

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**DÉVELOPPEMENT D'HYBRIDES APTAMÈRE-PEPTIDE ANTIMICROBIEN
UN MODÈLE POUR CIBLER DES BACTÉRIES PATHOGÈNES**

Par
Amal Thamri

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examineur externe: Dr. Roger.C Lévesque, Université de Laval

Examineur interne: Dr. Frédéric Veyrier, INRS-IAF

Directeur de recherche: Dr. Jonathan Perreault, INRS-IAF

Co-directrice de recherche: Dre. Annie Castonguay, INRS-IAF

Remerciements

Cette maîtrise a été réalisée dans le cadre d'une coopération entre INRS et le ministère d'enseignement supérieur tunisien.

Les recherches objets de ce mémoire ont été réalisées dans différents laboratoires de l'institut Armand-Frappier: Laboratoires des professeurs: Jonathan Perreault, Annie Castonguay, Eric Déziel, David Chatenet.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement et à l'avancement des travaux de cette maîtrise.

Je remercie spécialement mon directeur de recherche Jonathan Perreault pour avoir cru en mes capacités d'intégrer sa jeune équipe et travailler sur un projet novateur. Je remercie très sincèrement ma co-directrice Annie Castonguay pour ses encouragements tout au long de ces deux années. Je les remercie également d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de recherche.

Merci au professeur Eric Déziel pour sa compréhension et ses conseils précieux. J'adresse aussi mes remerciements au professeur David Chatenet pour sa disponibilité, ses directions bénéfiques et ses remarques pertinentes.

J'adresse mes sentiments de respect et de gratitude à Myriam Letourneau et Marie-Christine Groleau pour leur générosité et leur aide à mettre en place et améliorer plusieurs expériences.

Enfin j'ai beaucoup apprécié travailler avec tous les membres de mes deux équipes tant sur le plan scientifique qu'humain et surtout pour leur soutien durant les moments difficiles.

Résumé

La découverte de nouveaux agents antimicrobiens est nécessaire pour surmonter les problèmes liés à la résistance aux antibiotiques. Le défi ne réside pas seulement dans le criblage des molécules qui affichent une activité thérapeutique élevée, mais aussi dans l'optimisation de l'affinité et la sélectivité des médicaments candidats pour certaines cibles biologiques afin de réduire la survenue d'effets secondaires. Cette stratégie consiste à administrer le médicament à un patient de manière à augmenter sa concentration locale dans une partie du corps par rapport aux autres. L'agent antibiotique comporte alors une partie navette, et est porté à une cible spécifique à proximité du tissu malade.

L'objectif de ce projet multidisciplinaire est de créer de nouvelles modalités de traitement avec un meilleur effet thérapeutique combiné à moins d'effets secondaires, en utilisant les maladies infectieuses comme modèle.

Pour atteindre cet objectif, le potentiel des aptamères se liant spécifiquement certaines bactéries avec une grande affinité est exploité pour la livraison de peptides antimicrobiens (PAM), une classe prometteuse d'agents anti-infectieux. L'hybride aptamère-PAM sera capable de cibler spécifiquement le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* reconnu pour sa multirésistance. Plusieurs avantages sont associés à ce système tel que la réduction de la fréquence et des doses prises par le patient. En atteignant leur cible plus rapidement et sélectivement, ces constructions empêchent potentiellement la dégradation des PAM dans le sang et leur cytotoxicité. Au cours de ce projet, une liaison thermostable entre l'aptamère et le PAM a été étudié en utilisant la réaction thiol-ène de la chimie click. Durant l'étude du peptide modifié cys-pep1037, son dimère correspondant est doté d'un potentiel antimicrobien plus élevée que celui du PAM pep1037. Une étude parallèle a été alors menée pour explorer les effets antimicrobien et antibiofilm du dimère contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*.

Abstract

The greatest challenge of modern drug discovery lies not only in finding compounds that display a high therapeutic activity, but also in optimizing drug candidates affinity and selectivity toward certain biological targets in order to lower the occurrence of side effects. Indeed, development of new antibiotics and other novel strategies are critically needed to overcome the problems associated with antibiotic resistance. For instance, targeted drug delivery is an appealing strategy to overcome the affinity and the selectivity barrier for molecules with a high therapeutic value. It consists in delivering the medication to a patient in a manner that increases the local drug concentration in some parts of the body relative to others; the therapeutic agent is then part of a shuttle, and is carried to a specific target in proximity to the diseased tissue.

The objective of this multidisciplinary project is to create novel treatment modalities with improved safety margin (increased therapeutic effect combined to lower side effects), using infectious disease as a model. To reach this goal, the potential of aptamers as bacteria-cell targeting entities have been exploited, for the delivery of anti-microbial peptides (AMPs), a promising class of antimicrobials. The new AMP-aptamer hybrids have the potential to specifically target *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, an opportunist pathogen known for its low antibiotic susceptibility, and directly display their anti-microbial activity. The advantages associated with such targeted systems are numerous and include reduction in the frequency of the dosages taken by the patient (increased efficiency) and lower occurrence of side effects (increased selectivity), etc. Moreover, by reaching the target more rapidly, the new constructs can potentially prevent the AMPs from breaking down after entering the bloodstream.

In the course of this project: antimicrobial peptides and aptamers were linked together *via* a thermostable linkage, using thiol-ene click chemistry. Then the affinity and antimicrobial activity of the conjugate were evaluated. During the study of the modified cys-pep1037, it was found that its corresponding dimer has a higher antimicrobial potency than pep1037. The antimicrobial and antibiofilm effects of this dimer against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* were then explored in a separate study.

Table de matière

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Mise en contexte.....	1
Introduction	3
1. L'antibiorésistance.....	3
1.1. Mécanismes de résistance.....	3
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : bactérie modèle de résistance aux antibiotiques	4
2. Les peptides antimicrobiens (PAM)	5
2.1. Structures et classification.....	6
2.1.1. Les peptides antimicrobiens anioniques	6
2.1.2. Les peptides antimicrobiens cationiques (cPAM)	6
2.2. Activité antimicrobienne des PAM	8
2.3. Modes d'action.....	9
2.3.1. Perméabilisation des membranes.....	9
2.3.2. Inhibition des fonctions intracellulaires.....	11
2.4. PAM : Modifications pour un meilleur potentiel thérapeutique	13
2.5. Effet de la dimérisation sur l'effet antimicrobien des peptides	17
2.6. Action des peptides antimicrobiens sur les biofilms.....	19
2.6.1. Les biofilms	19
2.6.2. Action des peptides antimicrobiens versus antibiotiques sur les biofilms	21
3. Aptamères.....	22
3.1. Propriétés générales des aptamères.....	22
3.2. SELEX	23
3.3. Aptamères: Un large spectre d'applications	25
3.3.1. Capteurs et senseurs.....	25
3.3.2. Imagerie/Diagnostic.....	25
3.3.3. Applications thérapeutiques.....	26
4. Conjugués peptide-oligonucléotide (POC).....	31
4.1. Méthodologie de synthèse	31
4.1.1. Synthèse en phase solide dite In line.....	31

4.1.2. Synthèse dite fragmentée.....	31
4.2. Réaction thiol-ène	32
4.3. Applications.....	32
Problématique.....	34
Hypothèses et objectifs	35
CHAPITRE 1 : LA MODIFICATION DE PEPTIDE RÉSULTE EN LA FORMATION D'UN DIMÈRE AVEC UNE ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE AMÉLIORÉE DE 60 FOIS	36
Peptide modification results in the formation of a dimer with a 60-fold enhanced antimicrobial activity.....	36
Abstract.....	38
Introduction	39
Materials and methods.....	41
Peptide synthesis/modification.	41
Bacterial strains and growth conditions.....	42
Minimum inhibitory concentration (MIC) determination.	42
Biofilm inhibition assay.	42
Biofilm disintegration assay.	43
Results and discussion	43
Inhibition of bacterial growth	44
Biofilm inhibition and disintegration.....	46
Conclusion	50
Acknowledgments.....	50
CHAPITRE 2: MISE EN PLACE DE LA PLATEFORME D'ADMINISTRATION CIBLÉE HYBRIDE APTAMÈRE-PAM.....	51
Matériels et méthodes.....	52
1. Matériels.....	52
2. Préparation des solutions stock	55
3. Marquage radioactif.....	55
4. Purification par électrophorèse en gel.....	55
5. Purification par RP-HPLC	56
6. Tests d'affinité et de spécificité	57
6.1. Préparation de la suspension bactérienne	58
6.2. Préparation des solutions d'aptamères	58
6.3. Incubation et lavages	59
6.4. Analyse des résultats	59
7. Préparation du conjugué.....	60

7.1. Déprotection du 2,5-diméthyl furane-maléimide-F23-(6)-FAM.....	61
7.2. Synthèse du conjugué.....	61
8. Test d'activité antimicrobienne.....	62
Résultats.....	63
1. Tests d'affinité et de spécificité.....	63
1.1. Validation de l'aptamère F23.....	63
1.2. Affinité de l'aptamère maléimide-F23-cystéine-pep 1037.....	64
1.3. Affinité du conjugué.....	65
2. Préparation et caractérisation du conjugué.....	67
3. Activité antimicrobienne du conjugué.....	71
Discussion.....	72
1. Aptamères : De bon vecteurs qui nécessitent de l'optimisation.....	72
1.1. Taille d'aptamères.....	73
1.2. Aptamères avec un bras espaceur.....	74
1.3. Aptamère et biofilm.....	75
2. Agent antimicrobien : stratégies pour pallier aux problèmes de séquences, charges et positions de conjugaison.....	75
Conclusion.....	77
Références.....	78

Liste des figures

Figure 1 : Peptides antimicrobiens avec trois structures secondaires. Hélice α LL37, β -turn/sheet de la protegrin et α/β de la β defensin 2, Les ponts disulfures sont en jaune	7
Figure 2 : Mécanismes d'actions des peptides antimicrobiens	10
Figure 3: Les mécanismes d'action intracellulaires.	12
Figure 4: Etapes de formation de biofilm: modèle de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figure 5: Evolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX).....	24
Figure 6: Exemples d'utilisation d'oligonucléotides comme vecteurs d'administration ciblée.....	29
Figure 7: Schéma illustrant le principe du projet proposé, (Structures 3D du pep1037 et schématique approximative de l'aptamère F23, PyMOL)	34
Figure 8: Structure of cys-pep1037 and its corresponding dimer.....	43
Figure 9: Formation of mal-cys-pep1037 via a thiolene reaction between cys-pep1037 and maleimide.	46
Figure 10. Inhibiting effect of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pep1037, cys-pep1037 (dimer) and mal-cys-pep1037 (mal-pep) on the formation of biofilms.	48
Figure 11. Effect of pep1037, cys-pep1037 dimer (dimer) and mal-cys-pep1037 (mal-pep) on the degradation of an established <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm (ATCC 27853) after 24 h.....	49
Figure 12 : Structures prédites de l'aptamère F23, a) de l'aptamère F23 et b) du poly (A)-F23 (figures prédites de mfold)	53
Figure 13: Modification de l'aptamère par le groupement maléimide.....	54
Figure 14: Schéma explicatif du test d'affinité.	58
Figure 15: Schéma explicatif de la préparation du conjugué.	60
Figure 16: Schéma réactionnel pour la préparation d'hybride aptamère-(PAM).....	61
Figure 17: Test de spécificité de l'aptamère F23. CN= contrôle négatif (aptamère en absence de bactéries), Quatre bactéries testées: <i>E.coli</i> DH5 α , <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 et <i>Pseudomonas fluorescens</i> 279 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	63
Figure 18: Test d'affinité de l'aptamère F23, (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, $K_d=39\text{nM}$, <i>E.coli</i> et <i>Pseudomonas putida</i>)	64
Figure 19: Affinité de l'aptamère maléimide-F23 (<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853).....	65
Figure 20: Purification des aptamères F23 par RP-HPLC	68
Figure 21 Purification du conjugué pep 1037-cys-mal-F23 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A) Hybride F23-mal-cys-pep + F23-mal B) F23-mal.....	70
Figure 22 : <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 est incubée séparément avec le peptide cys-pep 1037 et le conjugué F23-mal-cys-pep1037	71
Figure 23: Exemple de protocole de SELEX sans amorces.	74
Figure 24: Conjugué thermosensible.....	76

Liste des tableaux

Tableau 1: Stratégies bactériennes pour la résistance aux antibiotiques.....	3
Tableau 2: peptides antimicrobiens naturels modifiés, synthétiques et les séquences mimétiques	14
Tableau 3: Exemples d'applications d'aptamères.....	28
Tableau 4: Bacterial growth inhibitory effect of the peptides (MIC values expressed in mg/L). ^a	45
Tableau 5:Gradient de purification de l'aptamère F23-(6)-FAM.....	57

Liste des abréviations

AA: Acide Aminé
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNsb : ADN simple brin
APS: Persulfate d'Ammonium
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Adénosine Tri-Phosphate
A: Adénine
BSA: Bovine Serum Albumin
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
CPP: Cationic Penetration Peptide
C: Cytidine
DTT: Dithiothréitol
E. coli: Escherichia coli
EDTA: Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
ESI: Electrospray Ionization (Ionization par Électronébulistion)
FAM: Fluorescéine Amidite
FACS: Fluorescence-Assisted Cell Sorting (cytométrie en flux)
FK: Fibrose Kystique
G:Guanine
LB: Luria Broth
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice)
MHA: Mueller Hinton Agar
MHB: Mueller Hinton Broth
MS: Mass Spectrometry
P.aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa
PAM: Peptide Antimicrobien
cPAM: Peptide Antimicrobien Cationique
PEG: PolyEthylène Glycol
Pep 1037: peptide 1037
Pep 1037-cys-mal-F23: le conjugué peptide 1037-cystéine-maléimide-aptamère F23
PCR: Polymerase Chain reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
POC: Peptide Oligonucléotide Conjugate
(p)ppGpp: Guanosine PentaPhosphate
RP-HPLC: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography
Rpm: Rotation par minute
SDS: Dodécylsulfate De Sodium
SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
siRNA: small Interfering Ribonucleic Acid
TEMED: N,N,N,N'-TétraMéthylEthylèneDiamine
TBE: Tris Borate EDTA
TBMg: Tris Borate Magnésium
TSB: tryptic Soy Broth
T: Thymine
VEGF: Vascular Endothelial Growth Facto

Mise en contexte

La résistance aux antibiotiques constitue de nos jours un véritable problème de santé Publique (Levy & Marshall 2004, Marston et al 2016, Payne & Tomasz 2004).

