de pores à faible concentration. Quant aux peptides du groupe 2, représentés par la PSM α , qui est un peptide bactériostatique et peu hémolytique, ils agiraient par formation de pores, quelle que soit la concentration peptidique. Ces hypothèses devront être confirmées par une étude plus poussée du mode d'action de ces peptides, notamment de la WRK et la PSM α , les deux peptides modèles (des propositions d'expériences réalisables sont détaillées en fin de chapitre).

Cette étude a également permis de développer une nouvelle méthode de purification en deux étapes chromatographiques, rapide et efficace. Toutefois, ce sont essentiellement des peptides formylés sur leur méthionine N-terminale qui ont été purifiés. Cette formylation semble augmenter l'activité anti-*Legionella* des peptides.

Enfin, les structures tridimensionnelles de la PSM α et de la WRK, sous leurs formes formylées ou non, ont été déterminées en dichroïsme circulaire. Cela a permis de confirmer que ces peptides se structurent en hélice alpha, notamment la WRK sous sa forme formylée. D'autre part, les résultats obtenus en dichroïsme circulaire laissent penser que la PSM α , formylée ou non, agirait sous forme de monomère, contrairement à la WRK. Ces deux peptides ont donc des structures différentes, même s'ils sont tous les deux majoritairement sous forme d'hélice alpha. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec prudence. En effet, l'expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. De plus, les résultats de déconvolution obtenus sont dépendants du logiciel utilisé. Pour confirmer ces résultats, il faudrait d'une part répéter l'expérience, puis dans l'idéal, analyser les peptides en RMN des liquides, comme cela a été fait pour la WRK non formylée, confirmant sa structuration en hélice α amphiphile, bien définie entre les résidus 4 et 16 (Verdon2009).

La première partie de cette étude a donc permis de sélectionner deux peptides modèles présentant des structures, des activités et sans doute des modes d'actions différents.

La seconde partie de ce travail a consisté à réaliser une étude structure-activité de la WRK et de la PSM α , pour d'identifier les résidus importants dans leurs activités anti-*Legionella* et/ou hémolytique, afin, dans l'idéal, de définir la séquence d'un peptide anti-*Legionella* non hémolytique. Pour cela, les séquences de la WRK et de la PSM α ont été modifiées de façon à

obtenir 23 peptides permettant de passer de chacun d'entre eux à la séquence inversée de l'autre. Les activités anti-*Legionella* et hémolytiques de ces peptides synthétiques ont été déterminées, ce qui a permis d'identifier des résidus importants, notamment la substitution d'une glycine par une lysine en position 14 de la PSM α (PSM_G14K). En effet, ce remplacement suffit à rendre la PSM α bactéricide, sans augmenter son activité hémolytique. Ce peptide modifié se rapproche donc du « peptide idéal » recherché. De la même façon le remplacement de la phenylalanine 14 de la WRK par une valine rend le peptide obtenu (WRK_F14V) faiblement hémolytique sans lui retirer son activité bactéricide. La substitution d'une lysine par une arginine en position 22 de la PSM α (PSM_22R) est également apparue importante car elle permet d'augmenter l'activité anti-*Legionella* du peptide, qui reste toutefois bactériostatique, tout en lui enlevant son activité hémolytique. Il serait donc intéressant d'effectuer cette mutation (K22R) sur la WRK, la PSM_G14K et la WRK_F14V afin d'essayer de diminuer voire d'abolir leur activité hémolytique tout en conservant leur activité anti-*Legionella*.

Au cours de cette seconde partie, la capacité des peptides synthétiques à perméabiliser des vésicules de compositions lipidiques différentes a également été évaluée. Ces résultats ont tout d'abord permis de mettre en évidence le fait que la présence de PC dans les membranes modèles rend celles-ci plus sensible à la perméabilisation par les peptides. Nous avons alors voulu déterminer si l'ajout de PC à des membranes de *E. coli*, bactérie insensible aux peptides, rend possible leur perméabilisation. Mais il n'a pas été possible de former des vésicules avec uniquement les lipides extraits de *E. coli*, un ajout de 30 % de PG aux membranes ne contenant pas de PC ayant été nécessaire. Il serait pourtant intéressant de poursuivre ces essais. Pour cela, plusieurs expériences sont possibles. Par exemple, nous pourrions ajouter 30 % de PG à la fois dans les membranes composées des lipides extraits de *E. coli* mais aussi dans celles supplémentées avec PC. Toutefois, même si cette technique permettrait de mieux étudier l'effet de PC sur la sensibilité aux peptides, les membranes ainsi composées ne seraient plus vraiment représentatives des membranes de *E. coli*. Une autre possibilité serait d'incorporer du PC dans le milieu de culture de *E. coli* puis de vérifier par spectrométrie de masse si la bactérie l'a incorporé dans sa membrane, et, si c'est le cas, nous pourrions alors comparer la sensibilité aux peptides de cette bactérie avec celle de la même souche cultivée sur milieu non enrichi en PC.

D'autre part, le calcul, pour une partie des peptides, des énergies libres de Gibbs de liaison à la membrane et d'insertion dans celle-ci a permis de poursuivre l'étude de leurs modes d'action, notamment pour la WRK et la PSM α . Ainsi, il semblerait que la WRK agisse selon un mécanisme de « tout ou rien » à forte concentration, mais selon un mécanisme « progressif » à faible concentration. Au contraire, la PSM α agirait selon un mécanisme « progressif », quelle que soit la concentration peptidique. Ces hypothèses concordent avec celles émises dans la première partie de l'étude.

Enfin, la troisième partie de cette étude a consisté à essayer de comprendre le mécanisme d'action de la WRK.

Tout d'abord, son interaction avec les membranes a été étudiée en RMN du solide ^{31}P et ^2H . Ces expériences ont permis d'observer l'interaction peptide/lipide du point de vue membranaire. Les résultats de RMN ont confirmé que le peptide déstabilise les membranes de *L. pneumophila*, mais ne les désagrège jamais totalement. Il semblerait également que des petites vésicules soient formées en présence de WRK et qu'elles seraient composées de PE et/ou CL, mais pas de PC. De plus, les acides gras à chaînes courtes retrouvés dans les membranes naturelles de *L. pneumophila*, et non dans les membranes modèles, semblent jouer un rôle important dans l'interaction du peptide à la membrane et dans la formation des petites vésicules. Pour vérifier ces hypothèses, il faudra réaliser de nouvelles expériences de RMN du ^{31}P et du ^2H , mais avec des vésicules de composition lipidiques différentes. Tout d'abord, il faudra tester des MLVs contenant un seul type de phospholipide à la fois (PC, puis PE, puis CL) afin de confirmer l'importance de l'un ou l'autre des lipides dans l'interaction du peptide avec les membranes. D'autre part, il faudra réaliser des MLVs constituées de phospholipides contenant des acides gras à chaînes courtes pour voir si en leur présence, le peptide est capable de convertir l'ensemble de la membrane en petits objets. Le mode d'action de la PSM α étant différent de celui de la WRK, il sera également intéressant de renouveler l'ensemble de ces expériences RMN avec la PSM α . L'ensemble de ces résultats RMN ne semblent pas en accord avec les activités biologiques et les résultats de libération de calcéine qui laissent penser à un rôle important de PC pour la perméabilisation membranaire. Il faudra donc continuer ces études pour déterminer le rôle exact de PC et CL dans l'activité de la WRK.

L'action de la WRK sur *L. pneumophila* a ensuite été observée par microscopie électronique à balayage. Le peptide semble perméabiliser la membrane bactérienne à faible concentration, mais totalement la désagréger à forte concentration. Ces résultats ne sont pas en accord avec ce qui a été observé en RMN à forte concentration peptidique. Les composants non lipidiques de la membrane bactérienne, comme les protéines, pourraient peut-être jouer un rôle, en participant, par exemple, à la création de rafts lipidiques. Pour vérifier cela, il faudrait réaliser à nouveau des expériences de RMN du solide, mais avec des « fantômes » de légionelles, comme cela a été effectué pour les érythrocytes (Dodge *et al.*, 1963). Ces fantômes sont des cellules de taille et forme identiques à celles de départ, mais vidées de leur contenu cellulaire. Elles permettraient ainsi, par comparaison avec les résultats de RMN déjà obtenus, de déterminer l'impact des composants non lipidiques sur l'action du peptide.

D'autre part, il faudra également réaliser des observations en microscopie de l'action de la PSM α sur *L. pneumophila* pour comparer l'aspect des bactéries en présence de l'un ou l'autre des peptides.

