

La résistance aux antimicrobiens (AMR) est devenu une priorité de santé publique. Les AMR ont provoqué 1.27 million de morts en 2019 résultant principalement d'infections à bactéries à Gram négatif (Murray et al, 2019). Les prévisions alarmantes de l'OMS pour 2050 (10 millions de morts dans le monde) font de l'AMR l'une des dix principales menaces de santé publique auxquelles l'humanité est confrontée. Les principales causes de l'aggravation de la dissémination des AMR restent les abus d'utilisation et les mauvais usages des antibiotiques sur le marché, mais également l'absence de renouvellement de l'arsenal thérapeutique. En effet, le pipeline clinique de nouveaux antibiotiques est quasi-asséché. Actuellement, seuls deux des six composés innovants en essais cliniques ciblent des bactéries à Gram-négatifs multi-résistantes soulignant le besoin criant de renouvellement (Butler et al 2022).

Nous avons identifié une nouvelle famille de cyclolipopeptides antibiotiques, les altérines, produits par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* (Figure 1). Les altérines possèdent une activité antibiotiques puissantes contre les bactéries à Gram-négatif (Desriac et al 2020). Les altérines sont composés d'un cycle heptapeptidique cationique lié par une liaison amide à une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue (de 8 à 13 Carbones), hydroxylée ou non et saturée ou non (Desriac et al, 2020). Le cycle peptidique c[β -OH Dab¹- Dhb²- Dab³- Leu⁴- Arg⁵- β -OH Dab⁶- β -OH Dab⁷] comprend cinq résidus d'acides aminés exotiques : la dehydrobutyrine (Dhb), l'acide diaminobutyrique (Dab) et l'acide β -hydroxy diaminobutyrique (β -OH Dab). Ce dernier est extrêmement rare puisqu'uniquement présent chez :

- (i) les Odilorhabdines (peptides antibiotiques produits par une bactérie symbiotique, *Xenorhabdus nematophila*, de nématode et en voie de développement préclinique par la société Nosopharm (Pantel et al 2018) et
- (ii) les Ogipeptins, des isoformes d'altérines produites par une souche de *Pseudoalteromonas* SANK 71903, isolée par le groupe pharmaceutique Daiichi-Sankyo (Kozuma et al, 2017).

Actuellement, 38 isoformes d'altérines produites par différentes souches de *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* et *Pseudoalteromonas ostreae* (Cuny et al, 2021) ont été caractérisées (Offret et al, 2022). Le mécanisme d'action des altérines a été élucidé. L'activité antibiotique des altérines résulte d'une interaction avec le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe puis de la perturbation et de la perméabilisation de la membrane plasmique des bactéries à Gram négatif.

Compte-tenu de leur structure et de leur mécanisme d'action, les altérines présentent des homologues avec les polymyxines (Figure 1), cyclolipopeptides antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine sous la forme de colistine. L'analyse des relations structure activité des polymyxines ont révélé quatre éléments structuraux clef indispensables à l'activité antibiotique (Velkov et al 2010) :

- (i) la chaîne hydrocarbonée,
- (ii) le tripeptide de connexion,
- (iii) la distribution des charges positives
- (iv) le motif hydrophobe dans le cycle peptidique.

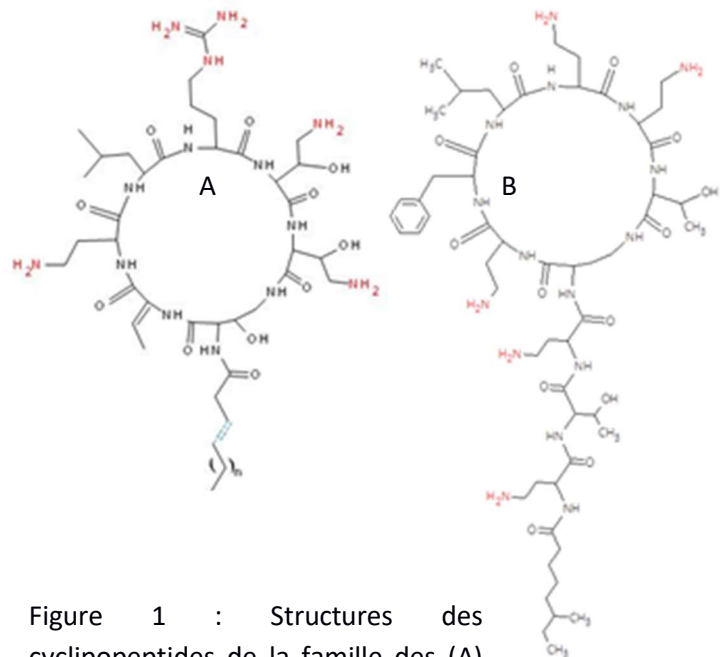


Figure 1 : Structures des cyclolipopeptides de la famille des (A) Altérines et (B) Polymyxine