Les microbiologistes décrivent aujourd'hui des taux élevés et une progression de multirésistance d'espèces bactériennes impliquées dans les infections communautaires comme *Streptococcus pneumoniae* et d'autres acquises à l'hôpital telles que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Moremi et al 2016). Ce phénomène résulte de l'emploi intensif et inapproprié des différentes familles d'antibiotiques et se trouve amplifié par la transmission interindividuelle des souches résistantes (Astagneau P 2011). Il en découle des complications médicales graves qui nécessitent des traitements prolongés, plus coûteux par des doses plus élevées et des effets secondaires drastiques.

Les infections nosocomiales sont devenues l'une des causes fréquentes de mortalité. Ainsi, le nombre de patients qui meurent par des infections des micro-organismes résistants est estimé à 25 000 cas annuellement dans les pays de l'union européen. Ces infections sont également à l'origine de l'augmentation des coûts d'hospitalisation qui sont de 14 à 26 millions de dollars chaque année au Canada par exemple (Comité d'experts sur la résistance aux antibiotiques 2014). Par conséquent, plusieurs interventions qui visent un meilleur usage d'antibiotiques ont été mises en place par les organismes impliqués. A titre d'exemple des programmes de surveillance intégrée d'antibiorésistance, sous le nom 'd'antimicrobial stewardship', ont été créés par les organismes institutionnels de santé canadiens en vue de préserver et prolonger l'efficacité d'antibiotiques sur le marché (Fishman 2006, Zhanel et al 2010).

En contrepartie, peu de nouveaux antibiotiques sont identifiés et mis sur le marché puisque l'antibiothérapie ne suscite plus l'intérêt des industries pharmaceutiques à partir des années 1990. D'ailleurs, les grandes firmes du domaine se sont dirigées vers les créneaux les plus lucratifs comme la recherche en cancérologie (Stanton 2013). En plus, le développement de nouveaux agents antimicrobiens se trouve insuffisant pour faire face au problème étant donné le risque de perte d'efficacité de toute nouvelle molécule utilisée en thérapie au fil des années. Il s'agira plutôt de trouver de nouvelles stratégies pour ne pas être confronté aux mêmes difficultés des antibiotiques actuels (Stanton 2013). La communauté scientifique spécialiste recommande la création de nouvelles classes d'agents antimicrobiens spécifiques sur la base du principe d'administration ciblée dite 'Targeted delivery' comme l'une des pistes de la quête du médicament idéal (Pinto-Alphandary et al 2000).

Dans ce contexte et en se basant sur le principe précédemment cité, nous développons une molécule biohybride oligonucléotide-peptide pour cibler spécifiquement une bactérie multi-résistante modèle: *Pseudomonas aeruginosa*.

Introduction

1. L'antibiorésistance

1.1. Mécanismes de résistance

Mis à part leur résistance naturelle, les bactéries initialement sensibles sont capables d'acquérir et d'accumuler différents mécanismes de résistance suite à une exposition sub létale ou de courte durée à l'antibiotique. Trois types de stratégie peuvent être employés et sont résumées dans le tableau1.

Tableau 1: Stratégies bactériennes pour la résistance aux antibiotiques

(Mérens et al 2011)

Stratégies	Exemples
Inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'un système d'hydrolyse enzymatique.	Pénicillinases, bêta-lactamases: <ul style="list-style-type: none">● <i>Résistance des staphylocoques</i> à la pénicilline G● <i>Résistance de Klebsiella pneumoniae</i> au carbapénème
Empêchement d'accès de l'antibiotique à sa cible par la diminution de perméabilité membranaire à la pénétration des antibiotiques: <ul style="list-style-type: none">a) Modification de la structure des porines.b) Surexpression des pompes d'efflux qui sert à éjecter l'antibiotique à l'extérieur de la cellule.	<ul style="list-style-type: none">● Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à la ticarcilline, aux carbapénèmes, aux fluoroquinolones.● Résistance du pneumocoque et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux fluoroquinolones
Modification de la cible par la diminution de son affinité à l'antibiotique, son altération ou sa substitution.	<ul style="list-style-type: none">● Diminution de l'affinité des PBP (protéine liant la pénicilline, enzymes de synthèse de peptidoglycane) pour les bêta-lactamines chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Pour synthétiser les nouvelles molécules impliquées dans ces systèmes de résistance, les bactéries combinent mutations et acquisition de gènes exogènes par les éléments génétiques mobiles (plasmide et transposons): On parle alors de résistance génétique. Les bactéries peuvent accumuler plusieurs mécanismes de résistance ce qui leur permet d'échapper à plusieurs antibiotiques à la fois et d'échanger du matériel génétique, ce qui conduit à la dissémination de la résistance (Blair et al 2015).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*: bactérie modèle de résistance aux antibiotiques

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) est une bactérie gram négatif en forme de bacille pyocyanique qui pose de plus en plus un problème de traitement médical. *P.aeruginosa* est reconnue pour sa multi-résistance aux différentes familles d'antibiotiques telles que les β -lactamines, les aminoglycosides, les fluoroquinolones, la ticarcilline, et même ceux de dernier recours comme les carbapénèmes (Sader et al 2017).

Ce pathogène opportuniste multirésistant est reconnu pour les infections communautaires et nosocomiales qu'il cause et se trouve impliqué dans 30%-40% d'infections pulmonaires chez les patients de la fibrose kystique (FK ou la mucoviscidose) selon l'agence de la santé publique du Canada. FK est la maladie génétique la plus répandue chez les enfants et les jeunes adultes au Canada. Selon le rapport annuel 2013 du 'registre canadien de la fibrose kystique environ 4000 patients dont 60% d'adultes sont traités dans les hôpitaux (Canadian-Cystic-Fibrosis-Registry 2016). Chez les patients de FK, des mutations du gène de la CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) causent l'accumulation du mucus épais et visqueux au niveau du tissu pulmonaire et des voies respiratoires (Bhagirath et al 2016). Cet état anormal des conduits aériens favorise non seulement la colonisation du poumon par *P.aeruginosa* (Gilljam et al 1989) mais aussi affecte les effecteurs de l'immunité innée. A titre d'exemple la concentration élevée des ions chlorure dans le tissu pulmonaire, inhibe l'action des PAM tels que la β -défensine 1, la lactoferrine et le lysozyme (Joris et al 1993). Par conséquent, *P.aeruginosa* persiste et détériore avec *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* le tissu pulmonaire (Peleg et al 2010). De plus, *P.aeruginosa* est capable par ses mécanismes de résistance d'empêcher ou réduire l'action des antibiotiques. A des stades plus avancés, *P.aeruginosa* utilise ses facteurs de virulence pour vivre en communauté dans un biofilm (Potvin et al 2003) . Elle se trouve enrobée dans de l'alginate qui la protège contre la phagocytose (Boyd & Chakrabarty 1995). La Co-colonisation des poumons par les biofilms de *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* est difficile à éradiquer et donne lieu à une insuffisance respiratoire chronique qui peut conduire à la mort (Tomlin et al 2001). Les interactions entre les deux types de biofilms sont toujours sujet d'études.

Actuellement, la thérapie antipseudomonale est limitée au choix de combinaisons d'antibiotiques et l'optimisation de leur posologie. Les patients de FK sont souvent traités après une antibiothérapie prolongée inhalée et intraveineuse qui combine une β -lactame et un aminoglycoside (Mesaros et al 2007). Certaines molécules prometteuses telles que les inhibiteurs des pompes à efflux qui permettent de restaurer l'efficacité des antibiotiques ont été étudiées (Wang et al 2009). Sinon les innovations thérapeutiques restent rares. Pour toutes ces raisons, *P.aeruginosa* a été choisie comme modèle bactérien pour cette étude.

2. Les peptides antimicrobiens (PAM)

Les peptides antimicrobiens (PAM), comme leur nom l'indique, sont des molécules protéiques synthétiques ou naturelles qui ont des propriétés antibiotiques. Ces agents antimicrobiens sont largement distribués dans la nature. Actuellement les bases de données dénombrent plus de 2000 candidats ont été isolés d'origines différentes : invertébrés, insectes, microorganismes, plantes, poissons, amphibiens, mammifères et humain (Wang et al 2015). Ils sont généralement produits par des organismes multicellulaires et des bactéries comme un mécanisme de défense contre les microorganismes opportunistes pathogènes (Nguyen et al 2011). Chez l'homme, les PAM sont des modulateurs de l'immunité innée et des effecteurs importants pour l'initiation de l'immunité adaptative. En plus de leur action directe sur l'agent microbien infectieux, ils sont impliqués indirectement dans sa neutralisation par l'induction des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages et les monocytes (Lai & Gallo 2009). Actuellement, ils sont largement étudiés pour une classe alternative prometteuse aux antibiotiques.

2.1. Structures et classification

Les PAM sont répartis en deux grands groupes :

2.1.1. Les peptides antimicrobiens anioniques

Il s'agit de petites molécules riches en acides glutamique et aspartique. Le représentant le plus célèbre de cette classe est la dermcidin humaine (Schitteck et al 2001).

2.1.2. Les peptides antimicrobiens cationiques (cPAM)

Cette classe paraît la plus prometteuse dans le développement des médicaments. Ces peptides interagissent via des interactions hydrophobes faibles avec les cellules animales tandis que leurs interactions avec les parois bactériennes demeurent plus fortes. Il s'agit en effet d'interactions hydrophobes et électrostatiques. Les cPAM comportent de 20 à 50 acides aminés dont 40-60% de résidus hydrophobes. Chacun peut contenir de 2-9 résidus chargés. Ils sont riches en acides aminés basiques arginine et lysine. Le ratio résidus hydrophobes: résidus chargés peut aller de 1:1 à 1:2 (Andrès & Dimarcq 2007). Tous les résidus hydrophobes s'assemblent d'un même côté et il en est de même pour les résidus hydrophiles. Cet aspect est responsable de leur caractère amphiphile (Andrès & Dimarcq 2007). Sur la base de leur structure, les membres de cette classe peuvent être répartis en trois sous-groupes comme le montre la figure 1:

I) Les peptides linéaires formant des hélices α . Ils sont des peptides de moins de 40 acides aminés. Ils se caractérisent essentiellement par l'absence de résidus cystéines (Castro & Fontes 2005). Ils sont généralement déstructurés dans l'eau et ne prennent la conformation hélicoïdale qu'à proximité de la membrane. Cette famille comporte : les cécropines isolés des insectes, les magainines de la peau de xénope et les cathélicidines dont celle humaine LL37, la seule famille reconnue chez les mammifères (Castro & Fontes 2005).

II) Les peptides linéaires riches en certains acides aminés. Leur séquence comporte environ 40 acides aminés. On en distingue les peptides riches en proline tels que les abaécines des abeilles, ceux riches en proline et en arginine tels que les bacténicines des bovins, l'indolicidine des bovins riche en tryptophane et les histatines salivaires humains riches en histidine (Lai & Gallo 2009).

III) Les peptides riches en cystéines (à un ou plusieurs ponts disulfures). Il s'agit de la classe la plus vaste et la plus diversifiée. Ils adoptent une structure en feuillets β stabilisés par des ponts disulfures ou mixte en α et β (Dimarcq et al 1998). On peut citer ceux à un seul pont disulfure comme les brévinines isolés des grenouilles et les protégrines porcins à deux ponts disulfures. A cette classe appartient aussi la grande famille des défensines α très répandue chez l'homme, β et θ à trois ou quatre ponts disulfure (Dimarcq et al 1998).

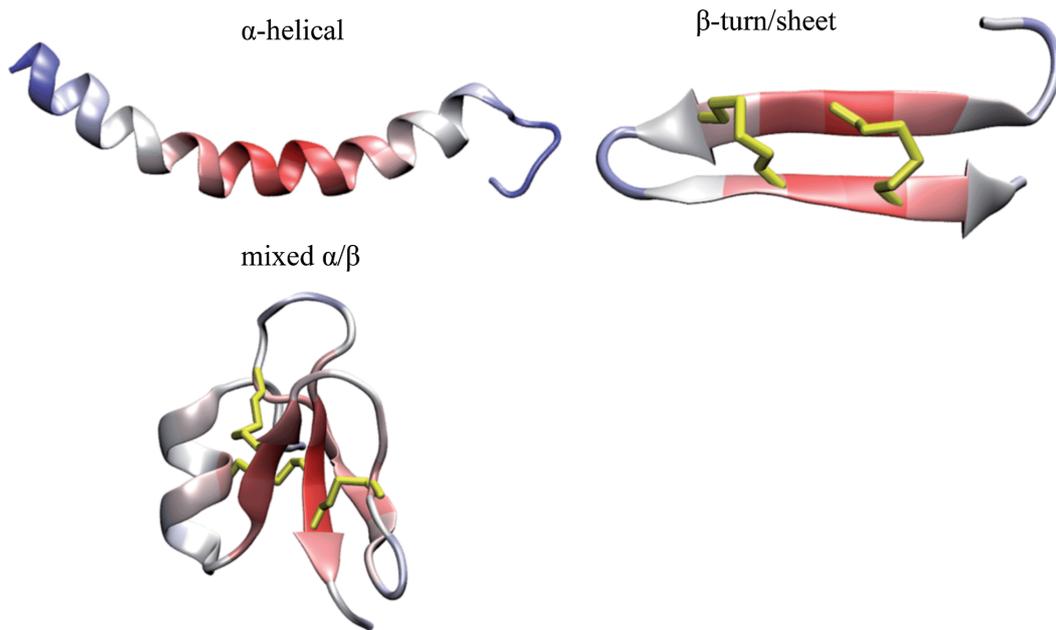


Figure 1 : Peptides antimicrobiens avec trois structures secondaires. Hélice α LL37, β -turn/sheet de la protegrin et α/β de la β defensin 2, Les ponts disulfures sont en jaune

Figure adaptée de (Zhang et al 2014)

2.2. Activité antimicrobienne des PAM

La taille, la charge, la structure en hélice, l'hydrophobicité, le caractère amphiphile et la solubilité constituent des propriétés dépendantes qui modulent la fonction des PAM. Il en découle que toute modification du peptide doit prendre en compte les effets de ces paramètres physico-chimiques les uns sur les autres et sur la fonction finale du dit peptide (Bahar & Ren 2013a, Bahar & Ren 2013b). L'activité et la spécificité des peptides antimicrobiens dépendent bien évidemment de leur taille et de leur composition en acides aminés, mais surtout de leur charge. Il est reconnu que l'activité antimicrobienne s'améliore en augmentant la charge cationique. Inversement, dépassé un nombre limité de charges, l'activité hémolytique du peptide devient plus importante réduisant ainsi sa sélectivité (Dathe et al 2001). La conformation paraît également un facteur bien impliqué dans l'activité antimicrobienne. En effet, les peptides bien structurés en feuillets β sont plus actifs que les linéaires. Il a été prouvé que les hélices α permettent une interaction optimale avec les biomembranes (Dathe & Wieprecht 1999).