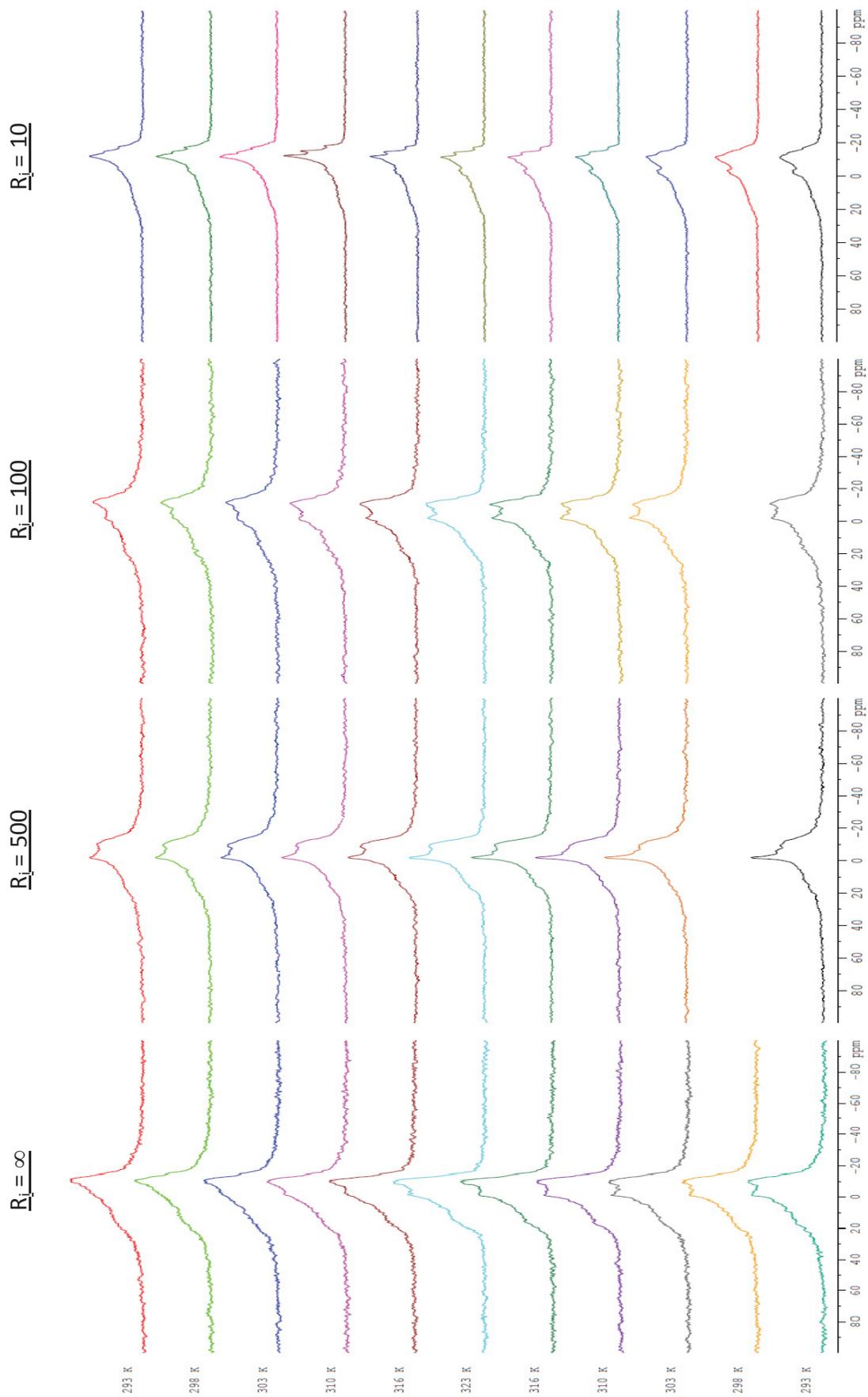
Enfin, l'activité anti-cancéreuse de la WRK a été étudiée. Ce peptide est très actif contre les cellules leucémiques mais totalement inactif contre les cellules saines. L'activité anti-cancéreuse d'autres peptides anti-*Legionella* devra être étudiée, notamment celle de la PSM_G14K, qui présente des activités similaires à la WRK sans être hémolytique. Il serait également intéressant de tester d'autres couples cellule saine/cellule cancéreuse rencontrées

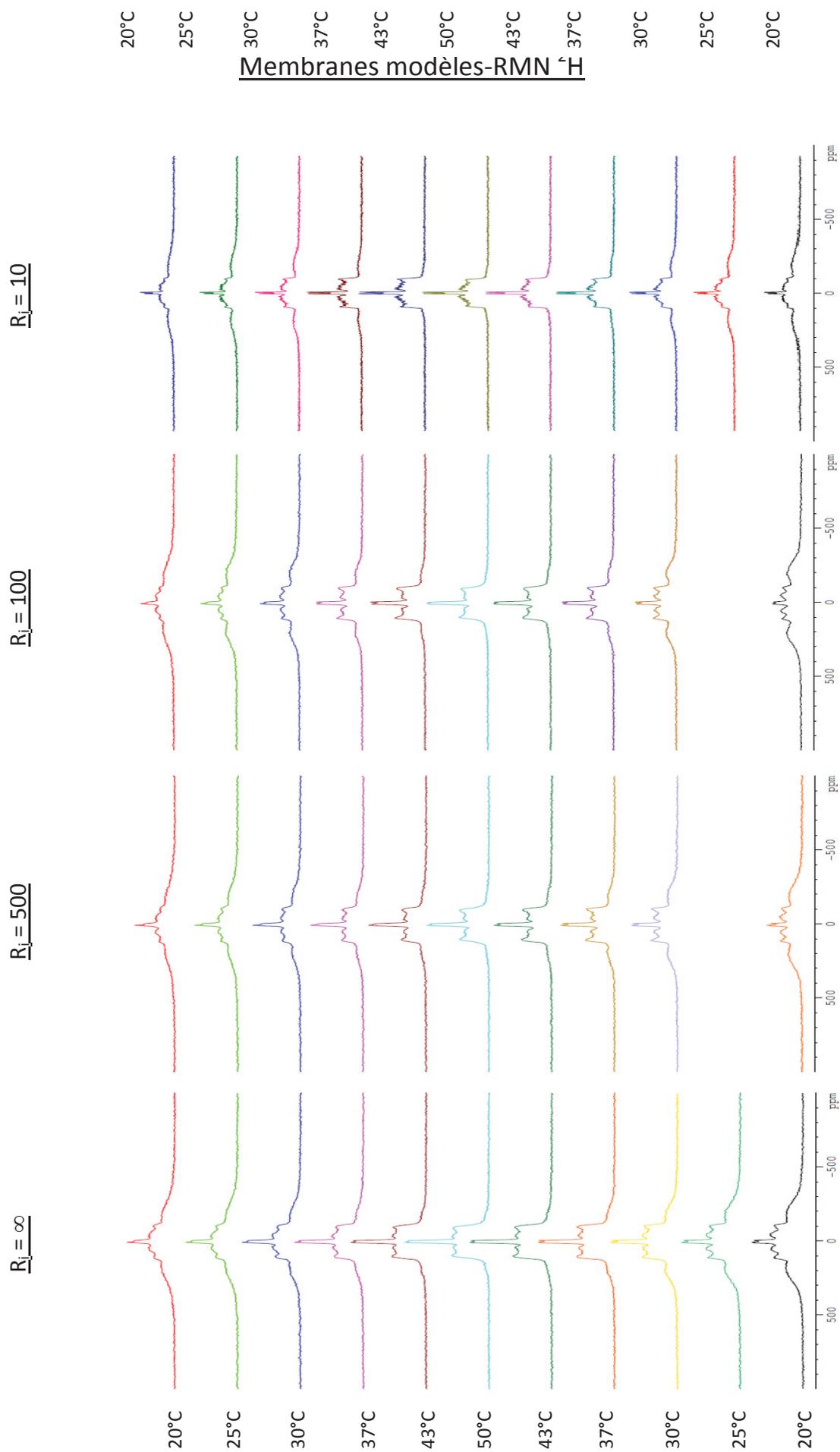
dans d'autres types de cancer, en particulier de tumeurs solides, afin de connaître le spectre anti-cancéreux de la WRK.

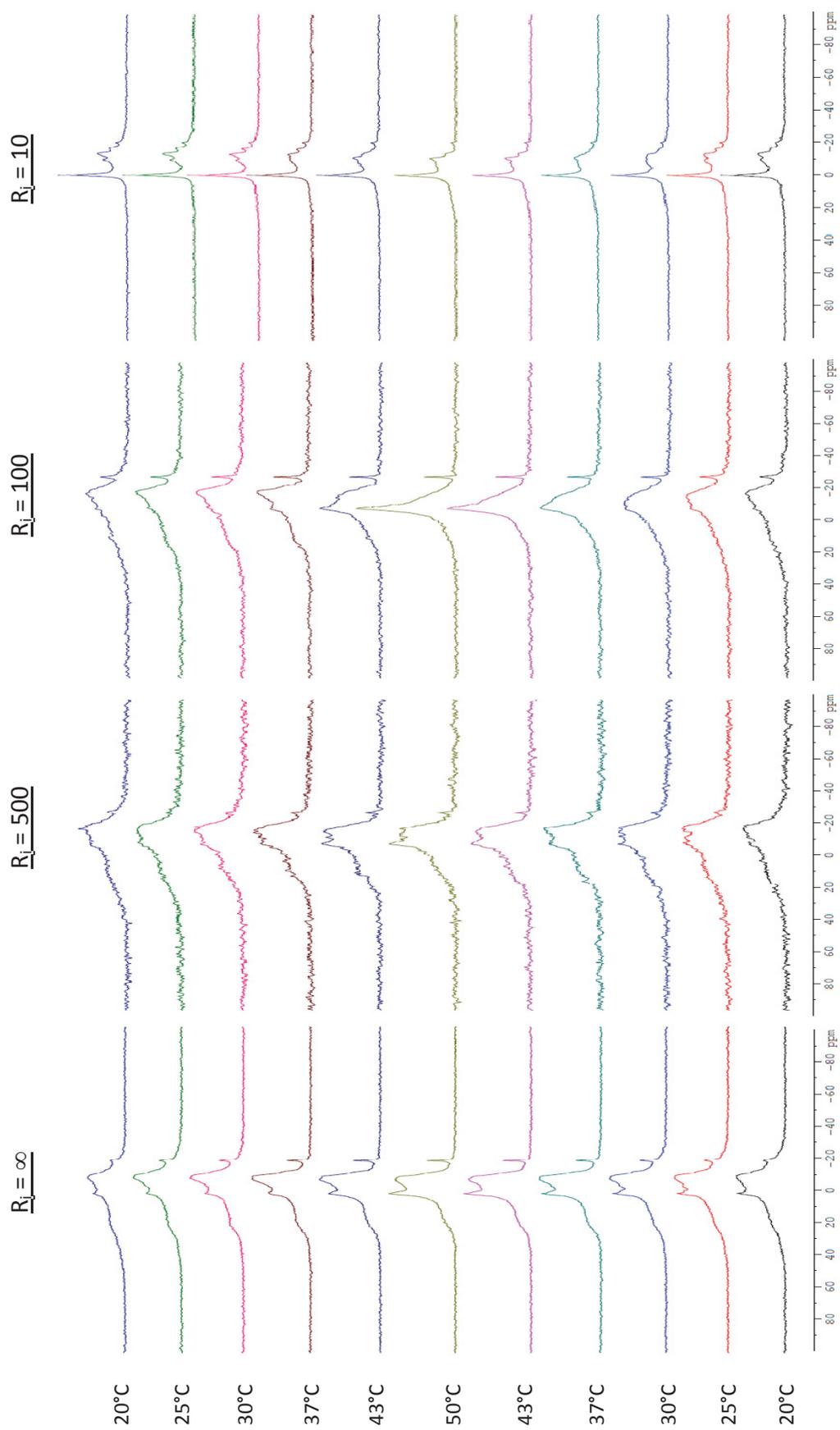
Pour conclure, l'ensemble de ces travaux a permis d'identifier notamment un nouveau peptide anti-*Legionella*, la PSM α , ainsi que trois de ses variants, les PSM_G14K et PSM_22R et la WRK_F14V. Par comparaison avec la WRK, ces quatre peptides possèdent des activités biologiques, et, sans doute, un mode d'action différents. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces peptides. Dans un premier temps, il faudrait caractériser leur structure tridimensionnelle par RMN du liquide, comme cela a été réalisé pour la WRK (Verdon 2009). Ensuite, il faudrait réaliser des mesures de conductance via l'utilisation de « black lipids » afin de savoir si les peptides ont plutôt tendance à déstabiliser les membranes ou à former des pores, et dans ce dernier cas, des expériences de protection osmotique permettraient de déterminer si ces peptides, contrairement à la WRK, forment des pores de taille définie (Verdon *et al.*, 2009a).