Trois des 4 éléments de structure clefs pour l'activité antibiotique des polymyxines étant sensiblement différents chez les altérines, nous avons initié l'exploration des relations structure activité de ces dernières à travers un projet de recherche Emergence financé par l'Ecole Universitaire de Recherche Is-Blue. Des analogues des altérines ont été synthétisés. Les résidus β -OH Dab et Dhb n'étant pas commercialement disponibles, ils ont été respectivement remplacés par l'acide diaminobutyrique (Dab) et l'acide amino-butyrique (Abu). L'heptapeptide cyclique c[Dab¹- Abu²- Dab³- Leu⁴- Arg⁵- Dab⁶- Dab⁷] a été lié par une chaîne hydrocarbonée saturée comprenant 10 (C_{10:0}) ou 16 (C_{16:0}) Carbones. Dans la forme C_{10:0}, la substitution des résidus β -OH Dab et Dhb par Dab et Abu se traduit par une perte d'activité antibiotique d'un facteur 100 par rapport à l'altérine naturelle équivalente. En revanche, avec la forme C_{16:0} de cet analogue, l'activité antibiotique est non seulement restituée contre certaines bactéries à Gram négatif dont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mais augmentée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ce projet de thèse est donc consacré à l'exploration des relations structure activité des altérines. Il sera mené en partenariat avec la société Olgram qui développe des heptapeptides cycliques innovants pour lutter contre l'antibiorésistance et l'institut des biomolécules Max Mousseron (Université de Montpellier). Ces deux partenaires disposent des expertises, compétences et équipement pour la synthèse d'heptapeptides cycliques.

Ce projet de thèse est organisé en 3 axes principaux :

1. Activité antibiotique, anti-biofilm des Alterines et analogues :

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactericides (CMB) seront évaluées selon les procédures recommandées par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) contre un panel de souches de collections et d'isolats cliniques (n=30) dont les résistances aux antibiotiques seront connues. La capacité de 5 analogues présentant les activités antibactériennes les plus pertinentes seront examinées pour leur capacité à inhiber la formation de biofilm et à éradiquer des biofilm pré-formés de bactéries à Gram négatif ESKAPE.

2. Mécanisme d'action des Altérines et analogues

L'interaction avec le LPS est la première étape dans l'activité antibiotique des altérines. Nous évaluerons donc les capacités de liaisons du LPS par les altérines et analogues à l'aide d'essais fonctionnels (*Limulus* Amoebocyte Lysates Assay (LAL)). Des analyses biophysiques (thermophorèse à microéchelle ou résonance plasmonique de surface) seront menées sur les 5 analogues les plus actifs de manière à identifier les motifs structuraux impliqués dans l'interaction avec le LPS.

3. Apparition de résistance

L'apparition de résistance aux 5 analogues les plus actifs sera analysée par les méthodes microbiologiques classiques. Des analyses des LPS des souches résistantes générées par spectrométrie de masse en mode négatif sur un MALDI-TOP Biotyper Sirius disponible au LBCM.

Le financement des travaux de thèse sera assuré par un projet ANR PCRE (Porteur LBCM, en cours d'évaluation). En cas de refus à l'AAP ANR 2022, un programme de maturation avec la SATT Ouest Valorisation (en cours de négociation) ou un projet transfert de technologie de la région Bretagne seront sollicités pour faire le lien avec l'AAP ANR 2023.

Bibliographie

Butler MS, Gigante V, Sati H, Paulin S, Al-Sulaiman L, Rex JH, Fernandes P, Arias C.A, Paul M, Thwaites G.E, et al. Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2022, 66, e01991-21, doi:10.1128/aac.01991-21.

Cuny H, Offret C, Boukerb AM, Parizadeh L, Lesouhaitier O, Le Chevalier P, Jégou C, Bazire A, Brillet B, Fleury Y. *Pseudoalteromonas ostreae* sp. nov., a new bacterial species harboured by the flat oyster *Ostrea edulis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021 Nov;71(11). doi: 10.1099/ijsem.0.005070.

Desriac F, El Harras A, Simon M, Bondon A, Brillet B, Le Chevalier P, Pugnière M, Got P, Destoumieux-Garzón D, Fleury Y. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs* 2020, 18, E630, doi:10.3390/md18120630.

Kozuma S, Hirota-Takahata Y, Fukuda D, Kuraya N, Nakajima M, Ando O. Identification and Biological Activity of Ogipeptins, Novel LPS Inhibitors Produced by Marine Bacterium. *J. Antibiot. (Tokyo)* 2017, 70, 79–83, doi:10.1038/ja.2016.81.

Murray CL et al Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

Offret C, Cuny H, Bodet P.-E, Desriac F, Jegou C, Bazire A, Chevrot R, Thiery V, Brillet B, Fleury Y. Alterins, a New Family of Marine Antibacterial Cyclolipopeptides. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2022, 59, 106514, doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106514.

Pantel L, et al. Odilorhabdins, Antibacterial Agents that Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site. *Mol Cell.* 2018 Apr 5;70(1):83-94.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.001.

Velkov T, Thompson P.E, Nation R.L, Li J Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 1898–1916, doi:10.1021/jm900999h