Le caractère amphiphile et l'hydrophobicité des peptides antimicrobiens déterminent leurs interactions avec les lipides membranaires des cellules cibles. Cependant leur influence est dépendante de la conformation du PAM. Ces deux caractéristiques sont aussi responsables de la toxicité des PAM aux cellules eucaryotes (Yeaman & Yount 2003). Les résultats globaux de plusieurs études indiquent qu'il faut concilier hydrophobie et distribution de charge pour permettre la perturbation des membranes bactériennes sans endommager les membranes (hôtes) des mammifères.

Les PAM sont largement étudiés pour leur effet bactéricide rapide et leur large spectre d'activité. Les PAM cationiques sont capables de mener de fortes interactions hydrophobes et électrostatiques avec leur cible bactérienne. Les PAM agissent en synergie avec les antibiotiques en traitement clinique, comme l'administration de magainin II et cecropin A avec rifampicin contre *P.aeruginosa* (Cirioni et al 2008).

Il est reconnu qu'il est difficile pour la bactérie de développer une résistance contre les PAM vue leur rapidité d'action et l'absence de cible spécifique. Cependant certains cas de résistance ont été rapportés par deux mécanismes possibles (Park et al 2011):

- Le changement de charges des molécules de surface.
- Le clivage par une protéolyse extracellulaire.

Ces deux réactions se trouvent limitées et nécessitent une plus longue période par rapport aux mécanismes d'actions des antibiotiques. Cette dernière caractéristique explique l'intérêt des chercheurs à remplacer les antibiotiques par les PAM.

L'activité antimicrobienne des PAM peut être évaluée par la concentration minimale inhibitrice dite CMI qui correspond à la plus petite concentration qui permet d'inhiber la croissance bactérienne.

2.3. Modes d'action

2.3.1. Perméabilisation des membranes

Quatre modèles d'interactions sont définis dans la littérature. Tous ces modèles (A, B, C et D) illustrés dans la figure 2 finissent par l'échappement du contenu cellulaire et donc la lyse osmotique.

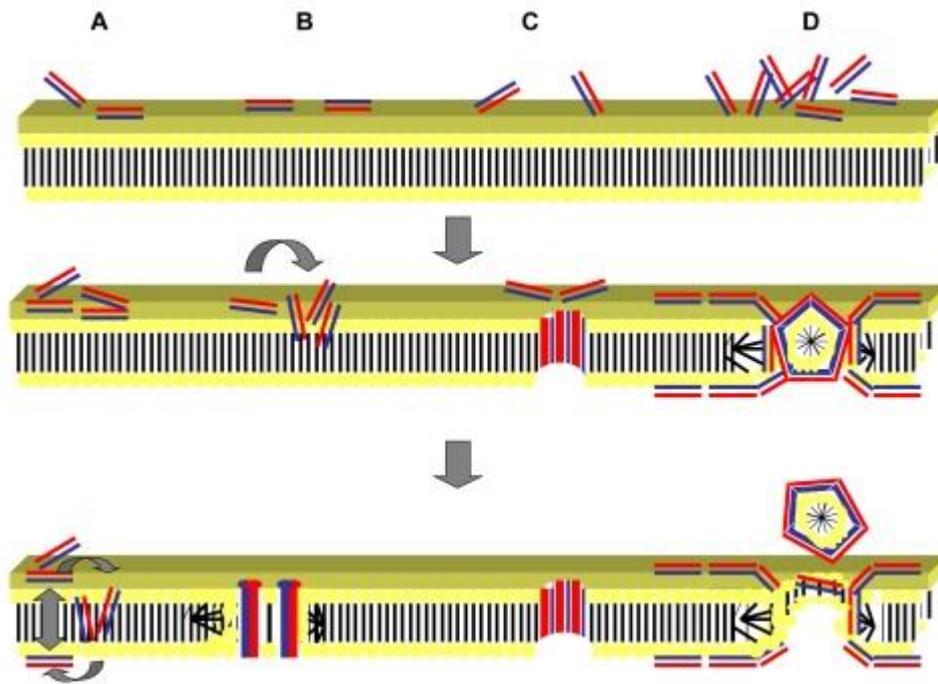


Figure 2 : Mécanismes d'actions des peptides antimicrobiens

Figure tirée de (Laverly et al 2011)

Les PAM sont en formes de cylindres incluant leurs deux régions hydrophiles (en rouge) et hydrophobe (en bleu). **A) Le modèle d'agrégats:** Les peptides antimicrobiens s'associent en agrégats capables de traverser la membrane sans adopter une orientation particulière (Matsuzaki 1998). **B) Le modèle de "pore toroidal":** Les peptides s'orientent perpendiculairement avant de s'insérer dans la membrane. Leur partie hydrophile interagit avec les têtes phospholipides membranaires. La formation des pores est initialisée par la distorsion de la membrane (Yeaman & Yount 2003). **C) Le modèle "barrel stave":** ou les douves de tonneau. Les peptides antimicrobiens s'insèrent sans déformation de la bicouche lipidique. Leur recrutement progressif permet l'élargissement des pores (Matsuzaki et al 1996). **D) Le modèle "carpet" ou en tapis:** Les peptides se localisent parallèlement à la bicouche lipidique et recouvrent toute la surface membranaire. A une concentration critique seuil, ils y exercent un effet détergent. Différemment des deux modèles précédemment cités, les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane lipidique (He et al 1996).

2.3.2. Inhibition des fonctions intracellulaires

Certains peptides sont capables de transloquer la membrane plasmique pour s'accumuler dans le cytoplasme afin de s'attaquer aux fonctions indispensables à la survie de la bactérie. Ce mode d'action a été décrit pour les peptides riches en arginine et proline (Li et al 2014). Différentes stratégies sont adoptées et décrites dans la figure 3:

- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Interaction ADN, ARN, protéines, etc).
- Inhibition des activités enzymatiques.
- Perturbation de la synthèse et de l'organisation du peptidoglycane. Ce dernier mode d'action a été proposé pour les bactéries Gram positif.

Il est reconnu que chaque peptide peut opter pour différents mécanismes simultanément et plusieurs PAM peuvent agir en synergie contre un microorganisme cible (Boyd & Chakrabarty 1995).

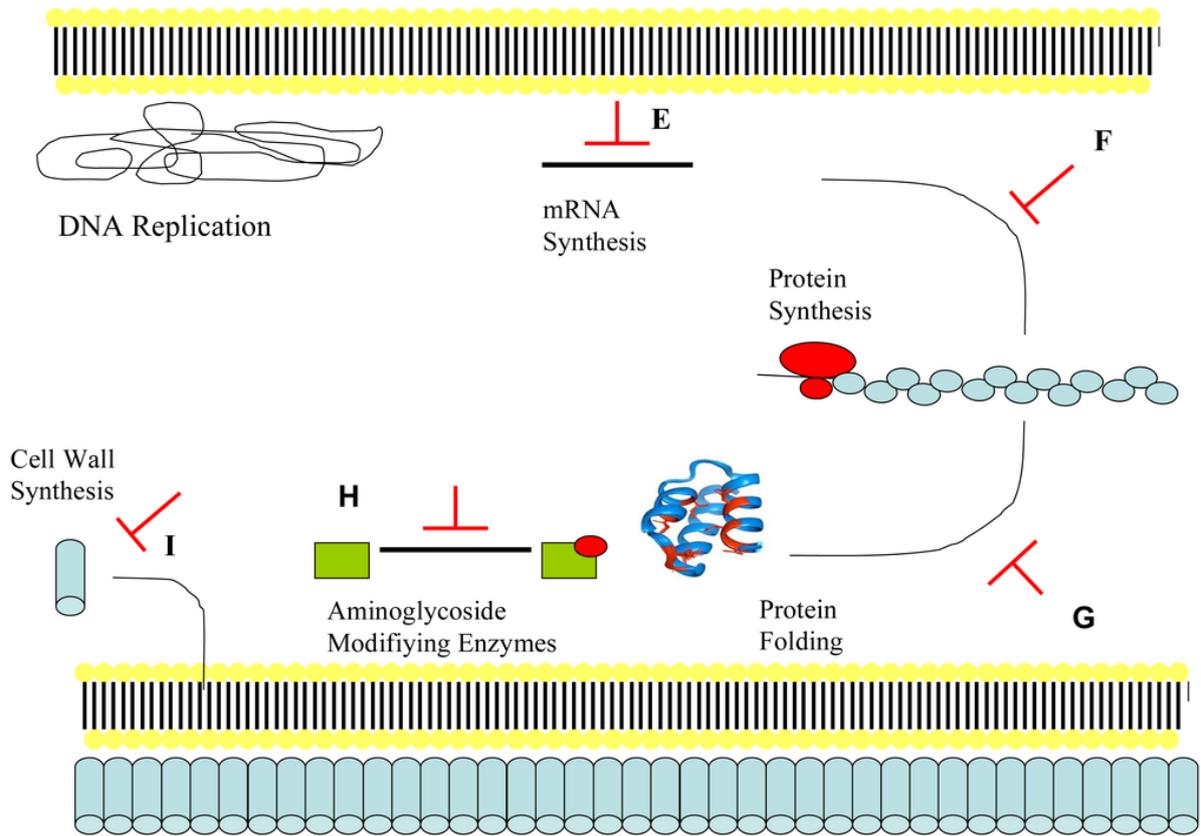


Figure 3: Les mécanismes d'action intracellulaires.

Figure tirée de (Laverly et al 2011)

2.4. PAM : Modifications pour un meilleur potentiel thérapeutique

Le potentiel thérapeutique des PAM est encore limité par leur cytotoxicité, leur distribution tissulaire et leur protéolyse. L'utilisation clinique des PAM restent également confrontée à leur taille et séquences qui en font des molécules coûteuses et difficiles de synthèse.

Malgré les différentes formulations proposées, la majorité des peptides synthétiques échouent les phases cliniques et seulement quelques candidats commercialisés sous forme de gels, de bains de bouche ou d'aérosol, ont été rapportés par la littérature. Toutefois, la Gramicidin S et la Polymyxin B sont deux exemples populaires de peptides antimicrobiens pour utilisation topique. L'histatine p-113 développé contre *P.aeruginosa* chez les patients atteints d'infections respiratoires chroniques a été délaissé durant les essais précliniques (Hancock 2000, Sajjan et al 2001). IB 367, l'analogue synthétique de protegrin I stabilisé par deux ponts disulfures, a été reconnu efficace dans le traitement des mucites orales liées au cancer (CMI=2µg/ml) (Hancock 2000, Mosca et al 2000). Les limites précédemment citées peuvent être contournées par la création de nouvelles générations de peptides antimicrobiens modifiés. Différentes classes de PAM modifiés sont générés par un design rationnel sur la base des trois approches suivantes (Brogden & Brogden 2011):

- L'activité antimicrobienne de PAM doit être couverte par la plus petite séquence possible afin de réduire les coûts de synthèse.
- L'activité antimicrobienne des PAM doit être maintenue ou augmentée dans les conditions physiologiques (sérum, environnement à concentration élevée en sels....) tout en évitant la dégradation enzymatique.
- L'activité antimicrobienne doit être plus spécifique (un spectre d'activité plus étroit) pour cibler un pathogène spécifique chez l'hôte.

Tableau 2: peptides antimicrobiens naturels modifiés, synthétiques et les séquences mimétiques

Classe	Stratégie	Exemples
Les congénères	<ul style="list-style-type: none"> - Détente de la structure tertiaire par la réduction des ponts disulfures ou la substitution de la cystéine afin d'augmenter l'activité antimicrobienne - Remplacer les acides aminés du peptide parent pour améliorer certaines caractéristiques (la charge, le caractère amphiphile, pénétration cellulaire..) ou acquérir de nouvelles fonctions (Transfert du gène) - Tronquer les extrémités N ou C terminal du peptide parent pour identifier la plus petite taille de son domaine actif et leurs propriétés utiles (résistance au sel ...) 	<p>Human β-defensin-1 linéaire (Schroeder et al 2011)</p> <p>Peptides riches en arginine ou en histidine (Futaki et al 2001, Kichler et al 2003).</p> <p>Peptides enrichis en acides aminés hydrophobes (Pasupuleti et al 2009)</p> <p>Les dérivés de CAP-18, LL-37 et SMAP-29 (Larrick et al 1993, Travis et al 2000)</p> <p>Les analogues de Melittin (Saravanan et al 2010)</p> <p>La librairie des dérivés tronqués du peptide LL-37 (Nagant et al 2012)</p>
Les mimétiques	Des molécules non peptidiques préparées avec les mêmes caractéristiques et fonctions des PAM naturels sans les propriétés limitantes de ces derniers.	<p>Molécules sans activité hémolytique:</p> <p>Peptoid 1-C134mer actif contre les biofilms de <i>P.aeruginosa</i> et</p>

		<p><i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Chongsiriwatana et al 2011, Palermo & Kuroda 2010)</p> <p>Oligomère C12K-7α8 actif contre les bactéries Gram négative (Radzishovsky et al 2007).</p> <p>Les composés penylalkyne et arylamides NC12-2 β12 actifs contre les bactéries Gram négative et <i>Candida</i> Spp (Hua et al 2010, Zaknoon et al 2009).</p>
Les peptides conjugués*	Les PAM peuvent être conjugués aux anticorps spécifiques aux antigènes membranaires ou à un ligand d'un récepteur spécifique du pathogène ciblé. Ils peuvent être également conjugués aux liposomes ou aux stéroïdes pour leur utilisation comme des effecteurs de l'immunité innée.	<p>Peptides antifongiques conjugués aux anticorps recombinants spécifiques de <i>Fusarium spp</i> (Peschen et al 2004).</p> <p>SMAP 29-IGgE pour cibler <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Franzman et al 2009).</p>
Les peptides immobilisés	Les PAM sont incorporés dans les films (plastique, silicone..) d'emballage industriels, encapsulés dans des nanoparticules ou adsorbés aux surfaces de différentes natures afin de	<p>Gramicidin A (film polyelectrolyte) (Guyomard et al 2008) .</p> <p>LL-37 (encapsulé dans un fil de silica) (Izquierdo-Barba et al 2009).</p>

	maintenir leurs propriétés antimicrobiennes.	
Les cyclotides ou cyclopeptides	Ils sont dotés par une structure cyclique via les ponts disulfures qui leur permet une stabilisation. Ils viennent comme une imitation de certains PAM circulaires naturels de plantes pour acquérir la résistance à la chaleur et la dégradation protéolytique.	GS14dK4, peptide analogue de la gramicidin S (Abraham et al 2007).
les peptides hybrides	Il s'agit de séquences originaires de combinaisons de domaines actifs et responsables des propriétés recherchées de deux ou trois peptides naturels. Ce concept permet d'augmenter l'activité antimicrobienne, la résistance, la stabilité et d'autres propriétés bonus aux peptides prometteurs.	La famille des hybrides cecropin A–melittin (CEME), CEMA, CP26 and CP29 (Steiner et al 1988).