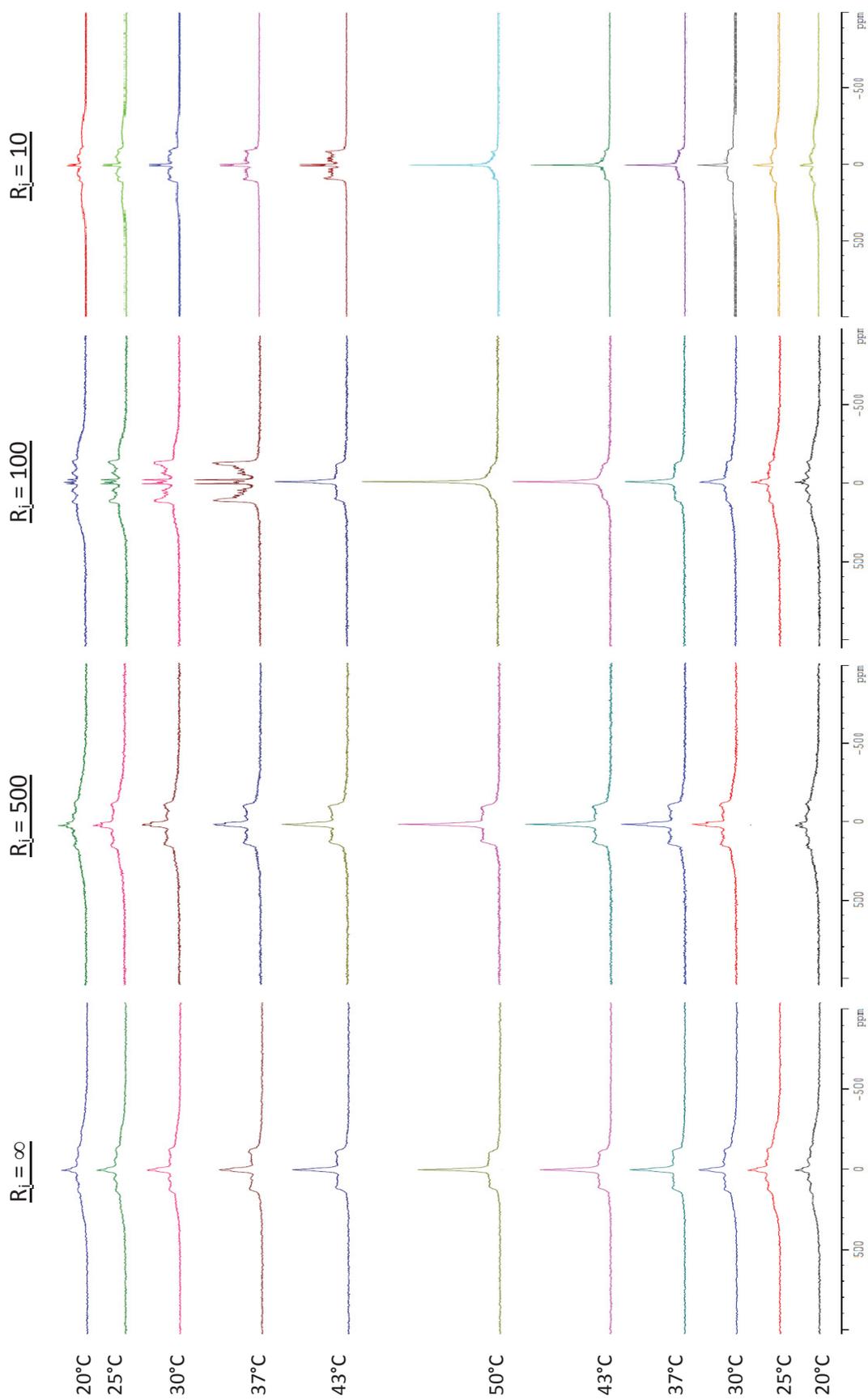
Pour avancer sur l'explication des mécanismes d'action de la WRK, des PSM, et des formes formylées de ces peptides, il faudrait étudier leur interaction avec les membranes mais du point de vue peptidique. Pour cela, plusieurs expériences pourraient être effectuées. Par exemple, il est possible de réaliser des spectres en dichroïsme circulaire orienté (Wu *et al.*, 1990) qui est une technique dérivée du dichroïsme circulaire mais permettant de déterminer la configuration et l'orientation des peptides dans des multicouches lipidiques orientées. Cela serait également possible par une étude des peptides en RMN du solide ^{15}N ou ^{13}C , après marquage des noyaux azotes ou carbones des peptides. Cette technique permettrait de compléter les résultats RMN obtenus en observant, cette fois-ci, les interactions peptide/membrane du point de vue peptidique.

ANNEXES

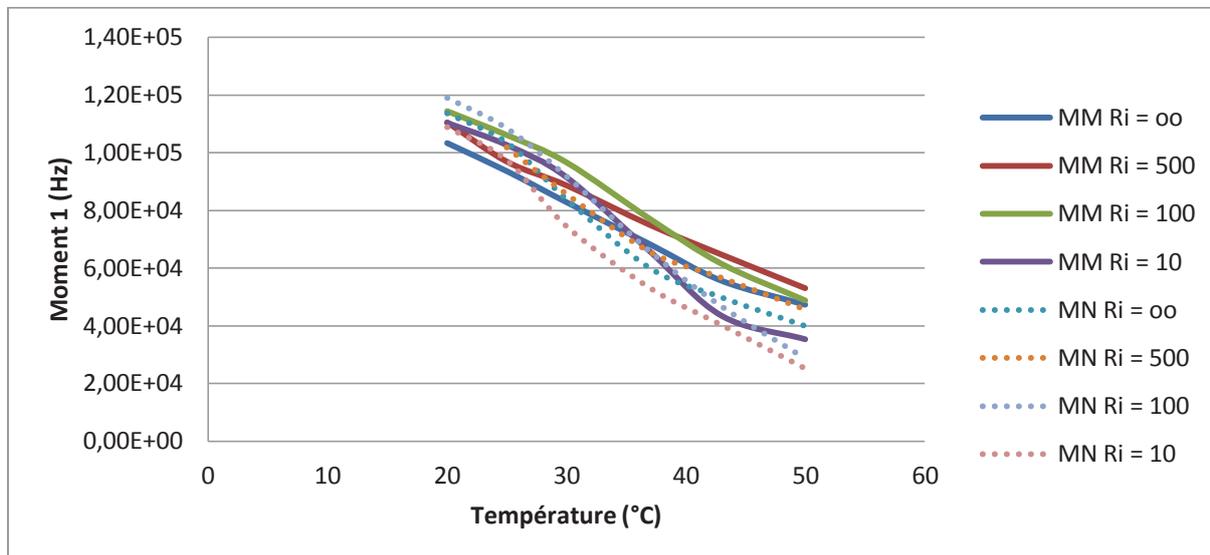
Membranes modèles-RMN ^{31}P 



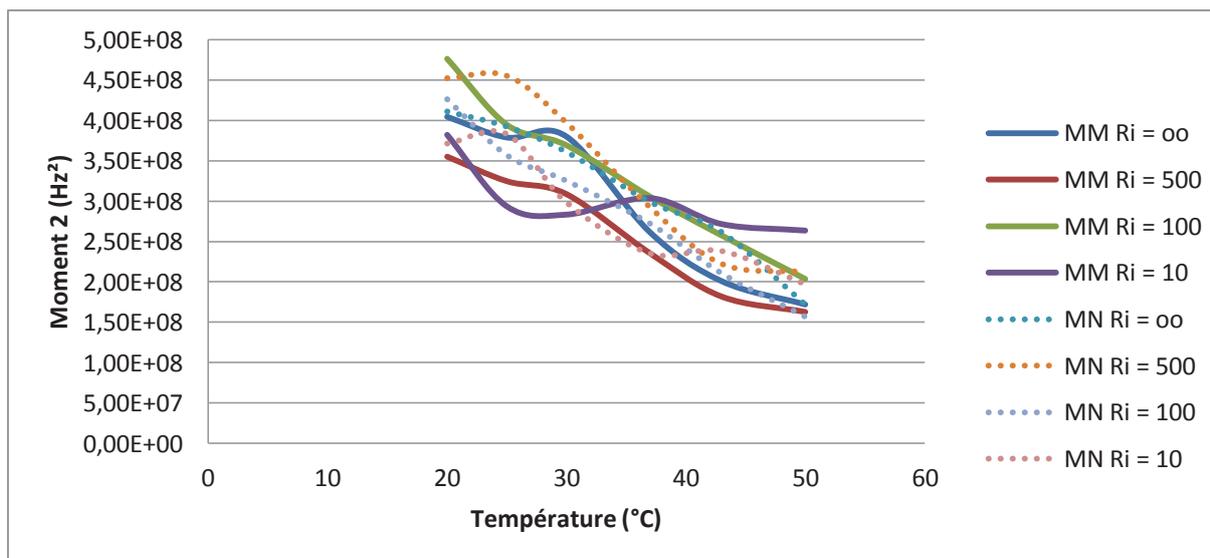
Membranes naturelles-RMN ^{31}P 

Membranes naturelles-RMN ^2H 

Comparatif des premiers moments (RMN du deutérium) des membranes naturelles (traits en pointillés) et modèles (traits pleins)