* Les peptides conjugués constituent, à notre connaissance, l'une des catégories les moins explorées. Ils devraient être administrés pour qu'ils soient:

- à **plus faibles concentrations**.
- pour cibler **un pathogène spécifique**.
- et accompagnés de **moins d'effets secondaires**.

Ces peptides conjugués sont préparés pour intégrer des systèmes d'administration ciblées appelés 'Targeted delivery system' pour améliorer les propriétés des PAM (Costa et al 2016) telles que :

- La prolongation de la durée de vie.
- La réduction de la cytotoxicité.
- La réduction des concentrations de traitement, etc

2.5. Effet de la dimérisation sur l'effet antimicrobien des peptides

Cette partie consiste en une brève étude de l'effet de dimérisation inter et intra moléculaire par les ponts disulfures sur les propriétés intrinsèques des PAM et leur activité antimicrobienne.

Le potentiel thérapeutique marqué des dimères naturels tels que CAP11 et distinctin a encouragé les chercheurs à explorer la piste de dimérisation pour générer de nouveaux agents antimicrobiens prometteurs de la même classe (Batista et al 1999, Yomogida et al 1996). Bien qu'elle ne soit pas largement explorée comme la dimérisation par les branchements de lysine, celle à travers la cystéine a été rapportée pour son utilisation dans la modulation des propriétés de certains cPAM. Seulement quelques études discutent les liaisons cystéine en extrémité N-terminale. Il a été précédemment démontré que les ponts intermoléculaires cys-cys procure aux peptides une plus grande aptitude à la lyse membranaire et une activité bactéricide plus rapide comparées à leurs monomères (Datta et al 2016). Elle leur permet également une certaine robustesse dans les concentrations salines élevées (Lee et al 2008).

La dimérisation intermoléculaire peut être réalisée en introduisant des résidus cystéine entre les extrémités N et C-terminaux ou par la liaison covalente des extrémités. Collectivement, quel que soit son emplacement, à l'exception de celle en N-terminal, les dimérisations cystéine montrent des résultats similaires contre les bactéries Gram négatives à savoir une amélioration des effets antimicrobiens (Dempsey et al 2003). En effet, les dimères sont capables d'inhiber la croissance bactérienne à des concentrations inférieures à celles nécessaires pour leurs monomères. A titre d'exemple, on peut citer la défensine dimérique Defr1 avec un résidu cystéine naturel qui présente une activité puissante contre *P. aeruginosa* PAO1 (6 µg/ml) comparativement au monomère de 34 résidus (50 µg/ml) (Morrison et al 2002). À l'inverse, le dimère VG16KRKP affiche des valeurs de CMI 10 et quatre fois moins importantes respectivement contre *E. coli* et *P.aeruginosa* en comparaison à son monomère. Cet effet a été corrélé à l'augmentation de la surface des interactions hydrophobe et électrostatique qui renforcent la liaison aux lipopolysaccharides

membranaires et par conséquent la neutralisation du pathogène (Liu et al 2010). Il n'est pas nécessairement lié à une modification du mode d'action.

2.6. Action des peptides antimicrobiens sur les biofilms

2.6.1. Les biofilms

Les bactéries pathogènes sont caractérisées par leur capacité de vivre en communauté sous forme d'amas structurés adhérents à une surface et protégés dans une matrice polymérique de leur propre synthèse (Filloux & Vallet 2003). Ce mode de vie constitue une réponse aux signaux extracellulaires environnementaux ou échangés entre les cellules bactériennes (Quorum sensing).

Comme le décrit la figure 4, la formation du biofilm bactérien est initiée par la fixation des cellules planctoniques à une surface (1). Dans le contexte de notre étude on s'intéresse aux surfaces biotiques (les muqueuses pulmonaires par exemple). D'abord, les bactéries organisées en microcolonies font appel aux différents facteurs de virulence tels que les pili et flagelles qui résultent en un attachement irréversible et la formation d'une monocouche cellulaire (2). Ensuite elles synthétisent les exopolysaccharides (EPS) et les autres composants de la barrière polymérique de protection (3). Le biofilm est ainsi mature et se développe par le recrutement de nouvelles cellules planctoniques et par la division cellulaire (4). Enfin le biofilm cultivé est dispersé et les bactéries se déplacent pour coloniser d'autres surfaces (5) , ce qui déclenche le processus de formation d'un nouveau biofilm (Garrett et al 2008).

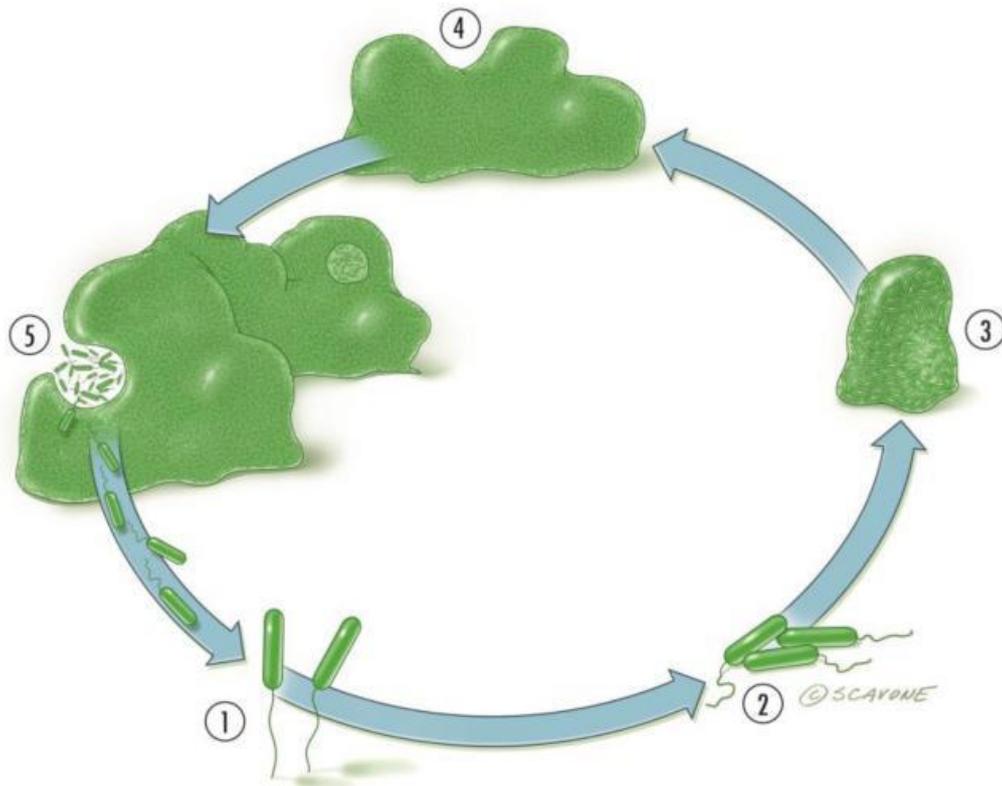


Figure 4: Etapes de formation de biofilm: modèle de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure tirée de (Ha & O'Toole 2015)

2.6.2. Action des peptides antimicrobiens versus antibiotiques sur les biofilms

Comparées aux bactéries planctoniques, les bactéries en biofilm, dites sessiles, sont plus résistantes aux antibiotiques conventionnels (Obst et al 2006). Ce fait explique le grand intérêt apporté au développement d'agents antimicrobiens qui ciblent le biofilm et la révélation des déterminants de la résistance génétique.

Les mutations, la lente croissance et le métabolisme cellulaire réduit des bactéries sessiles sont essentiellement à l'origine de leur résistance. Les propriétés viscoélastiques de la matrice protectrice des biofilms combinée aux interactions électrostatiques avec les alginates polyanioniques entraînent la diffusion ralentie des antibiotiques aux biofilms traités (Nichols et al 1988, Nichols et al 1989). Ces conditions favorisent le développement d'une résistance progressive des cellules sessiles.

Contrairement aux antibiotiques, les peptides antimicrobiens sont capables de perméabiliser les membranes cytoplasmiques des bactéries, que ces dernières soient métaboliquement actives, en division cellulaire ou non. Bien que leur mode d'action ne soit pas complètement établi, il est reconnu que les PAM peuvent interférer aux différents stades de formation de biofilms bactériens pour inhiber leur mise en place. Initialement, ces agents antimicrobiens empêchent l'adhésion cellulaire à la surface via des liaisons électrostatiques avec la membrane (Bahar & Ren 2013a, Nizet 2006). Ils sont également capables de prévenir la maturation en agissant sur les molécules intervenant dans le système de communication intercellulaire défini sous le nom de quorum sensing (Horswill et al 2007). A ce sujet, il a été démontré que chez *P.aeruginosa*, la cathélicidine LL-37 cible les systèmes du quorum sensing *rhl* et *las* qui contrôlent la formation de biofilm (Overhage et al 2008).

Cependant, les interactions électrostatiques des peptides cationiques avec la matrice négativement chargée des biofilms peuvent retarder les PAM de les atteindre. En plus, la matrice d'alginate a été étudiée pour son effet barrière contre la diffusion des peptides (Shigeta et al 1997). Malgré cela, on reconnaît actuellement plusieurs candidats peptidiques tels que la cathélicidine humaine LL-37 qui sont capables d'inhiber la formation des biofilms, même à une concentration plus faible que leur CMI (Overhage et al 2008, Singh et al 2010). 0.5 µg/mL de LL-37 est suffisante pour inhiber la formation des biofilms de *P.aeruginosa* dont la CMI est de 64 µg/ml.

Différents peptides synthétiques de petites tailles (1-9 aa) issus de bibliothèques aléatoires ont été également approuvés pour l'inhibition de la formation de biofilm et leur destruction. Ces candidats sont intégrés dans la base des données BaAMPs (the database of biofilm-active antimicrobial peptides) (Di Luca et al 2015).

Un petit peptide synthétique issu d'une librairie aléatoire appelé 1037 se trouve capable de réduire à 50% les biofilms de *Burkholderia cenocepacia* et *Listeria monocytogenes* par la répression d'expression des gènes impliqués dans le processus de swarming (de la Fuente-Nunez et al 2012).

Il a été également prouvé que les peptides antimicrobiens peuvent agir en synergie avec certains antibiotiques tels que la ceftazidime, ciprofloxacine, imipénem et tobramycine pour inhiber la formation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et même en les détruire, du moins partiellement. Leur action permet de réduire les concentrations d'antibiotiques de 2 à 64 fois. Ces PAM peuvent jouer le rôle de suppresseurs des gènes de résistance aux antibiotiques et réduire la dispersion des cellules viables des biofilms matures (Reffuveille et al 2014). Les PAM peuvent aussi agir sur la cellule pour bloquer la réponse de stress médiée par le signal (p)ppGpp (de la Fuente-Nunez et al 2014b).

3. Aptamères

3.1. Propriétés générales des aptamères

Les aptamères sont des molécules d'ADN ou d'ARN simple brin. Ils sont des polyanions à pH neutre. Leur repliement par la formation de paires de bases via des ponts hydrogène leur permettent d'adopter leur configuration tridimensionnelle finale. Leur taille varie généralement de 15-90 nucléotides (5-30 KDa). Les aptamères peuvent être générés contre des cibles très variées: des acides aminés, des peptides, des protéines, des enzymes, des virus et des cellules vivantes procaryotes et eucaryotes par la technique SELEX (Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel) (Blind & Blank 2015). Leur utilité réside dans la spécificité d'interactions avec leur ligand. L'affinité de la cible aux ligands (les oligonucléotides dans ce cas) est déterminée par la constante de dissociation K_d qui reflète la force d'interaction entre les deux molécules. Dépendamment des applications, cette constante peut aller des nM au mM.

L'utilisation de ces molécules montre certains avantages par rapport aux anticorps pourraient les remplacer pour de multiples applications. En effet, elles montrent plusieurs avantages clés tels que:

- Tolérance aux changements de pH et température (dénaturation-renaturation).
- Production plus facile et moins coûteuse par la synthèse chimique, un processus hautement reproductible de nos jours.
- Plus de stabilité à température ambiante (plus longue durée de vie...).
- Plus faible immunogénicité.
- Plus haute spécificité et affinité à la cible dans certains cas (Jayasena 1999).

- Une meilleure pénétration cellulaire expliquée par leur petite taille (Yang et al 2006).
- Facilité d'ajustement des propriétés par conjugaison à d'autres groupes. En effet, les aptamères peuvent être facilement fonctionnalisés par des fluorophores ou d'autres molécules rapporteurs pour le diagnostic, des amines, des alkynes, des esters, des thiols, de la biotine, ou des molécules de la chimiothérapie et des siRNA pour des applications cliniques (Hernandez et al 2015). La conjugaison peut être réalisée par des liaisons covalentes ou non covalentes comme l'intercalation à travers les paires de base GC/GC. La chimie de couplage est en progression continue (Singh et al 2010) ce qui permettra une augmentation considérable de l'applicabilité potentielle des aptamères dans plusieurs domaines. Le coût des oligonucléotides d'ADN a d'ailleurs été divisé par dix au cours des vingt dernières années.

3.2. SELEX

Cette technique permet de générer et d'identifier des séquences de haute affinité et spécificité à la molécule cible. Elle consiste en un criblage *in vitro* de banques de 10^{13} – 10^{16} d'oligonucléotides aléatoirement synthétisés. La technique SELEX est basée sur le principe de répétition des étapes de sélection et amplification (Figure 5). La librairie d'ADNs_b est constituée de séquences ayant une partie centrale variable en séquences et en tailles. Cependant, toutes les séquences partagent une partie commune aux extrémités nécessaires pour l'étape d'amplification par PCR.

Le processus de sélection commence par l'incubation de la librairie avec la cible visée. Les séquences libres ou celles qui lient faiblement sont éliminées par séparation physique en effectuant des étapes de lavage avec des tampons. Dans l'étape suivante de SELEX, les séquences liées sont éluées et amplifiées par PCR et la librairie résultante est incubée de nouveau avec la cible. L'efficacité de l'étape de séparation permet de réduire considérablement le nombre de tours de sélection. La sélection négative (ou la contre sélection) sert à éliminer les séquences d'oligonucléotides qui se lient de manière non spécifique. Cette étape a pour but d'augmenter la spécificité des aptamères pour la cible (Jenison et al 1994). Elle permet un pré-nettoyage de la librairie initiale des séquences qui se lient à des protéines ou des sucres de la membrane cellulaire. Par conséquent, les aptamères obtenus à partir de ces sélections ont une grande sélectivité pour la cible.

Le procédé est répété 10-15 fois jusqu'à ce que la librairie soit principalement composée de séquences ayant une forte affinité et spécificité pour la cible. En augmentant le nombre de tours, des conditions plus strictes telles que la réduction de la durée d'incubation et la variation de la force ionique du tampon peuvent être imposées durant la sélection. Une

évaluation de l'affinité de liaison à la cible peut être effectuée après chaque tour. Un marquage radioactif ou fluorescent permet de quantifier les aptamères retenus. Différentes techniques peuvent être utilisées: FACS, HPLC ou électrophorèse capillaire (Latulippe et al 2013, Tan et al 2011). Quand aucune amélioration de l'affinité des séquences d'oligonucléotides liées n'est observée pendant deux ou trois cycles consécutifs, le processus de sélection est interrompu car des tours supplémentaires deviennent inutiles. Enfin, les séquences sont identifiées par séquençage. Les étapes précédemment décrites sont illustrées dans la figure 5.

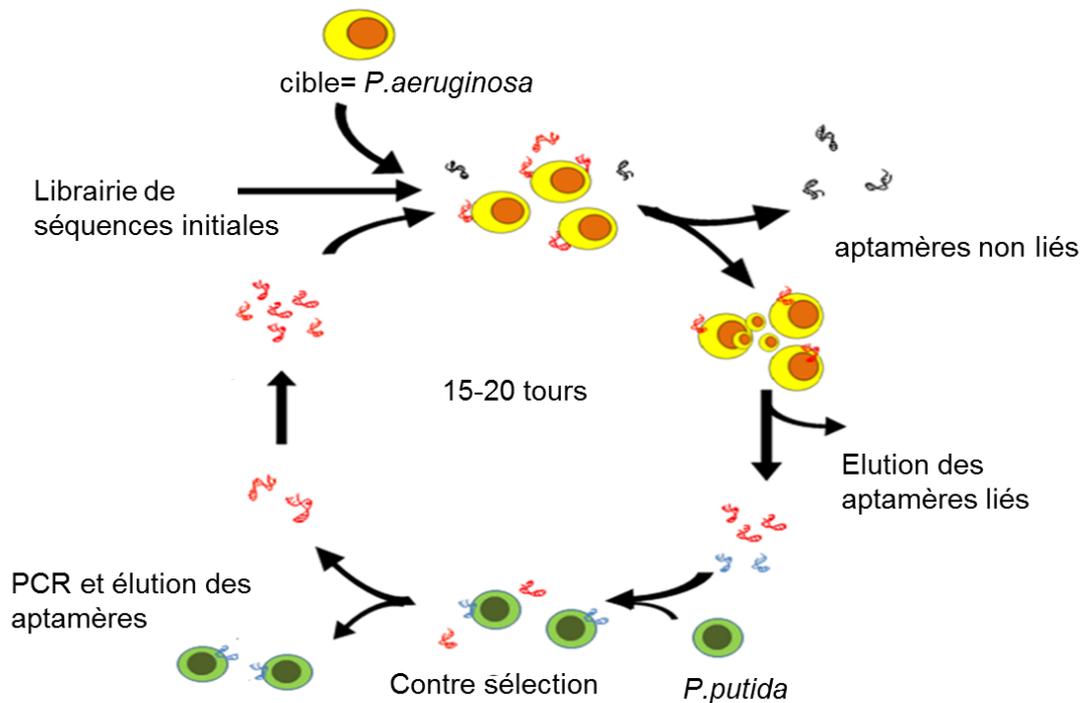


Figure 5: Evolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX)
Exemple de cible : *Pseudomonas aeruginosa*, Figure adaptée de (Chang et al 2013).

3.3. Aptamères: Un large spectre d'applications

3.3.1 Capteurs et senseurs

Le développement de senseurs repose sur la détection du signal émis suite au réarrangement structural et conformationnel qui accompagne le passage d'aptamères de l'état libre à l'état lié. Le signal le plus fréquemment utilisé est la fluorescence pour les aptamères dont l'association au ligand provoque un réarrangement structural. Généralement, l'aptamère est lié à un fluorophore et un inhibiteur de la fluorescence. L'éloignement des deux molécules permet l'émission de la fluorescence qui est bloquée par leur rapprochement. L'intensité de fluorescence est ainsi capable d'indiquer la variation de distance entre ces deux molécules et par conséquent l'association du ligand à l'aptamère. Les aptamères peuvent être également immobilisés sur une surface et leur association/dissociation est détectée par la mesure de résonance plasmonique (Dwivedi et al 2013, Mairal et al 2008).

On reconnaît actuellement plusieurs aptamères obtenus par SELEX contre des cibles pathogènes (bactéries, virus..) comme *Staphylococcus aureus* (Chang et al 2013), *Salmonella typhimurium* (Duan et al 2013), *Listeria monocytogenes* (Suh et al 2014). Ces aptamères, intégrés dans des biosenseurs, trouvent des applications diverses pour la détection et l'identification d'agents anti-infectieux dans les milieux de travail agroalimentaires et pharmaceutiques et les milieux naturels (mer, rivière, sol..). D'autres aptamères ont été générés pour détecter des toxines, des antibiotiques, des allergènes, ou des métaux lourds par exemple (Hong & Sooter 2015).

3.3.2. Imagerie/Diagnostic

Sélectionnés contre des marqueurs (protéines, récepteurs cellulaires...) de maladies, les aptamères peuvent être des outils de détection diagnostique. Conjugués aux fluorophores, ils peuvent servir comme des sondes en imagerie médicale. Différents aptamères pour la détection des cellules tumorales sont connus (Tombelli et al 2007)

3.3.3. Applications thérapeutiques

Les aptamères dédiés aux applications cliniques peuvent être répartis en deux grandes familles: les aptamères antagonistes et les aptamères vecteurs d'administration ciblée de molécules thérapeutiques.

Les aptamères antagonistes sont développés pour empêcher la fonction de leur cible en s'y attachant. Ils peuvent être dirigés contre des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans l'oncogenèse, des agents anti ou pro-apoptotiques, des facteurs d'angiogenèse et des enzymes de voies métaboliques (Rhodes et al 2001, Rusconi et al 2002). Leur rôle est de rétablir les voies de signalisation normales dans la programmation cellulaire.

D'autre part, il est possible d'utiliser des aptamères pour amener d'autres molécules thérapeutiques vers une cible précise. En se basant sur leur capacité d'identifier et attacher une cible particulière avec une grande affinité, les aptamères sont exploités pour faciliter la livraison intracellulaire et augmenter la concentration locale des molécules thérapeutiques effectrices aux tissus cibles. Dans la thérapie génique ou dite antisens, les aptamères ont été conjugués aux oligonucléotides antisens, siRNA ou miRNA pour les acheminer spécifiquement aux gènes sujets d'inhibition de l'expression. La stratégie est ainsi reconnue sous le nom de 'gene silencing'. Globalement deux mécanismes sont employés:

- Celui des siRNA, ou petits ARN interférents, capables de se lier spécifiquement à une séquence d'ARNm et de la cliver pour empêcher l'expression de gènes correspondants (figure 6.a).
- Celui de régulation d'expression génique par des oligonucléotides antisens. En effet, l'aptamère conjugué, en présence de son ligand, libère l'antisens. L'association de ce dernier à la séquence complémentaire (qui est le gène cible) entraîne l'inhibition de son expression. En absence du ligand il n'y a pas de changement conformationnel et l'aptamère garde la séquence antisens appariée, donc inactive (Bayer & Smolke 2005).

Couplés aux molécules thérapeutiques ou fonctionnalisés sur les surfaces des nanoparticules (figure 6.b), les aptamères jouent le rôle de véhicules d'administration ciblée qui améliorent la biodisponibilité de la molécule active et réduit ses effets secondaires et ses doses d'injection. Cette stratégie tire profit du confinement des principes actifs dans les nanoparticules. L'ensemble constitue un système de livraison efficace par distribution limitée du médicament au tissu, à la cellule et aux gènes cibles. Cette alternative de couplage paraît prometteuse dans la thérapie de cancers. Elle valorise les molécules de la chimiothérapie telles que la cisplatine. Les aptamères ont été également utilisés pour

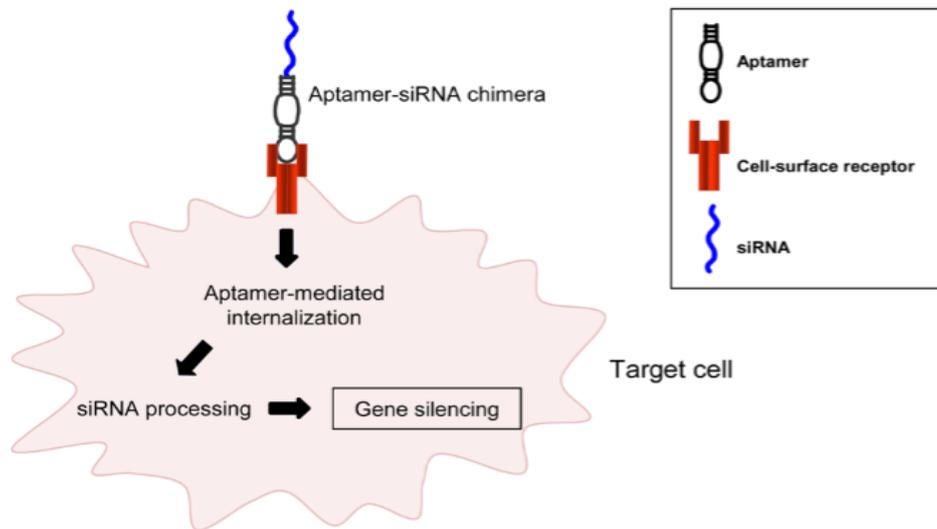
administrer des toxines aux cellules cancéreuses (Zhang et al 2011). Une liste non exhaustive d'aptamères ayant menés à des applications est présentée dans le tableau 3.

Le pegaptanib, commercialisé sous le nom de macugen, constitue un exemple concret du potentiel thérapeutique des aptamères. Il s'agit d'une injection anti-angiogénique découverte par NeXstar Pharmaceuticals et approuvée en 2004 par la FDA (Food and Drug Administration). Le pegaptanib est un aptamère antagoniste qui lie la protéine VEGF (Vascular endothelial Growth factor) afin d'empêcher sa fonction angiogénique (perméabilité des vaisseaux sanguins oculaires) (Pozarowska & Pozarowski 2016).

Tableau 3: Exemples d'applications d'aptamères

Applications	Exemples
Capteurs/Senseurs	<ul style="list-style-type: none"> ● Senseur pour la détection de cocaïne (Stojanovic et al 2001). ● Biosenseur électrochimique d'<i>E. coli</i> (Luo et al 2012). ● Senseur- Fibre optique pour <i>Listeria</i>. Spp (Ohk et al 2010). ● Senseurs électrochimique de tétracycline (Berens et al 2001).
Imagerie/Diagnostic	<ul style="list-style-type: none"> ● L'aptamère C GBI-10 contre la tenascin-C, une protéine extracellulaire des cellules tumorales (Daniels et al 2003).
Applications thérapeutiques	<ul style="list-style-type: none"> ● Antagonistes / thérapie génique <ul style="list-style-type: none"> - Macugen or Pegaptanib, aptamère anti-VEGF(vascular endothelial growth factor, impliqué en angiogenèse) (Uchegbu 2013). - Aptamère ARN anti-CDE9, inhibiteur de mort cellulaire (Yang et al 2006). - REG-1 anti-XIA (facteur de coagulation) (Vavalle et al 2012) . ● Vecteurs d'administration ciblée <ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticules fonctionnalisés par l'aptamère PSMA pour délivrer la cisplatine (Dhar et al 2008). - L'aptamère sgc8c-Doxorubicin pour le traitement de leucémie (Huang et al 2009). - L'aptamère A10-anti-EEF2-siRNA pour inhiber l'expression de eEF2 (protéine de tumorigenèse gastrique) (Wullner et al 2008).

a)



b)

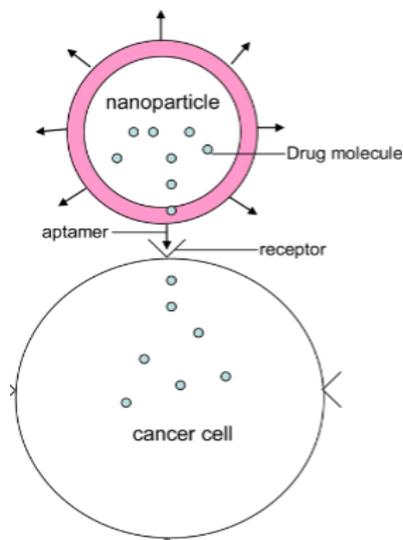


Figure 6: Exemples d'utilisation d'oligonucléotides comme vecteurs d'administration ciblée
a) pour des siRNA en thérapie génique. Figure tirée de (Cerchia et al 2011). b) Pour des principes actifs encapsulés dans des nanoparticules en cancérothérapie.

Figure tirée de (Guo et al 2008).

Les applications thérapeutiques des aptamères restent limitées par leur faible stabilité dans les liquides biologiques et en particulier dans le sang en raison de leur digestion rapide par des nucléases. Vu leur petite taille, les aptamères se trouvent rapidement éliminés par la filtration rénale. Par conséquent, différentes modifications chimiques ont été introduites, avant et après sélection, pour inhiber le clivage enzymatique et augmenter la stabilité des aptamères (Lakhin et al 2013). Parmi ces stratégies:

- Bloquer la position 2' du ribose susceptible à l'attaque par les nucléases. Il s'agit d'effectuer la SELEX avec une librairie d'oligonucléotides initialement modifiés en cette position (Keefe & Cload 2008).

Exemple: Macugen, le premier aptamère approuvé pour application clinique et qui cible le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et qui a été sélectionné à partir d'une banque d'ARN 2'-fluoropyrimidines (Singerman et al 2008).

- Commencer une SELEX classique avec une librairie d'aptamères D et synthétiser les énantiomères L, résistants aux nucléases, des séquences résultant de la SELEX. On parle des molécules Spiegelmers (Eulberg & Klussmann 2003) dont certaines sont en phase clinique.

Exemples: NOX-H94, NOX-A12 and NOX-E36 impliqués dans des traitements antidiabétiques et anticancéreux.

- Conjuguer les aptamères pour ralentir leur exclusion de la circulation sanguine avec des molécules comme les PolyÉthylène-Glycol (PEG) ou des cholestérols (Tan et al 2011).