Comparatif des seconds moments (RMN du phosphore) des membranes naturelles (traits en pointillés) et modèles (traits pleins)



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C. & Harb, O. S. (1998).** Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3127-3133.
- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M. & Fields, B. (1996).** Legionella-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**, 225-230.
- Allaker, R. P., Garrett, N., Kent, L., Noble, W. C. & Lloyd, D. H. (1993).** Characterisation of *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and from healthy carriers by SDS-PAGE of exoproteins, immunoblotting and restriction endonuclease digest analysis. *Journal of medical microbiology* **39**, 429-433.
- Andersson, M., Boman, A. & Boman, H. G. (2003).** *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci* **60**, 599-606.
- Announ, N., Mattei, J. P., Jaoua, S., Fenollar, F., Sati, H., Chagnaud, C., Roudier, J. & Guis, S. (2004).** Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*. *Joint Bone Spine* **71**, 240-242.
- Asaduzzaman, S. M., Nagao, J., Aso, Y., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2006).** Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Applied and environmental microbiology* **72**, 6012-6017.
- Atlas, R. M. (1999).** Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental microbiology* **1**, 283-293.
- Avrahami, D. & Shai, Y. (2002).** Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly, and cell selectivity. *Biochemistry* **41**, 2254-2263.
- Barker, J., Lambert, P. A. & Brown, M. R. (1993).** Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **61**, 3503-3510.
- Bastos, M. C., Ceotto, H., Coelho, M. L. & Nascimento, J. S. (2009).** Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol* **10**, 38-61.
- Beaudet, R., Bisailon, J. G., Saheb, S. A. & Sylvestre, M. (1982).** Production, purification, and preliminary characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by a coagulase-negative staphylococcus isolated from the urogenital flora. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **22**, 277-283.
- Bechinger, B. (1999).** The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 157-183.
- Bechinger, B. & Lohner, K. (2006).** Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1529-1539.

Benhamou, D., Bru, J. P., Chidiac, C., Etienne, J., Leophonte, P., Marty, N., Poirier, R. & Rouquet, R. M. (2005). [Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment]. *Med Mal Infect* **35**, 1-5.

Benin, A. L., Benson, R. F., Arnold, K. E., Fiore, A. E., Cook, P. G., Williams, L. K., Fields, B. & Besser, R. E. (2002). An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *The Journal of infectious diseases* **185**, 237-243.

Benson, R. F. & Fields, B. S. (1998). Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in respiratory infections* **13**, 90-99.

Beranova, J., Mansilla, M. C., de Mendoza, D., Elhottova, D. & Konopasek, I. (2010). Differences in cold adaptation of *Bacillus subtilis* under anaerobic and aerobic conditions. *Journal of bacteriology* **192**, 4164-4171.

Berjeaud, J. M., Garcia, M., Loiseau, C. & Marchand, A. (2011). Peptides pour leur utilisation dans le traitement du cancer. Brevet déposé le 10 juin 2011, N° dépôt : 1000114697, déposant : CNRS et Université de Poitiers.

Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W. & Ashburn, R. J. (1998). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and environmental microbiology* **64**, 279-286.

Billot-Klein, D., Gutmann, L., Bryant, D., Bell, D., Van Heijenoort, J., Grewal, J. & Shlaes, D. M. (1996). Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *Journal of bacteriology* **178**, 4696-4703.

Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. (1991a). Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. *Biochemistry* **30**, 4671-4678.

Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. (1991b). Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin with a complete set of leucine substitution analogs. *Peptide research* **4**, 12-18.

Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. (1992). Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry* **31**, 12688-12694.

Blondelle, S. E., Takahashi, E., Weber, P. A. & Houghten, R. A. (1994). Identification of antimicrobial peptides by using combinatorial libraries made up of unnatural amino acids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**, 2280-2286.

Blondelle, S. E., Takahashi, E., Dinh, K. T. & Houghten, R. A. (1995). The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. *The Journal of applied bacteriology* **78**, 39-46.

Blondelle, S. E., Perez-Paya, E. & Houghten, R. A. (1996). Synthetic combinatorial libraries: novel discovery strategy for identification of antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**, 1067-1071.

Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 61-92.

- Bonelli, R. R., Schneider, T., Sahl, H. G. & Wiedemann, I. (2006).** Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 1449-1457.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. & Messi, P. (2005).** Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology annual review* **11**, 355-380.
- Bortner, C. A., Miller, R. D. & Arnold, R. R. (1986).** Bactericidal effect of lactoferrin on Legionella pneumophila. *Infection and immunity* **51**, 373-377.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H. & Hechard, Y. (2007).** Long-term survival of Legionella pneumophila associated with Acanthamoeba castellanii vesicles. *Environmental microbiology* **9**, 1341-1344.
- Brogden, K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250.
- Bu, B., Ashwood, P., Harvey, D., King, I. B., Water, J. V. & Jin, L. W. (2006).** Fatty acid compositions of red blood cell phospholipids in children with autism. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **74**, 215-221.
- Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L. (2004).** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**, 169-184.
- Burnett, L. J. & Muller, B. H. (1971).** Deuteron quadrupole coupling constants in three solid deuterated parafin hydrocarbons: C2D6, C4D10, C6D14. *J Chem Phys* **55**, 5829-5831.
- Byrd, T. F. & Horwitz, M. A. (1989).** Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of Legionella pneumophila by limiting the availability of iron. *The Journal of clinical investigation* **83**, 1457-1465.
- Byrd, T. F. & Horwitz, M. A. (1991).** Lactoferrin inhibits or promotes Legionella pneumophila intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against Legionella pneumophila. *The Journal of clinical investigation* **88**, 1103-1112.
- Campanile, F., Bongiorno, D., Borbone, S., Falcone, M., Giannella, M., Venditti, M. & Stefani, S. (2008).** In vitro activity of daptomycin against methicillin- and multi-resistant Staphylococcus haemolyticus invasive isolates carrying different mec complexes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **61**, 227-231.
- Ceotto, H., Holo, H., da Costa, K. F., Nascimento Jdos, S., Salehian, Z., Nes, I. F. & Bastos Mdo, C. (2010).** Nukacin 3299, a lantibiotic produced by Staphylococcus simulans 3299 identical to nukacin ISK-1. *Veterinary microbiology* **146**, 124-131.
- Cevc, G. (1983).** Phospholipids Handbook. Marcel Dekker Inc., New York.
- Chang, C. W., Chang, W. L., Chang, S. T. & Cheng, S. S. (2008).** Antibacterial activities of plant essential oils against Legionella pneumophila. *Water research* **42**, 278-286.

- Chaves, F., Garcia-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C. & Otero, J. R. (2005).** Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *Journal of clinical microbiology* **43**, 4877-4879.
- Chen, H. M., Wang, W., Smith, D. & Chan, S. C. (1997).** Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* **1336**, 171-179.
- Chen, Y., Vasil, A. I., Rehaume, L., Mant, C. T., Burns, J. L., Vasil, M. L., Hancock, R. E. & Hodges, R. S. (2006).** Comparison of biophysical and biologic properties of alpha-helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chemical biology & drug design* **67**, 162-173.
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T. & Hodges, R. S. (2007).** Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 1398-1406.
- Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978).** Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **47**, 45-148.
- Chow, A. W., Gribble, M. J. & Bartlett, K. H. (1983).** Characterization of the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains associated with toxic shock syndrome. *Journal of clinical microbiology* **17**, 524-528.
- Cirillo, J. D., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1994).** Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and immunity* **62**, 3254-3261.
- Cogen, A. L., Yamasaki, K., Muto, J. & other authors (2010a).** *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS one* **5**, e8557.
- Cogen, A. L., Yamasaki, K., Sanchez, K. M. & other authors (2010b).** Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *The Journal of investigative dermatology* **130**, 192-200.
- Conover, G. M., Martinez-Morales, F., Heidtman, M. I., Luo, Z. Q., Tang, M., Chen, C., Geiger, O. & Isberg, R. R. (2008).** Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cellular microbiology* **10**, 514-528.
- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**, 777-788.
- Cruciani, R. A., Barker, J. L., Zasloff, M., Chen, H. C. & Colamonici, O. (1991).** Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3792-3796.
- Crupe, S. S. & Landolo, J. J. (1996).** Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) Produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Applied and environmental microbiology* **62**, 3171-3175.