D'autres problèmes tels que la réactivité croisée (interaction avec des molécules structurellement similaires à la cible) ont été résolus à l'étape de SELEX par l'introduction de la contre sélection.

Les modifications chimiques post SELEX sont nécessaires afin d'adapter les aptamères aux différentes applications. Certaines peuvent être à des positions sensibles aux changements conformationnels. Ils peuvent donc résulter en une altération des caractéristiques de liaison des aptamères et des propriétés d'interaction avec la cible. D'autres réduisent les rendements de synthèse et de purification. Les fonctionnalisations en 5' et 3' apportent généralement moins d'effets néfastes aux aptamères.

A notre connaissance, notre projet est le premier qui vise à utiliser les aptamères comme des vecteurs d'administration ciblée d'agents antimicrobiens. Cependant, la conjugaison des oligonucléotides aux peptides antimicrobiens, nos agents antibiotiques de choix, semble populaire depuis les années 1970: on parle de la chimie POC (Peptide-Oligonucleotide Conjugate).

4. Conjugués peptide-oligonucléotide (POC)

4.1. Méthodologie de synthèse

Globalement, on distingue deux grandes stratégies:

4.1.1. Synthèse en phase solide dite In line

Elle est réalisée sur un synthétiseur où le peptide qui constitue le premier fragment est immobilisé sur une résine de manière covalente. Ensuite le groupement amine de l'extrémité N-terminale du peptide est converti en groupement hydroxyle qui sert de linker entre le peptide et l'oligonucléotide. A cette étape, la synthèse d'oligonucléotide est initiée (Tung & Stein 2000). Sachant que la synthèse des peptides se déroule de l'extrémité C-terminal à la N-terminal, cette méthode limite la conjugaison de l'oligonucléotide à l'extrémité amine libre. L'incompatibilité des méthodes de déprotection (acide trifluoroacétique et ammonium acétate) des deux chimies Fmoc ou Boc et phosphoramidite constitue également un facteur limitant de cette stratégie de synthèse.

4.1.2. Synthèse dite fragmentée

Elle peut être réalisée en milieu solide ou liquide. Le peptide et l'oligonucléotide sont synthétisés, déprotégés et purifiés séparément. Les deux entités peuvent se lier réversiblement par des ponts disulfures ou irréversiblement par les liens amides, thioéther et via la réaction thiol-ène (Peyrottes et al 1998).

La réaction thiol-ène est populaire pour la préparation des POC. Elle nécessite la fonctionnalisation de l'une des deux entités par un groupement maléimide et l'autre par une cystéine. Les positions de fonctionnalisation (N ou C terminal, 5' ou 3' ou internes) sont choisies en fonction de l'application finale.

Dépendamment des propriétés physico-chimiques du peptide et de l'oligonucléotide, la réaction en solution pose deux problèmes majeurs.

- La solubilité: Il s'agit de choisir le solvant (aqueux ou organique) qui permet de solubiliser les deux fragments (Tung & Stein 2000).
- La précipitation: Dans le cas des peptides cationiques, les charges positives interagissent avec les charges négatives de l'oligonucléotide pour causer la précipitation. Il s'agit alors de moduler la concentration en sels dans le tampon de réaction (Wei et al 1994).

4.2. Réaction thiol-ène

C'est une réaction organique entre un thiol et un alcène pour former un sulfure d'alkyle. Elle appartient à la famille de chimie click. Elle est fréquemment utilisée en chimie des conjugués peptide-oligonucléotide. Le choix de cette réaction dans notre étude est expliquée par ses avantages et ses applications biologiques diverses. Il s'agit d'une réaction qui :

- Est stéréosélective.
- Est compatible avec l'eau et l'oxygène.
- N'a pas besoin de catalyseurs.
- Fournit un rendement élevé.
- Donne moins de produits secondaires.
- Offre une flexibilité des sites de liaison (Hoyle & Bowman 2010).

La réaction entre le groupement sulfhydryle d'une cystéine et un maléimide est reconnue pour son utilisation pour la fonctionnalisation des nanoparticules par des polymères synthétiques et des groupements biologiques, y compris les oligonucléotides. Elle est également employée pour la cyclisation des oligonucléotides et peptides, le développement de biohybrides et les systèmes d'acheminement de principes actifs (Paris et al 2015).

4.3. Applications

Habituellement les POC sont rapportés pour l'administration des oligonucléotides par la famille des 'cell penetrating peptide' dite CPP. Ces peptides peuvent être d'origine naturelle, synthétique ou chimérique (Lindgren et al 2000). Du point de vue structural, ils sont reconnus par leur richesse en arginine et lysine et, comme les cPAM, sont donc positivement chargés.

Les CPP, en plus de leur utilisation en tant qu'agents antimicrobiens, ont la propriété de transloquer à travers la membrane sans la perméabiliser pour se trouver aisément dans le cytoplasme des cellules vivantes (Splith & Neundorf 2011). Depuis leur découverte, un grand nombre de CPP a été identifié et ont rapidement trouvé des applications variables dans les domaines de diagnostic et chimiothérapie du cancer. Toutefois, leur principale application demeure la thérapie génique où ils sont conjugués à des oligonucléotides (Said Hassane et al 2010). D'autres peptides signal ou des peptides de fusion d'origine virale (comme celui du virus d'influenza et la protéine du virus d'herpès) peuvent également être employés (Antisense Drug Technology: Principles: Strategies 2001)

Contrairement à notre étude, les peptides CPP sont utilisés comme vecteurs d'administration ciblée pour améliorer la pénétration cellulaire des oligonucléotides et les doter d'une résistance à la nucléase (Juby et al 1991). Il a été également rapporté que la liaison d'oligonucléotides aux peptides riches en lysine permet d'améliorer d'autres propriétés telles que l'hybridation à l'ADN double brin (Smulevitch et al 1996).

Dans plusieurs applications, la portion oligonucléotidique des POC peut lier des ARNm ou des gènes pour exercer un effet antisens. Il s'agit d'inhiber l'expression d'un gène. C'est le cas par exemple du conjugué peptide-oligonucléotide anti-TAT (anti-Trans-Activator of Transcription) impliqué dans la thérapie anti-HIV 1. Le rôle de l'oligonucléotide anti-TAT est d'empêcher l'expression de la protéine TAT importante pour la transcription du virus HIV-1. Le peptide améliore 5-10 fois l'efficacité de l'effecteur antisens (Bongartz et al 1994).

Problématique

Notre objectif est de créer une classe d'agents antimicrobiens hybrides administrés spécifiquement contre un agent pathogène cible. Notre plateforme d'administration ciblée (figure 7) comporte nécessairement un vecteur d'administration ciblée et un agent antimicrobien effecteur. Pour mettre en place une première preuve de concept on a choisi les peptides antimicrobiens, toujours sujets aux améliorations avec un large choix et une facilité de synthèse dans la littérature, comme molécule active. La réaction de thiol-ène est la réaction de conjugaison de choix. La bactérie cible modèle est la multirésistante *Pseudomonas aeruginosa*. Cette nouvelle famille aura plusieurs avantages:

- Une longue durée de vie (moins de résistance développée au cours du temps)
- Moins d'effets secondaires.
- Doses réduites et moins fréquentes (concentration locale plus élevée).
- Traitement moins coûteux.
- Faible cytotoxicité (distribution locale).

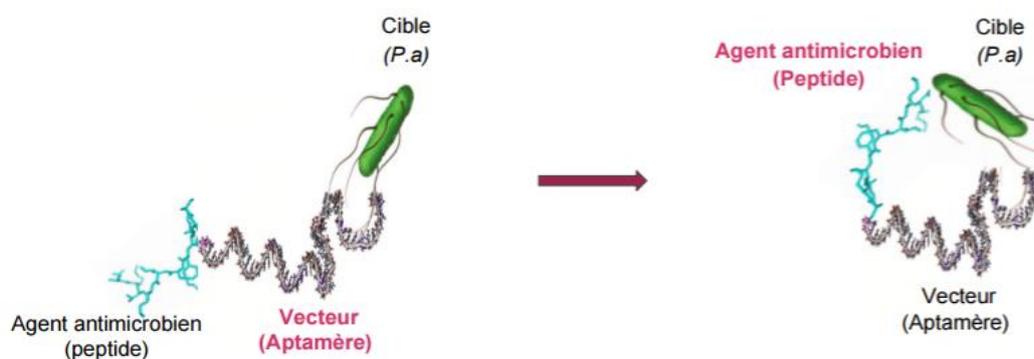


Figure 7: Schéma illustrant le principe du projet proposé, (Structures 3D du pep1037 et schématique approximative de l'aptamère F23, PyMOL)

Hypothèses et objectifs

Dans le cadre de cette étude, on se propose de vérifier les hypothèses suivantes:

- 1- Le groupement maléimide n'affecte pas la liaison de l'aptamère à la bactérie.
- 2- L'activité antimicrobienne est maintenue après la modification du peptide.
- 3- L'activité antimicrobienne est maintenue après la liaison à l'aptamère.
- 4- L'aptamère lie la bactérie après sa conjugaison au peptide.
- 5- L'aptamère améliore la capacité du peptide à atteindre leur cible.

Afin de vérifier ces hypothèses de recherche, un plan de 4 objectifs a été mis en place.

1. Valider les aptamères F23 et maléimide- F23.

- 1.1. Valider la spécificité et l'affinité de l'aptamère F23.
- 1.2. Etudier l'effet de la modification maléimide sur l'affinité de l'aptamère.

2. Caractériser l'agent antimicrobien.

- 2.1. Choisir et synthétiser le peptide antimicrobien et sa version modifiée par la cystéine.
- 2.2. Caractériser les effets antimicrobiens et antibiofilm du peptide, du peptide-cystéine et du dimère.

3. Préparer le POC.

- 3.1. Effectuer la conjugaison F23-PAM.
- 3.2. Purifier le produit de conjugaison.
- 3.3. Valider la conjugaison.

4. Caractériser le POC.

- 4.1. Etudier l'affinité du POC à la bactérie cible.
- 4.2. Tester l'effet antimicrobien du POC.

CHAPITRE 1 : LA MODIFICATION DE PEPTIDE RÉSULTE EN LA FORMATION D'UN DIMÈRE AVEC UNE ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE AMÉLIORÉE DE 60 FOIS

Peptide modification results in the formation of a dimer with a 60-fold enhanced antimicrobial activity

Amal Thamri, Myriam Létourneau, David Chatenet, Eric Déziel, Annie Castonguay* and Jonathan Perreault*

INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada

Correspondances:* jonathan.perreault@iaf.inrs.ca, annie.castonguay@iaf.inrs.ca

Contribution des auteurs

Amal Thamri a réalisé toutes les expériences scientifiques et a rédigé le manuscrit. Myriam Létourneau et David Chatenet ont participé à l'élaboration du protocole de synthèse peptidique.

Annie Castonguay est la co-directrice du projet de recherche et a révisé et corrigé le manuscrit.

Eric Déziel a fourni les souches bactériennes nécessaires pour ce travail.

Jonathan Perreault est le directeur scientifique et le coordonnateur du projet de recherche.

Article soumis le 02-11-2016

Résumé

Les peptides antimicrobiens cationiques (CAMP) représentent une classe prometteuse alternative d'agents antimicrobiens contre des bactéries multi-résistantes. Ici, nous rapportons une stratégie qui peut conduire à la découverte de nouveaux petits peptides antimicrobiens cationiques avec une activité antimicrobienne grandement améliorée et un potentiel retenu pour l'inhibition de la formation de biofilm. Nous avons orienté nos efforts vers i) la fonctionnalisation de la cystéine N-terminale d'un peptide cationique synthétisé précédemment (notamment le peptide 1037, KRFRIRVRV-NH₂), ii) sa dimérisation par un pont disulfure, et iii) une évaluation préliminaire de l'activité antimicrobienne du dimère nouvellement préparé contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*, pathogènes responsables de la formation de biofilms dans les poumons des individus atteints de fibrose kystique. Ce dimère présente un grand intérêt car il présente non seulement des propriétés d'inhibition de la croissance bactérienne nettement améliorées par rapport à son précurseur pep1037 (jusqu'à 60 fois), mais il empêche également de manière importante la formation de biofilm aux concentrations inférieures à la CMI. Nos résultats suggèrent que le dimère rapporté est prometteur pour son utilisation dans des traitements futurs comme adjuvant, en combinaison avec des antibiotiques cliniquement pertinents.

Mots clés: peptide antimicrobien cationique, modification cystéine N-terminale, modification peptide maleimide, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, antimicrobiens, antibiotiques, fibrose kystique.

Abstract

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) occur naturally in numerous organisms and are considered as a class of antibiotics with promising potential against multi-resistant bacteria. Herein, we report a strategy that can lead to the discovery of novel small cationic antimicrobial peptides with greatly enhanced antimicrobial activity and retained potential for biofilm formation inhibition. We geared our efforts towards i) the N-terminal cysteine functionalization of a previously reported small synthetic cationic peptide (notably peptide 1037, KRFRIRVRV-NH₂), ii) its dimerization through a disulfide bond, and iii) a preliminary antimicrobial activity assessment of the newly prepared dimer against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*, pathogens responsible for the formation of biofilms in lungs of individuals with cystic fibrosis. This dimer is of high interest as it does not only show greatly enhanced bacterial growth inhibition properties compared to its pep1037 precursor (up to 60 times), but also importantly, efficiently prevents biofilm formation at sub-MICs. Our results suggest that the reported dimer holds promise for its use in future adjunctive therapy, in combination with clinically-relevant antibiotic.

Keywords: cationic antimicrobial peptide, N-terminal cysteine modification, maleimide peptide modification, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, antimicrobials, antibiotics, Cystic fibrosis

Introduction

Antibiotic resistance is a serious and growing phenomenon, as well as a primary public health concern (Marston et al 2016, Payne & Tomasz 2004). Unfortunately, antibiotics are no longer the magic bullets that they once were. New resistance mechanisms have emerged, making generations of antibiotics virtually ineffective, resulting in prolonged illness, greater risk of death and higher costs. Thus, development of new antibiotics and other novel strategies are critically needed. Biofilm-associated bacteria possess 10–1,000 fold greater resistance to antibiotic treatment compared to freely-floating, planktonic cells, making established biofilm infections especially difficult to eradicate (Davies 2003, Schwartz et al 2003). The biofilm mode of growth is a strategy used by microorganisms to survive detrimental environmental conditions. An estimated 80% of all bacterial infections involve a biofilm component (Romling & Balsalobre 2012). For instance, the severe antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* in lungs of Cystic Fibrosis (CF) patients has been associated with the formation of drug resistant biofilms (Moreau-Marquis et al 2008, Tomlin et al 2001). Bacteria benefit from the accumulation of thick and sticky mucus to colonize the lung tissue and airways in a multi-resistant biofilm, which results in respiratory failure and mortality (Tomlin et al 2001). To date, no antimicrobial that targets bacterial biofilm(s) has been clinically approved. Thus, there is a great interest in the development of antimicrobials that inhibit bacterial growth, and also prevent biofilm formation and/or promote established biofilms dissolution.