- Crupper, S. S., Gies, A. J. & Iandolo, J. J. (1997).** Purification and characterization of staphylococcin BacR1, a broad-spectrum bacteriocin. *Applied and environmental microbiology* **63**, 4185-4190.
- d'Azevedo, P. A., Trancesi, R., Sales, T., Monteiro, J., Gales, A. C. & Pignatari, A. C. (2008).** Outbreak of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* bloodstream infections in Sao Paulo city, Brazil. *Journal of medical microbiology* **57**, 256-257.
- Dajani, A. S., Gray, E. D. & Wannamaker, L. W. (1970).** Bactericidal substance from *Staphylococcus aureus*. Biological properties. *The Journal of experimental medicine* **131**, 1004-1015.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. & Bienert, M. (1996).** Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* **35**, 12612-12622.
- Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., Beyermann, M. & Bienert, M. (1997).** Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS letters* **403**, 208-212.
- Dathe, M. & Wieprecht, T. (1999).** Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 71-87.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M. (2001).** Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters* **501**, 146-150.
- Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C. & Bienert, M. (2002).** General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1558**, 171-186.
- Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847-867.
- Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I. & Higgs, T. P. (1976).** Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chem Phys Lett* **42**, 390-394.
- Davis, J. H., Nichol, C. P., Weeks, G. & Bloom, M. (1979).** Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry* **18**, 2103-2112.
- Daw, M. A. & Falkiner, F. R. (1996).** Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron* **27**, 467-479.
- de Planque, M. R., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., 2nd, Schafer, H., Marsh, D. & Killian, J. A. (1998).** Influence of lipid/peptide hydrophobic mismatch on the thickness of diacylphosphatidylcholine bilayers. A 2H NMR and ESR study using designed transmembrane alpha-helical peptides and gramicidin A. *Biochemistry* **37**, 9333-9345.
- De Smet, K. & Contreras, R. (2005).** Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* **27**, 1337-1347.

- Dhople, V. M. & Nagaraj, R. (1993).** Delta-toxin, unlike melittin, has only hemolytic activity and no antimicrobial activity: rationalization of this specific biological activity. *Biosci Rep* **13**, 245-250.
- Dhople, V. M. & Nagaraj, R. (1995).** Generation of analogs having potent antimicrobial and hemolytic activities with minimal changes from an inactive 16-residue peptide corresponding to the helical region of *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Protein Eng* **8**, 315-318.
- Dhople, V. M. & Nagaraj, R. (2005).** Conformation and activity of delta-lysin and its analogs. *Peptides* **26**, 217-225.
- Diederer, B. M. (2008).** *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *The Journal of infection* **56**, 1-12.
- Diep, D. B. & Nes, I. F. (2002).** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets* **3**, 107-122.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* **13**, 16-34, table of contents.
- Dirix, G., Monsieurs, P., Dombrecht, B., Daniels, R., Marchal, K., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004).** Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides* **25**, 1425-1440.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. & Hanahan, D. J. (1963).** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* **100**, 119-130.
- Domagala, W. & Koss, L. G. (1980).** Configuration of surfaces of human cancer cells obtained by fine needle aspiration biopsy: a comparative light microscopic and scanning electron microscopic study. *Acta cytologica* **24**, 427-434.
- Donvito, B., Etienne, J., Denoroy, L., Greenland, T., Benito, Y. & Vandenesch, F. (1997a).** Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infection and immunity* **65**, 95-100.
- Donvito, B., Etienne, J., Greenland, T., Mouren, C., Delorme, V. & Vandenesch, F. (1997b).** Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci. *FEMS microbiology letters* **151**, 139-144.
- Dufourc, E. J. (1986).** La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés. Théorie et applications à l'étude de l'action de la mélittine et de la delta-lysine sur les membranes biologiques. Thèse d'état de l'université de Bordeaux I, France.
- Dufourc, E. J., Mayer, C., Stohrer, J., Althoff, G. & Kothe, G. (1992).** Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. *Biophysical journal* **61**, 42-57.
- Durantez, M., Fayolle, C., Casares, N. & other authors (2010).** Tumor therapy in mice by using a tumor antigen linked to modulins peptides from *Staphylococcus epidermidis*. *Vaccine* **28**, 7146-7154.
- Edelstein, P. H. & Meyer, R. D. (1984).** Legionnaires' disease. A review. *Chest* **85**, 114-120.

- Edelstein, P. H., Hu, B. & Edelstein, M. A. (2005).** In vitro and intracellular activities of LBM415 (NVP PDF-713) against *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 2533-2535.
- Eisenberg, D. (1984).** Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem* **53**, 595-623.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (2000).** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 85-106.
- Epand, R. M. & Epand, R. F. (2009a).** Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Molecular bioSystems* **5**, 580-587.
- Epand, R. M. & Epand, R. F. (2009b).** Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 289-294.
- Falcone, M., Micozzi, A., Pompeo, M. E., Baiocchi, P., Fabi, F., Penni, A., Martino, P. & Venditti, M. (2004).** Methicillin-resistant staphylococcal bacteremia in patients with hematologic malignancies: clinical and microbiological retrospective comparative analysis of *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus*. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* **16**, 540-548.
- Falcone, M., Giannella, M., Raponi, G., Mancini, C. & Venditti, M. (2006).** Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? *Clin Microbiol Infect* **12**, 96-97.
- Falcone, M., Campanile, F., Giannella, M., Borbone, S., Stefani, S. & Venditti, M. (2007).** *Staphylococcus haemolyticus* endocarditis: clinical and microbiologic analysis of 4 cases. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **57**, 325-331.
- Faucon, J. F., Bonmatin, J. M., Dufourcq, J. & Dufourc, E. J. (1995).** Acyl chain length dependence in the stability of melittin-phosphatidylcholine complexes. A light scattering and ³¹P-NMR study. *Biochimica et biophysica acta* **1234**, 235-243.
- Fearon, D. T. & Locksley, R. M. (1996).** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science (New York, NY)* **272**, 50-53.
- Feeley, J. C., Gibson, R. J., Gorman, G. W., Langford, N. C., Rasheed, J. K., Mackel, D. C. & Baine, W. B. (1979).** Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* **10**, 437-441.
- Fernandez-Banares, F., Esteve, M., Navarro, E. & other authors (1996).** Changes of the mucosal n3 and n6 fatty acid status occur early in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Gut* **38**, 254-259.
- Fields, B. S. (1996).** The molecular ecology of legionellae. *Trends in microbiology* **4**, 286-290.
- Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. (2002).** Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews* **15**, 506-526.
- Finnerty, W. R., Makula, R. A. & Feeley, J. C. (1979).** Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium. *Ann Intern Med* **90**, 631-634.

- Fitton, J. E., Dell, A. & Shaw, W. V. (1980).** The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. *FEBS letters* **115**, 209-212.
- Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L. & Pope, D. H. (1981).** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology* **41**, 9-16.
- Florin-Christensen, J., Suarez, C. E., Florin-Christensen, M., Wainszelbaum, M., Brown, W. C., McElwain, T. F. & Palmer, G. H. (2001).** A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7736-7741.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497-509.
- Fontana, M. B., de Bastos Mdo, C. & Brandelli, A. (2006).** Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Current microbiology* **52**, 350-353.
- Fontana, M. B., Bastos, M. C. & Brandelli, A. (2007).** Peptide-like substances as antimicrobial barriers to *Corynebacterium* sp. adhesion to silicone catheters. *Letters in applied microbiology* **45**, 324-329.
- Franco, I. S., Shuman, H. A. & Charpentier, X. (2009).** The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cellular microbiology* **11**, 1435-1443.
- Frank, K. L., Del Pozo, J. L. & Patel, R. (2008).** From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical microbiology reviews* **21**, 111-133.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W. & other authors (1977).** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England journal of medicine* **297**, 1189-1197.
- Fraser, D. W., Deubner, D. C., Hill, D. L. & Gilliam, D. K. (1979).** Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. *Science (New York, NY)* **205**, 690-691.
- Freer, J. H. & Arbuthnott, J. P. (1982).** Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Pharmacol Ther* **19**, 55-106.
- Frenette, M., Beaudet, R., Bisailon, J. G., Sylvestre, M. & Portelance, V. (1984).** Chemical and biological characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by *Staphylococcus haemolyticus* isolated from urogenital flora. *Infection and immunity* **46**, 340-345.
- Frenette, M., Beaudet, R., Bisailon, J. G. & Portelance, V. (1988).** Site of action of a gonococcal growth inhibitor produced by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of medical microbiology* **26**, 199-204.
- Frey, B. & Gaipf, U. S. (2010).** The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Seminars in immunopathology*.
- Fritsche, T. R., Sader, H. S., Cleeland, R. & Jones, R. N. (2005).** Comparative antimicrobial characterization of LBM415 (NVP PDF-713), a new peptide deformylase inhibitor of clinical importance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 1468-1476.

- Furmanek, B., Kaczorowski, T., Bugalski, R., Bielawski, K., Bohdanowicz, J. & Podhajska, A. J. (1999).** Identification, characterization and purification of the lantibiotic staphylococcin T, a natural gallidermin variant. *Journal of applied microbiology* **87**, 856-866.
- Gemmell, C. G. & Dawson, J. E. (1982).** Identification of coagulase-negative staphylococci with the API staph system. *Journal of clinical microbiology* **16**, 874-877.
- Giambiagi-Marval, M., Mafra, M. A., Penido, E. G. & Bastos, M. C. (1990).** Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of general microbiology* **136**, 1591-1599.
- Giangaspero, A., Sandri, L. & Tossi, A. (2001).** Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**, 5589-5600.
- Glattli, A., Chandrasekhar, I. & van Gunsteren, W. F. (2006).** A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. *Eur Biophys J* **35**, 255-267.
- Greub, G. & Raoult, D. (2004).** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews* **17**, 413-433.
- Hagen, P. O., Goldfine, H. & Williams, P. J. (1966).** Phospholipids of bacteria with extensive intracytoplasmic membranes. *Science (New York, NY)* **151**, 1543-1544.
- Hallock, K. J., Lee, D. K. & Ramamoorthy, A. (2003).** MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophysical journal* **84**, 3052-3060.
- Hancock, R. E. (1997).** Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-422.
- Hancock, R. E. & Chapple, D. S. (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Hancock, R. E. & Scott, M. G. (2000).** The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8856-8861.
- Hancock, R. E. & Sahl, H. G. (2006).** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**, 1551-1557.
- Hebert, G. A. (1990).** Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of clinical microbiology* **28**, 2425-2431.
- Hechard, Y. & Sahl, H. G. (2002).** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**, 545-557.
- Hechard, Y., Ferraz, S., Bruneteau, E., Steinert, M. & Berjeaud, J. M. (2005).** Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS microbiology letters* **252**, 19-23.

Hechard, Y. & Berjeaud, J. M. (2006). Méthode pour prévenir et/ou traiter des articles ou milieux contaminés par des bactéries du genre *Legionella*. Edited by C.N.D.L.R.S. (CNRS). France.

Heidrich, C., Pag, U., Josten, M., Metzger, J., Jack, R. W., Bierbaum, G., Jung, G. & Sahl, H. G. (1998). Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3140-3146.

Henzler-Wildman, K. A., Martinez, G. V., Brown, M. F. & Ramamoorthy, A. (2004). Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* **43**, 8459-8469.

Hincha, D. K. & Crowe, J. H. (1996). The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles. *Biochimica et biophysica acta* **1284**, 162-170.

Hindahl, M. S. & Iglewski, B. H. (1984). Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *Journal of bacteriology* **159**, 107-113.

Hoskin, D. W. & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 357-375.

Huang, C. R., Lu, C. H., Wu, J. J., Chang, H. W., Chien, C. C., Lei, C. B. & Chang, W. N. (2005). Coagulase-negative staphylococcal meningitis in adults: clinical characteristics and therapeutic outcomes. *Infection* **33**, 56-60.

Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell* **1**, 143-152.

Hui, L., Leung, K. & Chen, H. M. (2002). The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer research* **22**, 2811-2816.

Hwang, P. M. & Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem Cell Biol* **76**, 235-246.

Iwantscheff, A., Kuhnen, E. & Brandis, H. (1985). Species distribution of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical sources. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene* **260**, 41-50.

Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* **59**, 171-200.

Jansen, B., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Reinhold, G. & Schonemann, J. (1992). Native valve endocarditis caused by *Staphylococcus simulans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**, 268-269.

Jensen, M. O. & Mouritsen, O. G. (2004). Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica et biophysica acta* **1666**, 205-226.

Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* **19**, 491-511.

- Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1990).** Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of bacteriology* **172**, 6339-6347.
- John, J. F., Jr., Gramling, P. K. & O'Dell, N. M. (1978).** Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates. *Journal of clinical microbiology* **8**, 435-437.
- Joo, H. S., Cheung, G. Y. & Otto, M. (2011).** Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives. *The Journal of biological chemistry* **286**, 8933-8940.
- Joseph, C. A. (2004).** Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. *Epidemiology and infection* **132**, 417-424.
- Kaletta, C., Entian, K. D., Kellner, R., Jung, G., Reis, M. & Sahl, H. G. (1989).** Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch Microbiol* **152**, 16-19.
- Kandasamy, S. K. & Larson, R. G. (2006).** Molecular dynamics simulations of model trans-membrane peptides in lipid bilayers: a systematic investigation of hydrophobic mismatch. *Biophysical journal* **90**, 2326-2343.
- Kaneda, T. (1991).** Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**, 288-302.
- Kapral, F. A. (1972).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* delta hemolysin by phospholipids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **141**, 519-521.
- Kapral, F. A. (1976).** Effect of fatty acids on *Staphylococcus aureus* delta-toxin hemolytic activity. *Infection and immunity* **13**, 114-119.
- Kato, K. & Bito, Y. (1978).** Relationship between bactericidal action of complement and fluidity of cellular membranes. *Infection and immunity* **19**, 12-17.
- Kelesidis, T. & Tsioudras, S.** *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *Int J Infect Dis* **14**, e838-841.
- Kerr, I. D., Dufourcq, J., Rice, J. A., Fredkin, D. R. & Sansom, M. S. (1995).** Ion channel formation by synthetic analogues of staphylococcal delta-toxin. *Biochimica et biophysica acta* **1236**, 219-227.
- Kim, B. R., Anderson, J. E., Mueller, S. A., Gaines, W. A. & Kendall, A. M. (2002).** Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water research* **36**, 4433-4444.
- Kim, P. I., Sohng, J. K., Sung, C., Joo, H. S., Kim, E. M., Yamaguchi, T., Park, D. & Kim, B. G. (2010).** Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominicin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2-9. *Biochemical and biophysical research communications* **399**, 133-138.
- Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (1997).** A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from Nukadoko, bed of fermented rice bran. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **61**, 1049-1051.

- Kleeman, K. T., Bannerman, T. L. & Kloos, W. E. (1993).** Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *Journal of clinical microbiology* **31**, 1318-1321.
- Kloos, W. E. (1980).** Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* **34**, 559-592.
- Kloos, W. E. & Wolfshohl, J. F. (1991).** *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology* **41**, 284-289.
- Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S. & Hurlburt, B. K. (2004).** *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAllI-agr regulatory region. *Journal of bacteriology* **186**, 7549-7555.
- Kong, K. F., Vuong, C. & Otto, M. (2006).** *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**, 133-139.
- Korobov, V. P., Lemkina, L. M. & Polyudova, T. V. (2003).** Production of a wide-spectrum antibacterial factor by *Staphylococcus warneri* cells. *Dokl Biol Sci* **390**, 286-288.
- Korobov, V. P., Titova, A. V., Lemkina, L. M., Poliudova, T. V. & Pan'kova, N. V. (2005).** [The dependence of the antibacterial effect of the polycationic peptide warnerin on the energy state of target cells]. *Mikrobiologiya* **74**, 166-171.
- Korzhenevskiy, D. A. & Selischeva, A. A. (2009).** Evaluation of phospholipid composition of erythrocytes from healthy volunteers by the method of high-performance liquid chromatography with a light scattering detector. *Bulletin of experimental biology and medicine* **147**, 489-492.
- Kozłowska, K., Nowak, J., Kwiatkowski, B. & Cichorek, M. (1999).** ESR study of plasmatic membrane of the transplantable melanoma cells in relation to their biological properties. *Exp Toxicol Pathol* **51**, 89-92.
- Kreger, A. S., Kim, K. S., Zaboretzky, F. & Bernheimer, A. W. (1971).** Purification and Properties of Staphylococcal Delta Hemolysin. *Infection and immunity* **3**, 449-465.
- Lau, H. Y. & Ashbolt, N. J. (2009).** The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of applied microbiology*.
- Lau, S. Y., Taneja, A. K. & Hodges, R. S. (1984).** Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *The Journal of biological chemistry* **259**, 13253-13261.
- Lee, K. H., Fitton, J. E. & Wuthrich, K. (1987).** Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. *Biochimica et biophysica acta* **911**, 144-153.
- Liles, W. C., Thomsen, A. R., O'Mahony, D. S. & Klebanoff, S. J. (2001).** Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulins. *Journal of leukocyte biology* **70**, 96-102.

- Lopez, C. S., Heras, H., Ruzal, S. M., Sanchez-Rivas, C. & Rivas, E. A. (1998).** Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Current microbiology* **36**, 55-61.
- Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F. & Levi, Y. (2005).** Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *Journal of water and health* **3**, 423-433.
- Lowy, F. D. (1998).** Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine* **339**, 520-532.
- Lowy, F. D. (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1265-1273.
- Lyon, G. J. & Novick, R. P. (2004).** Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**, 1389-1403.
- Mak, P., Maszewska, A. & Rozalska, M. (2008).** The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from *Staphylococcus cohnii*. *FEMS microbiology letters* **287**, 230-235.
- Mastroianni, A., Coronado, O., Nanetti, A., Manfredi, R. & Chiodo, F. (1995).** Community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus cohnii* in an HIV-infected patient: case report and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**, 904-908.
- Masuda, M., Nakashima, H., Ueda, T. & other authors (1992).** A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr⁵,12,Lys⁷]-polyphemusin II). *Biochemical and biophysical research communications* **189**, 845-850.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. & Miyajima, K. (1995).** Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34**, 3423-3429.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. (1996).** An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**, 11361-11368.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. & Miyajima, K. (1997).** Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1327**, 119-130.
- Matsuzaki, K., Mitani, Y., Akada, K. Y., Murase, O., Yoneyama, S., Zasloff, M. & Miyajima, K. (1998).** Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry* **37**, 15144-15153.
- Matsuzaki, K. (1999).** Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 1-10.
- Mavri, J. & Vogel, H. J. (1996).** Ion pair formation of phosphorylated amino acids and lysine and arginine side chains: a theoretical study. *Proteins* **24**, 495-501.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. & Hill, C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 285-308.

- McCarthy, J. S., Stanley, P. A. & Mayall, B. (1991).** A case of *Staphylococcus simulans* endocarditis affecting a native heart valve. *The Journal of infection* **22**, 211-212.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. & Dowdle, W. R. (1977).** Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England journal of medicine* **297**, 1197-1203.
- McIntosh, T. J., Vidal, A. & Simon, S. A. (2001).** The energetics of binding of a signal peptide to lipid bilayers: the role of bilayer properties. *Biochemical Society transactions* **29**, 594-598.
- McKevitt, A. I., Bjornson, G. L., Mauracher, C. A. & Scheifele, D. W. (1990).** Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity* **58**, 1473-1475.
- Mehlin, C., Headley, C. M. & Klebanoff, S. J. (1999).** An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *The Journal of experimental medicine* **189**, 907-918.
- Mellor, I. R., Thomas, D. H. & Sansom, M. S. (1988).** Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochimica et biophysica acta* **942**, 280-294.
- Merchant, T. E. & Glonek, T. (1992).** ³¹P NMR of tissue phospholipids: competition for Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ and K⁺ cations. *Lipids* **27**, 551-559.
- Minamikawa, M., Kawai, Y., Inoue, N. & Yamazaki, K. (2005).** Purification and characterization of Warnericin RB4, anti-Alicyclobacillus bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4. *Current microbiology* **51**, 22-26.
- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L. & Kwaik, Y. A. (2004).** Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **6**, 129-139.
- Moore, A. J., Devine, D. A. & Bibby, M. C. (1994).** Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Peptide research* **7**, 265-269.
- Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A. & Arvidson, S. (1995).** Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *Embo J* **14**, 4569-4577.
- Morfeldt, E., Tegmark, K. & Arvidson, S. (1996).** Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **21**, 1227-1237.
- Morimoto, M., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., Kunita, N., Niwa, M., Murakami, T. & Iwanaga, S. (1991).** Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus in vitro. *Chemotherapy* **37**, 206-211.
- Morriss, D. M., Lawson, J. W. & Rogolsky, M. (1978).** Effect of a staphylococin on *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **14**, 218-223.
- Moss, C. W., Weaver, R. E., Dees, S. B. & Cherry, W. B. (1977).** Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. *Journal of clinical microbiology* **6**, 140-143.
- Moss, C. W. & Dees, S. B. (1979).** Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires disease bacteria. *Journal of clinical microbiology* **9**, 648-649.