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) are a class of antibiotics with promising potential against multi-resistant bacteria. Currently, over 500 CAMPs, typically consisting of 20-50 amino acids, with rapid bactericidal and broad spectrum activity, have been isolated from invertebrates, insects, microorganisms, plants, fish, amphibians, mammals and humans (Wang et al 2009). Attracted to the anionic phospholipid head, CAMPs establish strong nonspecific, hydrophobic and electrostatic interactions with the bacterial cytoplasmic membrane (Godballe et al 2011). Although their therapeutic potential seems to be restricted, as it is the case for many other types of antimicrobials, by the difficulty to find a proper balance between critical parameters such as hydrophobicity, charge, length, amphiphilicity and structure, CAMPs have the advantage to be small and easily tunable. Still, their use remains restricted by their intrinsic characteristics, notably toxicity to mammalian cells, limited tissue distribution and proteolytic degradation in the blood..Among successful examples, the synthetic protegrin analog IB-367 is part of an aerosol formulation used after chemotherapy (Mosca et al 2000). Although their mechanism of action is not completely established, it is recognized that CAMPs can interfere with different stages of bacterial

biofilm formation. Initially, CAMPs prevent cell adhesion to the surface *via* electrostatic bonds with the membrane (Overhage et al 2008). They are also capable of preventing biofilm maturation by acting on the molecular signals involved in quorum sensing (Horswill et al 2007). A library of small synthetic CAMPs able to inhibit biofilm formation and promote biofilm degradation can be found in the BaAMPs database (biofilm active antimicrobial peptides database) (Di Luca et al 2015).

The discovery of naturally occurring dimeric peptide with marked antimicrobial activity encouraged scientists to explore the ability of various dimerization, including disulfide bridging and lactamization, to confer to CAMPs many properties that may enhance their therapeutic potential as compared to their monomers (Yomogida et al 1996). Recently, the formation of multivalent CAMPs was reported to improve peptide resistance against proteolytic degradation and to display lower eukaryotic cytotoxicity (Liu et al 2010). Some studies reported the impact of peptide dimerization *via* a disulfide bridge on antimicrobial activity. For instance, the Defr1 dimeric defensin peptide containing a natural cysteine residue has an activity against *P. aeruginosa* PAO1 (6 µg/mL) approximately 9-fold greater than its 34-residue monomer counterpart (50 µg/mL) (Morrison et al 2002). Also, VG16KRKP dimer displayed a ten-fold decrease of its MIC against *E. coli* and more than a 4-fold decrease against *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (Datta et al 2016). The improved antibacterial activity was correlated with an increase in hydrophobicity and cationicity of its surface area, which enhances LPS binding and neutralization (Liu et al 2010). However, peptide dimerization does not always lead to an enhancement in antimicrobial activity. For instance, one study reported a decrease in the antibacterial activity related to the N-terminal dimerization of the β -turn antimicrobial peptide PST13-RK (Datta et al 2016). Very few studies report the effect of cationic AMP dimerization through cysteine disulfide bridge formation, especially for N-terminus cysteine-containing peptides (Datta et al 2016). However, intermolecular cysteine-cysteine bridges were previously shown to allow peptides to have a greater ability to induce lysis of lipid bilayers than their monomer counterparts (Lee et al 2008, Morrison et al 2002).

Herein, we report the N-terminal functionalization of a small synthetic cationic peptide with a cysteine, its dimerization through a disulfide bond, and a preliminary antimicrobial activity assessment of the newly prepared dimer against two strains each of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. For this study, the synthetic 9-mer cationic peptide **pep1037** (KRFRI RVRV-NH₂) was selected (de la Fuente-Nunez et al 2012), due to its weak antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*, but considerable antibiofilm activity. We report that such a strategy leads to the

discovery of a small CAMP with greatly enhanced antimicrobial activity and retained potential for biofilm formation inhibition.

Materials and methods

Peptide synthesis/modification.

Pep1037 and **cys-pep1037** were synthesized manually using a standard solid phase peptide synthesis approach with Fmoc chemistry (Fig 8). Couplings of the protected amino acids were mediated by benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP; 3 equiv) and N,N'-diisopropylethylamine (DIPEA; 6 equiv) in N,N-dimethylformamide (DMF) at room temperature for 0.5-1 h. Coupling efficiency was monitored with the qualitative ninhydrin test and a 3-equivalent excess of the protected amino acids based on the original substitution of the Fmoc Rink-amide resin (0.62 mmol.g^{-1}). Fmoc removal was achieved with 20% piperidine in DMF at room temperature for 10 minutes. Peptides were cleaved from the resin support with simultaneous side chain deprotection by treatment with TFA containing 1,2-ethanedithiol (2.5%), water (5%), triisopropylsilane (1%), thioanisole (5%) and phenol (5%) for 4 h at room temperature. After cleavage, the resin was removed by filtration, the filtrate was concentrated and peptides were precipitated using cold diethylether. Crude peptides were then solubilized in water and lyophilized prior to their purification using preparative RP-HPLC. **Cys-pep1037 dimer** was isolated by reversed phase HPLC from a lyophilized sample of crude **cys-pep1037**. **Mal-cys-pep1037** was prepared and isolated using the following procedure: **cys-pep1037** was dissolved to a final concentration of 1mg/mL in fresh PBS (phosphate buffer saline, pH = 7), and an excess of TCEP (tris-carboxyethylphosphine) reagent (10 equiv) was added (to prevent the formation of disulfide bonds). The mixture was stirred at room temperature for 20 min, an excess of maleimide (2 equiv) was added, and the mixture was allowed to react for 4 h. Peptide **cys-mal-pep1037** was isolated from the mixture by reversed phase HPLC.

All crude lyophilized peptides were purified using a preparative reversed-phase HPLC (RP-HPLC) protocol using a linear gradient from eluent A to B with 25% B per 2 min increments (Eluent A = H₂O, 0.1% TFA, Eluent B = CH₃CN/40% A, 0.1% TFA) and a C18 (column Phenomenex, Jupiter®, 15µm, 10 x 300 mm, 4 mL/min, absorbance measured at 220nm). Homogeneity of purified fractions was assessed by RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry in linear mode using α-cyanohydroxycinnamic acid as matrix. Fractions containing the desired product were pooled and lyophilized. Overall, RP-HPLC analysis of each analog revealed that the purity of all peptides was ≥ 97%. For all peptides, the main

peak observed by mass spectrometry agreed with the theoretical mass values (**pep1037**: m/z ($[M+H]^+$) 1229.3; **cys-pep1037**: m/z ($[M+H]^+$) 1331.8; **mal-cys-pep1037**: m/z ($[M+H]^+$) 1429.7; **cys-pep1037 dimer**: m/z ($[M+H]^+$) 2662.5).

Bacterial strains and growth conditions.

P. aeruginosa ATCC 27853 (blood culture isolate, American Type Culture Collection, Manassas, USA), *P. aeruginosa* ATCC 15442 (animal room water bottle isolate), *B. cenocepacia* K56-2 (CF patient isolate) and *B. cenocepacia* J2315 (multidrug-resistant CF patient isolate) were used. Bacteria were subcultured on TSA (tryptic soy agar, BD Difco™ Dehydrated Culture Media, fisher scientific) plates from frozen stocks. Inocula was prepared in TSB (tryptic soy broth, BD Difco™ Dehydrated Culture Media, fisher scientific) in overnight cultures at 37°C with shaking at 200 rpm.

Minimum inhibitory concentration (MIC) determination.

The broth microdilution method of all peptides was evaluated with minor modifications for cationic peptides according to the recommendation of the Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9 (Franklin R. Cockerill et al 2012). Peptides were dissolved in water and stored in glass vials. Different peptide concentrations were prepared in 100 μ L of cationic adjusted (25 mg/L CaCl_2 and 12.5 mg/L MgCl_2) MHB (Mueller Hinton broth, BD Difco™ Dehydrated Culture Media, fisher scientific) and added to sterile 96-well polypropylene microtiter plates. Each well was inoculated to a final concentration of 5×10^4 CFU (50 μ L of MHB inocula suspension prepared from colonies grown on MHA) (Franklin R. Cockerill et al 2012). Plates were incubated at 37°C under static conditions for 18 h and 24 h for *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia*, respectively, and absorbance was read at 600 nm using a Cytation 3-cell imaging plate reader. The MIC was defined as the lowest concentration of peptide at which no growth was observed. All experiments were done at least in triplicate.

Biofilm inhibition assay.

The ability of **pep1037**, **cys-pep1037 dimer** and **mal-cys-pep1037** to prevent biofilm formation was evaluated by a method previously described (Dean et al 2011, O'Toole 2011) with the following modifications. *Pseudomonas aeruginosa* cells (1×10^5 CFU) were grown in 96-well polypropylene microtiter plates (BD falcon # 353912) in 200 μ L final volume of TSB at 37°C for 24 h in the presence or not (10 μ g/mL) of the peptides. Optical density of the cultures at 600 nm was determined at 24 h prior to biofilm staining as a measure of planktonic bacterial growth. TSB media was aspirated, the wells were washed three times

with 200 μ l PBS and air-dried. Biofilm production was measured using the crystal violet (CV, 1%) stain technique (O'Toole 2011). Briefly, excess CV was rinsed 3 times with water and plates were air-dried overnight. Stain was solubilized in 250 μ l of 30% glacial acetic acid and quantified by a plate reader at 570 nm. All experiments were done in six replicates.

Biofilm disintegration assay.

The pre-formed biofilm assay was performed as previously described (Durham-Colleran et al 2010). *P. aeruginosa* ATCC 27853 or ATCC 15442 (1×10^5 CFU) were incubated under static conditions in 200 μ l of TSB for 24 h at 37°C. TSB media was then aspirated and the established biofilm was treated with various concentrations of **pep1037**, **cys-pep1037 dimer** and mal-cys-pep1037 solutions prepared in fresh TSB. The microtiter plate was incubated for 24 h, at 37°C. Biofilm production was measured using the crystal violet stain technique as described above. All experiments were done in six replicates.

Results and discussion

To assess the impact of dimerization on bacterial growth and biofilm formation/inhibition a cysteine residue was introduced at its N-terminus (**cys-pep1037**). As reported for other cysteine containing peptides (Chandrasekhar et al 2016, Jordan et al 1994, Wu et al 2000, Yoshioka et al 1993), dimerization occurs spontaneously during the lyophilization/purification step following the synthesis of **cys-pep1037**. Both peptides, **cys-pep1037** and **cys-pep1037 dimer**, were isolated using RP-HPLC (Fig. 8).

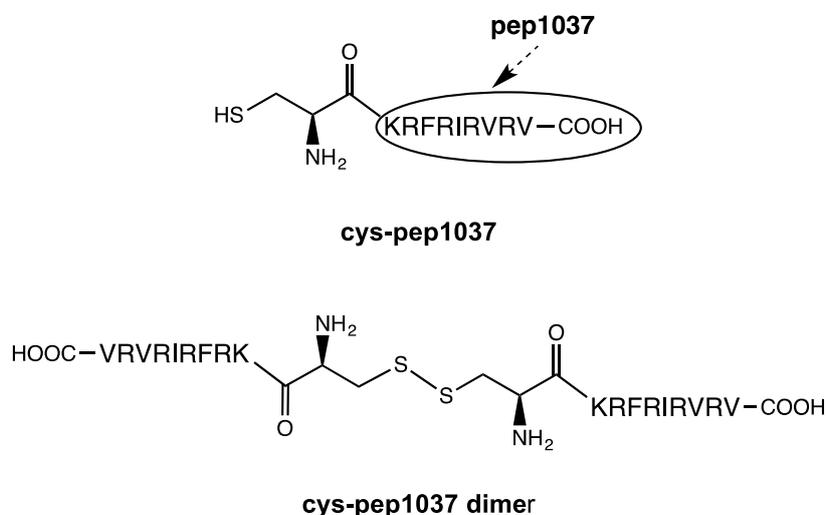


Figure 8: Structure of cys-pep1037 and its corresponding dimer.

Inhibition of bacterial growth

The ability of **cys-pep1037 dimer** to inhibit the growth of *P. aeruginosa* was evaluated by determining its minimum inhibitory concentration (MIC) against two different strains of *P. aeruginosa*, notably ATCC 27853 and ATCC 15442, and results were compared to the MIC of native **pep1037** against the same strains. MIC values determined for **pep1037** were in agreement with previously reported MIC values of the same peptide against two Gram-negative pathogens, *P. aeruginosa* PAO1 (and PA14) and *B. cenocepacia* 4813, from 304 to > 608 µg/mL, respectively (de la Fuente-Nunez et al 2012). Interestingly, **cys-pep1037 dimer** was found to display a 30 to 60 times lower MIC than **pep1037** against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and ATCC 15442, respectively (Table 1). The MIC of pure **cys-pep1037** could not be assessed due the presence of variable amounts of the corresponding dimer in the stock solutions used, but nevertheless, the MIC of this peptide mixture was found to be much lower than that of **pep1037**, about 8 folds compared to that of **pep1037** alone. This result strongly suggests that the antimicrobial activity of this peptide mixture is due to the presence of the dimer, even if one cannot rule out the possible additional contribution of the **cys-pep1037** monomer. It is important to note that the dimer to monomer ratio might increase during MIC determination experiments, as greater amounts of dimer were observed when solutions 40 µg/mL of **cys-pep1037** were incubated in culture medium for 1 h.

Tableau 4: Bacterial growth inhibitory effect of the peptides (MIC values expressed in mg/L).^a

Entry	Bacteria (strain)	pep1037	cys-pep1037 ^b	cys-pep1037 dimer	mal-cys-pep1037
1	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	307	40	10	357
2	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	307	40	5	357
3	<i>B. cenocepacia</i> (J2315)	> 614	332	332	> 614
4	<i>B. cenocepacia</i> (K56-2)	> 614	332	332	> 614

^aIdentical results were obtained for all replicates.

^bDifferent stock solutions of **cys-pep1037** (13 mg/mL) used for this experiment contained variable amounts of **cys-pep1037 dimer**.