- Nascimento, J. S., Ceotto, H., Nascimento, S. B., Giambiagi-Demarval, M., Santos, K. R. & Bastos, M. C. (2006).** Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in applied microbiology* **42**, 215-221.
- Navaratna, M. A., Sahl, H. G. & Tagg, J. R. (1998).** Two-component anti-Staphylococcus aureus lantibiotic activity produced by Staphylococcus aureus C55. *Applied and environmental microbiology* **64**, 4803-4808.
- Navaratna, M. A., Sahl, H. G. & Tagg, J. R. (1999).** Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in Staphylococcus aureus C55 and other phage group II S. aureus strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. *Infection and immunity* **67**, 4268-4271.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 113-128.
- Netz, D. J., Sahl, H. G., Marcelino, R., dos Santos Nascimento, J., de Oliveira, S. S., Soares, M. B. & do Carmo de Freire Bastos, M. (2001).** Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from Staphylococcus aureus. *J Mol Biol* **311**, 939-949.
- Netz, D. J., Pohl, R., Beck-Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos Mdo, C. & Sahl, H. G. (2002).** Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from Staphylococcus aureus. *J Mol Biol* **319**, 745-756.
- Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H. & Lang, F. (2000).** Influence of Acanthamoeba castellanii on intracellular growth of different Legionella species in human monocytes. *Applied and environmental microbiology* **66**, 914-919.
- Nissen-Meyer, J. & Nes, I. F. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* **167**, 67-77.
- Nizet, V. (2006).** Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* **8**, 11-26.
- Novgorodtseva, T. P., Karaman lu, K., Zhukova, N. V., Lobanova, E. G. & Antoniuk, M. V. (2010).** [The composition of blood fatty acids and the level of oxylipins in patients with metabolic syndrome]. *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika*, 22-25.
- Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. & Moghazeh, S. (1995).** The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet* **248**, 446-458.
- Novick, R. P. & Muir, T. W. (1999).** Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Current opinion in microbiology* **2**, 40-45.
- Oh, D., Shin, S. Y., Lee, S., Kang, J. H., Kim, S. D., Ryu, P. D., Hahm, K. S. & Kim, Y. (2000).** Role of the hinge region and the tryptophan residue in the synthetic antimicrobial peptides, cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) and its analogues, on their antibiotic activities and structures. *Biochemistry* **39**, 11855-11864.

- Oren, Z. & Shai, Y. (1998).** Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451-463.
- Ortiz de la Tabla, V., Gutierrez-Rodero, F., Martin, C., Zorraquino, A. & Belinchon, I. (1996).** Staphylococcus lugdunensis as a cause of abscesses in the perineal area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 405-407.
- Otto, M., Sussmuth, R., Jung, G. & Gotz, F. (1998).** Structure of the pheromone peptide of the Staphylococcus epidermidis agr system. *FEBS letters* **424**, 89-94.
- Otto, M. & Gotz, F. (2000).** Analysis of quorum sensing activity in staphylococci by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin. *BioTechniques* **28**, 1088, 1090, 1092, 1096.
- Otto, M., O'Mahoney, D. S., Guina, T. & Klebanoff, S. J. (2004).** Activity of Staphylococcus epidermidis phenol-soluble modulins expressed in Staphylococcus carnosus. *The Journal of infectious diseases* **190**, 748-755.
- Otvos, L., Jr. (2002).** The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1138-1150.
- Payne, J. W., Jakes, R. & Hartley, B. S. (1970).** The primary structure of alamethicin. *The Biochemical journal* **117**, 757-766.
- Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. & Schlievert, P. (1988).** Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology* **170**, 4365-4372.
- Perez-Paya, E., Houghten, R. A. & Blondelle, S. E. (1995).** The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. *The Journal of biological chemistry* **270**, 1048-1056.
- Pine, L., George, J. R., Reeves, M. W. & Harrell, W. K. (1979).** Development of a chemically defined liquid medium for growth of Legionella pneumophila. *Journal of clinical microbiology* **9**, 615-626.
- Pokorny, A. & Almeida, P. F. (2005).** Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysin: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides. *Biochemistry* **44**, 9538-9544.
- Pons, A. M., Lanneluc, I., Cottenceau, G. & Sable, S. (2002).** New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* **84**, 531-537.
- Pott, T. & Dufourc, E. J. (1995).** Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state 2H-and 31P-NMR study. *Biophysical journal* **68**, 965-977.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. (1992).** Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**, 12416-12423.
- Powers, J. P. & Hancock, R. E. (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003).** *Microbiology*: de Boeck edn.

- Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. (2007).** Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* **27**, 189-223.
- Rahal, J. J., Jr. (1972).** Comparative effects of purified staphylococcal alpha and delta toxins on mitochondrial metabolism. *The Journal of infectious diseases* **126**, 96-103.
- Ramadurai, S., Holt, A., Schafer, L. V., Krasnikov, V. V., Rijkers, D. T., Marrink, S. J., Killian, J. A. & Poolman, B. (2010).** Influence of hydrophobic mismatch and amino acid composition on the lateral diffusion of transmembrane peptides. *Biophysical journal* **99**, 1447-1454.
- Ran, S. & Thorpe, P. E. (2002).** Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **54**, 1479-1484.
- Rance, M. & Byrd, R. A. (1983).** Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media : phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *J Magn Reson* **52**, 221-240.
- Raponi, G., Ghezzi, M. C., Gherardi, G., Dicuonzo, G., Caputo, D., Venditti, M., Rocco, M., Micozzi, A. & Mancini, C. (2005).** Antimicrobial susceptibility, biochemical and genetic profiles of Staphylococcus haemolyticus strains isolated from the bloodstream of patients hospitalized in critical care units. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* **17**, 264-269.
- Rautenberg, M., Joo, H. S., Otto, M. & Peschel, A. (2011).** Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *Faseb J* **25**, 1254-1263.
- Razonable, R. R., Lewallen, D. G., Patel, R. & Osmon, D. R. (2001).** Vertebral osteomyelitis and prosthetic joint infection due to Staphylococcus simulans. *Mayo Clinic proceedings* **76**, 1067-1070.
- Rodgers, F. G., Greaves, P. W., Macrae, A. D. & Lewis, M. J. (1980).** Electron microscopic evidence of flagella and pili on Legionella pneumophila. *J Clin Pathol* **33**, 1184-1188.
- Rogolsky, M. (1979).** Nonenteric toxins of Staphylococcus aureus. *Microbiol Rev* **43**, 320-360.
- Roig, J. & Rello, J. (2003).** Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1119-1129.
- Romantsov, T., Guan, Z. & Wood, J. M. (2009).** Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 2092-2100.
- Rowbotham, T. J. (1980).** Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183.
- Rozalska, M. & Szewczyk, E. M. (2008).** Staphylococcus cohnii hemolysins - isolation, purification and properties. *Folia microbiologica* **53**, 521-526.
- Sahl, H. G. & Brandis, H. (1981).** Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by Staphylococcus epidermidis. *Journal of general microbiology* **127**, 377-384.

- Sani, M. A., Keech, O., Gardestrom, P., Dufourc, E. J. & Grobner, G. (2009).** Magic-angle phosphorus NMR of functional mitochondria: in situ monitoring of lipid response under apoptotic-like stress. *Faseb J* **23**, 2872-2878.
- Santos Sanches, I., Mato, R., de Lencastre, H. & Tomasz, A. (2000).** Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)* **6**, 199-211.
- Sashihara, T., Kimura, H., Higuchi, T., Adachi, A., Matsusaki, H., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (2000).** A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **64**, 2420-2428.
- Seelig, A. & Seelig, J. (1985).** Phospholipid composition and organization of cytochrome c oxidase preparations as determined by ³¹P-nuclear magnetic resonance. *Biochimica et biophysica acta* **815**, 153-158.
- Seelig, J. (1977).** Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly reviews of biophysics* **10**, 353-418.
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W. & Cullor, J. S. (1992).** Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **267**, 4292-4295.
- Shai, Y. (1999).** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 55-70.
- Shai, Y. (2002).** Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236-248.
- Shin, K., Maeda, H., Fujiwara, T. & Akutsu, H. (1995).** Molecular miscibility of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in binary mixed bilayers with acidic phospholipids studied by ²H- and ³¹P-NMR. *Biochimica et biophysica acta* **1238**, 42-48.
- Shittu, A., Lin, J., Morrison, D. & Kolawole, D. (2004).** Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *Journal of medical microbiology* **53**, 51-55.
- Silvestro, L., Gupta, K., Weiser, J. N. & Axelsen, P. H. (1997).** The concentration-dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry* **36**, 11452-11460.
- Small, D. A., Chang, W., Toghrol, F. & Bentley, W. E. (2007).** Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology* **74**, 176-185.
- Sohlenkamp, C., Lopez-Lara, I. M. & Geiger, O. (2003).** Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* **42**, 115-162.
- Sok, M., Sentjurg, M. & Schara, M. (1999).** Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer letters* **139**, 215-220.

- Stout, J. E., Yu, V. L. & Best, M. G. (1985).** Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and environmental microbiology* **49**, 221-228.
- Sturgess, I., Martin, F. C. & Eykyn, S. (1993).** Pubic osteomyelitis caused by *Staphylococcus simulans*. *Postgraduate medical journal* **69**, 927-929.
- Sung, J. M., Chantler, P. D. & Lloyd, D. H. (2006).** Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infection and immunity* **74**, 2947-2956.
- Swanson, M. S. & Sturgill-Koszycki, I. (2000).** Exploitation of macrophages as a replication niche by *Legionella pneumophila*. *Trends in microbiology* **8**, 47-49.
- Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S. & Figaszewski, Z. A. (2007).** Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Molecular and cellular biochemistry* **294**, 237-242.
- Talan, D. A., Staatz, D., Staatz, A., Goldstein, E. J., Singer, K. & Overturf, G. D. (1989).** *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *Journal of clinical microbiology* **27**, 78-81.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J. & Selsted, M. E. (1999).** A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science (New York, NY)* **286**, 498-502.
- Tappin, M. J., Pastore, A., Norton, R. S., Freer, J. H. & Campbell, I. D. (1988).** High-resolution ¹H NMR study of the solution structure of delta-hemolysin. *Biochemistry* **27**, 1643-1647.
- Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. (2009).** *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial ecology* **58**, 538-547.
- Tegmark, K., Morfeldt, E. & Arvidson, S. (1998).** Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. *Journal of bacteriology* **180**, 3181-3186.
- Tesh, M. J., Morse, S. A. & Miller, R. D. (1983).** Intermediary metabolism in *Legionella pneumophila*: utilization of amino acids and other compounds as energy sources. *Journal of bacteriology* **154**, 1104-1109.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J. F. & Levi, Y. (2004).** Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of applied microbiology* **97**, 950-963.
- Tiozzo, E., Rocco, G., Tossi, A. & Romeo, D. (1998).** Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic, amphipathic peptides. *Biochemical and biophysical research communications* **249**, 202-206.
- Tossi, A., Tarantino, C. & Romeo, D. (1997).** Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *European journal of biochemistry / FEBS* **250**, 549-558.
- Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A. (2000).** Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.

- Twyman, R. M. (2005).** Nuclear magnetic resonance spectroscopy-applicable elements: Phosphorus-31. In: Worsfold P, Townshend A, Poole C (eds) *Encyclopedia of Analytical Science* (2nd edn), volume 6. Elsevier Science, London UK, pp 278-286. .
- Tytler, E. M., Segrest, J. P., Epand, R. M., Nie, S. Q., Epand, R. F., Mishra, V. K., Venkatachalapathi, Y. V. & Anantharamaiah, G. M. (1993).** Reciprocal effects of apolipoprotein and lytic peptide analogs on membranes. Cross-sectional molecular shapes of amphipathic alpha helices control membrane stability. *The Journal of biological chemistry* **268**, 22112-22118.
- Uematsu, N. & Matsuzaki, K. (2000).** Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophysical journal* **79**, 2075-2083.
- Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. (1991).** Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer research* **51**, 3062-3066.
- Vandenesch, F., Storrs, M. J., Poitevin-Later, F., Etienne, J., Courvalin, P. & Fleurette, J. (1991).** Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS microbiology letters* **62**, 65-68.
- Vandenesch, F., Etienne, J., Reverdy, M. E. & Eykyn, S. J. (1993).** Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis* **17**, 871-876.
- Vandenesch, F., Eykyn, S. J., Etienne, J. & Lemozy, J. (1995).** Skin and post-surgical wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Infect* **1**, 73-74.
- Verdon, J., Berjeaud, J. M., Lacombe, C. & Hechard, Y. (2008).** Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* **29**, 978-984.
- Verdon, J., Falge, M., Maier, E., Bruhn, H., Steinert, M., Faber, C., Benz, R. & Hechard, Y. (2009a).** Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophysical journal* **97**, 1933-1940.
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J. M. & Hechard, Y. (2009b).** delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* **30**, 817-823.
- Verdon, J., Labanowski, J., Sahr, T., Ferreira, T., Lacombe, C., Buchrieser, C., Berjeaud, J. M. & Hechard, Y. (2011).** Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Biochimica et biophysica acta* **1808**, 1146-1153.
- Verkleij, A. J. & Post, J. A. (2000).** Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *The Journal of membrane biology* **178**, 1-10.
- Vuong, C. & Otto, M. (2002).** *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**, 481-489.
- Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y., Bach, T. H., Jameson-Lee, M., Kong, K. F., Queck, S. Y. & Otto, M.** *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 238-248.

- Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D. & other authors (2007).** Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature medicine* **13**, 1510-1514.
- Wang, Z. & Wang, G. (2004).** APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research* **32**, D590-592.
- Watanabe, S., Ito, T., Takeuchi, F., Endo, M., Okuno, E. & Hiramatsu, K. (2005).** Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **187**, 3698-3707.
- Watson, D. C., Yaguchi, M., Bisailon, J. G., Beaudet, R. & Morosoli, R. (1988).** The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *The Biochemical journal* **252**, 87-93.
- Wenzel, R. P. & Perl, T. M. (1995).** The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *The Journal of hospital infection* **31**, 13-24.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Schumann, M., Krause, E., Beyermann, M. & Bienert, M. (1996).** Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* **35**, 10844-10853.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. & Bienert, M. (1997a).** Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* **36**, 6124-6132.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epan, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. & Bienert, M. (1997b).** Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* **36**, 12869-12880.
- Wilaipun, P., Zendo, T., Okuda, K., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2008).** Identification of the nukacin KQU-131, a new type-A(II) lantibiotic produced by *Staphylococcus hominis* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-ra). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 2232-2235.
- Willey, J. M. & van der Donk, W. A. (2007).** Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* **61**, 477-501.
- Wiseman, G. M. (1975).** The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriological reviews* **39**, 317-344.
- Wu, Y., Huang, H. W. & Olah, G. A. (1990).** Method of oriented circular dichroism. *Biophysical journal* **57**, 797-806.
- Yamazaki, K., Teduka, H. & Shinano, H. (1996).** Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **60**, 543-545.
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I. & Huang, H. W. (2000).** Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical journal* **79**, 2002-2009.

- Yao, Y., Sturdevant, D. E. & Otto, M. (2005).** Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *The Journal of infectious diseases* **191**, 289-298.
- Yarwood, J. M. & Schlievert, P. M. (2003).** Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1620-1625.
- Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. (2003).** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**, 27-55.
- Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C. & other authors (2002).** Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of infectious diseases* **186**, 127-128.
- Zachowski, A. (1993).** Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *The Biochemical journal* **294 (Pt 1)**, 1-14.
- Zanetti, M. (2004).** Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of leukocyte biology* **75**, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5449-5453.
- Zasloff, M. (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zelezetsky, I. & Tossi, A. (2006).** Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1436-1449.
- Zhang, Y. M. & Rock, C. O. (2008).** Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 222-233.
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C. & Kozitskaya, S. (2006).** Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* **28 Suppl 1**, S14-20.
- Zwaal, R. F. & Schroit, A. J. (1997).** Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-1132.

Caractérisation et étude du mode d'action de peptides anti-*Legionella*

En 2005, la souche *Staphylococcus warneri* RK a été décrite au laboratoire comme étant active contre *Legionella pneumophila*. Cette activité est due à la production de trois peptides qui présentent également une activité hémolytique. Ces peptides sont les δ -lysines I et II, qui sont similaires à 80 % avec la δ -lysine produite par *S. aureus*, et la warnéricine RK qui présente une séquence originale. L'objectif de mon travail a consisté à identifier puis étudier des peptides anti-*Legionella* produits par divers *Staphylococcus*.

La première partie de ce travail a consisté à cribler une collection de *Staphylococcus* afin de sélectionner ceux possédant une activité anti-*Legionella*, puis de purifier et d'identifier les peptides actifs. Douze peptides, pour la plupart déjà décrits dans la littérature, ont été caractérisés et leurs activités anti-*Legionella* et hémolytique ont été déterminées. Ceci a permis de les classer en deux groupes. Le groupe 1, représenté par la warnéricine RK, correspond aux peptides bactéricides et très hémolytiques. Le second groupe, représenté par la PSM α de *S. epidermidis*, correspond à des peptides bactériostatiques et peu hémolytiques.

Dans la seconde partie, une étude structure-activité de la warnéricine RK et de la PSM α a été réalisée afin d'identifier les motifs structuraux responsables des activités anti-*Legionella* et / ou hémolytique. Une collection de 23 peptides, modifiés à partir des séquences de la warnéricine RK et de la PSM α , a donc été synthétisée. Leurs activités (hémolytique, antibactérienne et de perméabilisation de membranes modèles) ont ensuite été déterminées, ce qui a permis de mettre en évidence certains résidus dont la modification permet de moduler ces activités. Ainsi, la substitution d'une glycine par une lysine en position 14 de la PSM α permet d'obtenir un peptide bactéricide, comme la warnéricine RK, mais peu hémolytique, comme la PSM α . De plus, la mesure de l'activité des peptides sur des vésicules de compositions lipidiques variées a mis en évidence le fait que la présence de phosphatidylcholine au sein des membranes rend celles-ci plus sensibles aux peptides testés.

Enfin, la dernière partie de ce travail a consisté en une étude complémentaire des activités de la warnéricine RK. Tout d'abord, son action sur les membranes de *Legionella* a été observée par microscopie électronique et par résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore et du deutérium. Il apparaît que le peptide perméabilise les membranes. Toutefois, à forte concentration, alors que la microscopie électronique montre que le peptide désagrège totalement les membranes, la RMN semble indiquer que celui-ci aurait plutôt tendance à les stabiliser. D'autre part, une activité anti-cancéreuse de la warnéricine RK a été mise en évidence. En effet, ce peptide est actif contre des lignées de cellules leucémiques alors qu'il n'a pas d'effet sur les cellules mononuclées saines.

En conclusion, nous avons obtenu un grand nombre de peptides actifs contre *Legionella*. Les peptides bactéricides sont en général également très hémolytiques alors que les peptides bactériostatiques sont peu hémolytiques. Toutefois, suite à l'étude structure-activité réalisée, il semble maintenant possible de définir la séquence d'un peptide très actif contre *Legionella* mais dépourvu d'effet hémolytique.

Mots clés : peptides anti-*Legionella*, *Staphylococcus*, warnéricine RK, mode d'action, phospholipides.