To prevent **cys-pep1037** from undergoing dimerization, we inactivated the SH bond of its cysteine residue by performing a thiolene reaction between **cys-pep1037** and maleimide (Fig 9). **mal-cys-pep1037** displayed a lower antimicrobial activity against both strains of *P. aeruginosa* compared to its precursor, **cys-pep1037**, but an activity equivalent to **pep1037**. This again supports the previously mentioned hypothesis that the antimicrobial activity the **cys-pep1037** monomer/dimer mixture is due to the presence of **cys-pep1037 dimer**, while not completely ruling out the fact that an effect of the presence of an additional cysteine residue at the N-terminal position of **pep1037**. Indeed, bringing modifications at the N-terminal position of a peptide can have a drastic impact on its antimicrobial activity (Crusca et al 2011, Nagant et al 2012, Paulsen et al 2013).

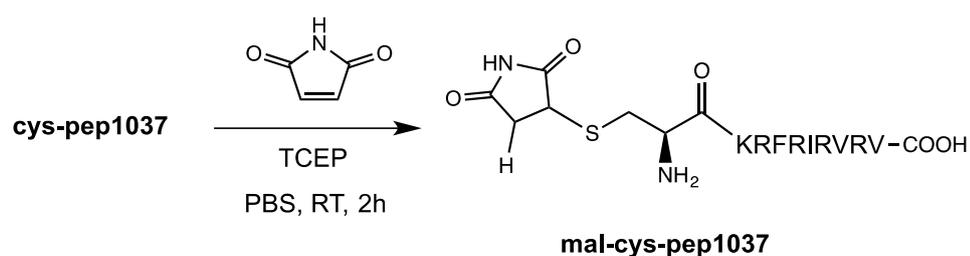


Figure 9: Formation of mal-cys-pep1037 via a thiolene reaction between cys-pep1037 and maleimide.

All peptides were also tested against two strains of *B. cenocepacia*, bacteria that also play a role in CF lung infection. The antibacterial potential for the two strains was found to be at least two times higher than the one of **pep1037** (332 $\mu\text{g/mL}$ compared to > 614 $\mu\text{g/mL}$), but in contrast to what was noted for both *P. aeruginosa* strains, **cys-pep1037 dimer** did not show an enhancement in antibacterial activity compared to the **cys-pep1037** monomer / dimer mixture (Table 4). Dimerization of **cys-pep1037** from the monomer / dimer mixture in cultures could explain these results. Deactivation of the SH bond of the cysteine residue with maleimide also led to a loss of this enhanced antibacterial effect (Table 4).

Biofilm inhibition and disintegration

To further explore the potential of **cys-pep1037 dimer**, we investigated whether the **pep1037** antibiofilm property could be retained. The inhibitory effect of **pep1037**, **cys-pep1037 dimer** and **mal-cys-pep1037** on the formation of *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* biofilms was assessed using the crystal violet assay (Fig 10). At 10 $\mu\text{g/mL}$, all peptides displayed a considerable effect against the four biofilms studied (Fig 10) after 24h. Our results are in agreement with the ones previously reported for **pep1037** (de la Fuente-Nunez et al 2012). It is important to note that formation of the *Burkholderia cenocepacia*

J2315 biofilm is considerably more sensitive, as only $\leq 47\%$ of the biofilm can form. For instance, **cys-pep1037 dimer** only allows the formation of 11% of the biofilm (Fig 10) at a concentration about 30 times lower than its MIC (Table 1, entry 3). Other CAMPs were also found to display a biofilm formation inhibitory effect at a concentration much lower than their MIC. For instance, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of LL37 (MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$) is sufficient to considerably inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa* strain PAO1 (Singh et al 2002). Very few CAMPs with a great potential to inhibit biofilm formation were reported to display significant antimicrobial activity against planktonic bacteria. For instance, 10 $\mu\text{g/mL}$ of peptide 1018 (MIC: 12 $\mu\text{g/mL}$) is sufficient to considerably inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa strain* (de la Fuente-Nunez et al 2014a). Modification of **pep1037 i)** with a maleimide-protected cysteine at the N-terminal position (**mal-cys-pep1037**), or **ii)** by dimerization of its cysteine N-terminal adduct (**cys-pep1037 dimer**) does not lead to a drastic difference in its ability to prevent biofilm formation but importantly, this property is retained.

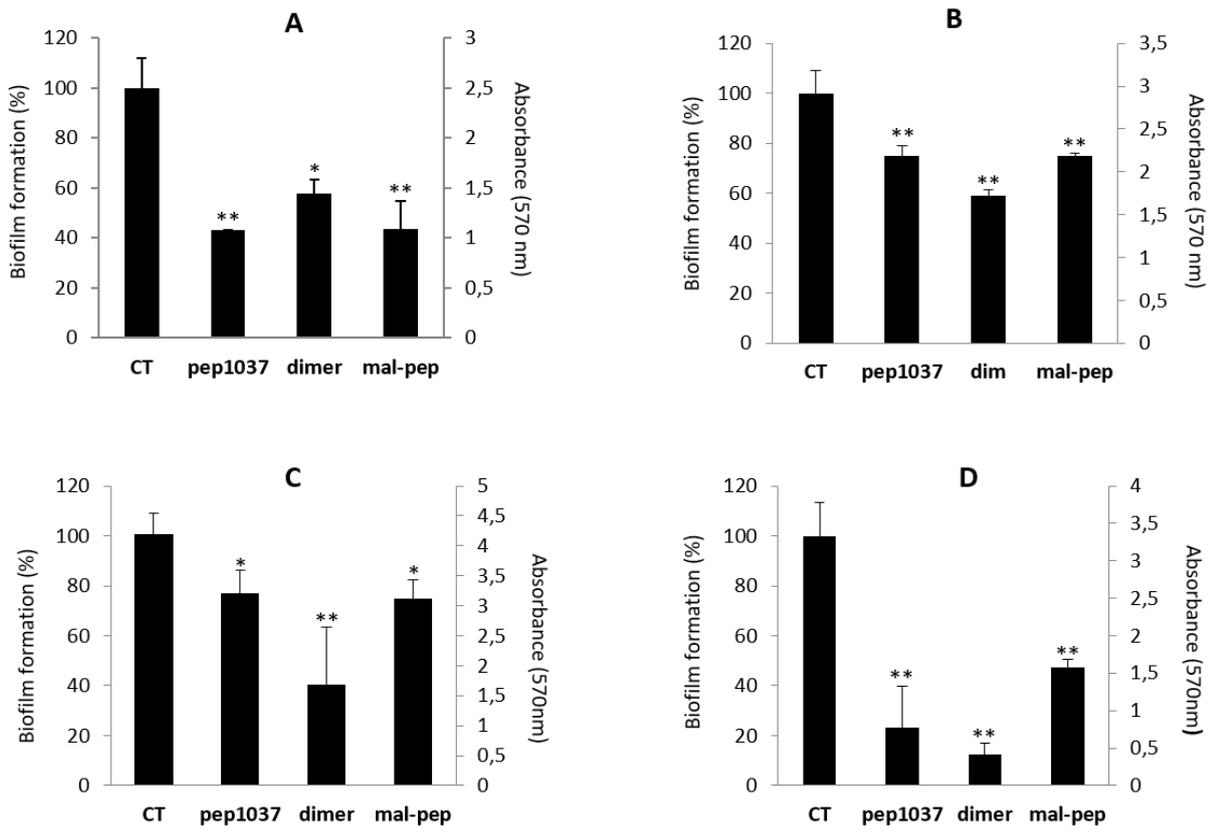


Figure 10. Inhibiting effect of 10 µg/mL of pep1037, cys-pep1037 (dimer) and mal-cys-pep1037 (mal-pep) on the formation of biofilms.

Pseudomonas aeruginosa (ATCC15442) (A), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) (B), *Burkholderia cenocepacia* K56.2 (C) and *Burkholderia cenocepacia* (J2315) (D). Error bars indicate the standard deviation of six replicates, and statistical significance was determined using one-way ANOVA (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ versus the control, denoted CT).

The biofilm disintegration potential of pep1037, cys-pep1037 dimer and mal-cys-pep1037 was also assessed on a *P. aeruginosa* (ATCC 27853) preformed biofilm. All three peptides have a considerable potential to disturb the established biofilm studied. A concentration of 10 µg/mL of pep1037 or mal-cys-pep1037 is sufficient to reduce by 56-60% the established monospecies biofilm (Fig 11), and there is no significant difference between the effect of both these peptides on biofilm degradation. Some CAMPs were previously reported to induce the dispersion of viable cells of mature biofilms (Reffuveille et al 2014). Interestingly, for all concentrations studied, the established biofilm is reduced to a lesser extent by cys-pep1037 dimer than when treated with pep1037 or mal-cys-pep1037 (Fig 11). The effect of cys-pep1037 dimer on mature biofilm might not only be affected by

its interaction with organisms in the *P. aeruginosa* biofilm but might also be strongly related to its ability to diffuse into the biofilm, as suggested for previously reported peptides (Gordon et al 1988). The ability of cationic antibiotics to diffuse into biofilms is negatively influenced by an increase in molecular weight (Gulot et al 2002), and electrostatic interactions of cationic peptides with negatively charged biofilm matrix can delay CAMPs penetration (Shigeta et al 1997). These factors might explain why **cys-pep1037 dimer** is less active than its monomeric precursor **pep1037** on the pre-formed biofilm tested. In spite of the difference of the peptides' intrinsic characteristics, antibiofilm effect seems retained, even if the MICs are greatly reduced for the dimer form of the peptide. Furthermore, the dimer inhibited biofilm formation as well, if not better, than pep1037.

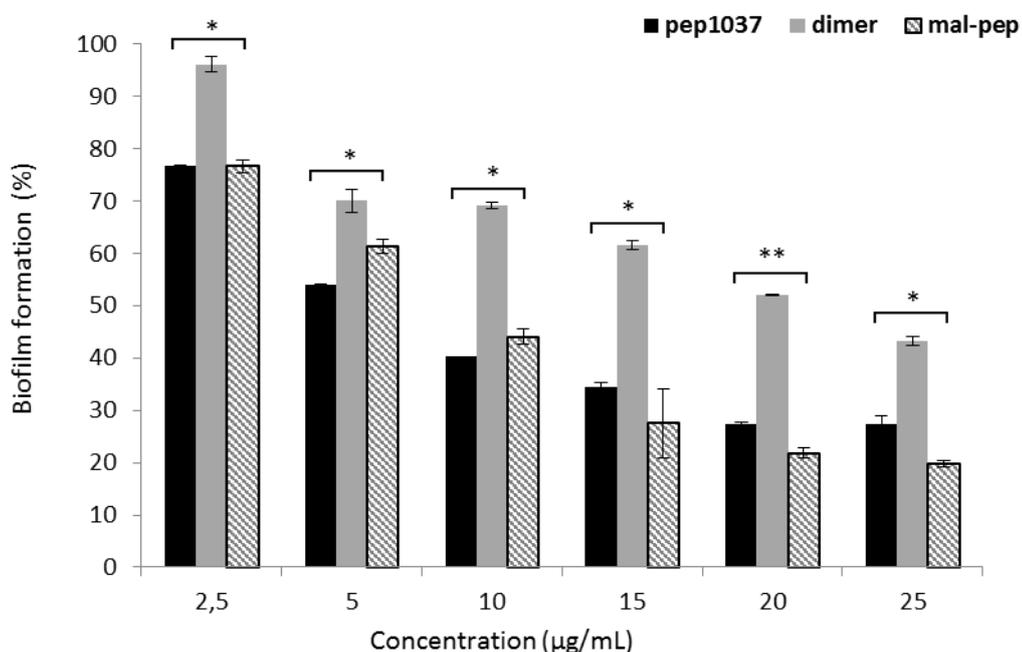


Figure 11. Effect of pep1037, cys-pep1037 dimer (dimer) and mal-cys-pep1037 (mal-pep) on the degradation of an established *Pseudomonas aeruginosa* biofilm (ATCC 27853) after 24 h.

Error bars indicate the standard deviation of six replicates, and statistical significance was determined using ANOVA (P < 0.05; *, P < 0.01; **, P < 0.001).

Conclusion

We report here the N-terminal functionalization of a small synthetic cationic peptide with a cysteine, leading to the spontaneous formation of a dimer with a 30 to 60-fold enhancement in antimicrobial activity compared to its precursor. This work demonstrates that this strategy can potentially lead to the discovery of relatively small CAMPs with a greatly enhanced antimicrobial activity through a simple approach. Importantly, this can be achieved without losing biofilm inhibition activity, while retaining considerable activity against mature biofilms at sub-MICs. *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* are important pathogens responsible for various opportunistic infections, including the morbidity and mortality in CF patients *via* the formation of biofilms in lungs. These results suggest that **cys-pep1037 dimer** holds promise for its use in adjunctive therapy, in combination with clinically-relevant antibiotics (Begolo et al 2014). This study also opens the door to the improvement of small CAMPs *via* cysteine disulfide dimerization at the N-terminus, which has so far been unexplored.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Fonds de Recherche du Québec en Santé and the Canada Foundation for Innovation (CFI) for financial support. ED acknowledges funding by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors are also grateful to the *Tunisia-INRS agreement* and the *Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS* for providing Amal Thamri with graduate scholarships. ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

CHAPITRE 2: MISE EN PLACE DE LA PLATEFORME D'ADMINISTRATION CIBLÉE HYBRIDE APTAMÈRE-PAM

Matériels et méthodes

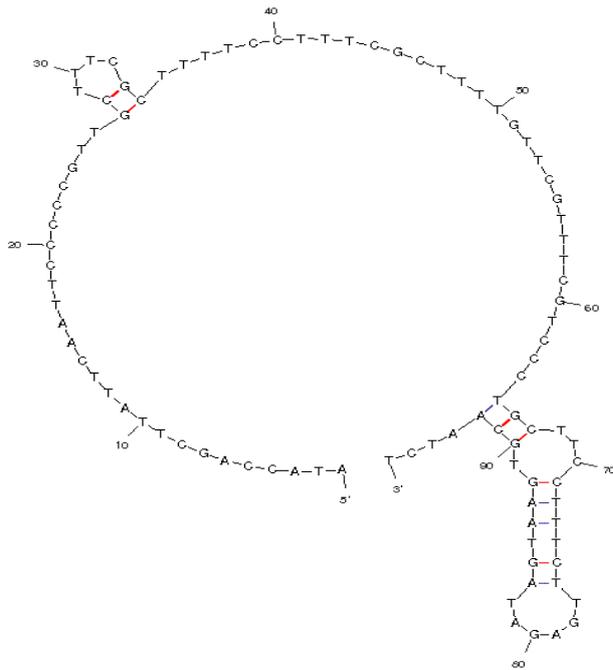
1. Matériels

F23 est un membre de la liste des aptamères résultant de SELEX contre *Pa* (Wang et al 2011). Il est de 96 nucléotides et de poids moléculaire 29203 g/mol. Sa séquence est la suivante:

5' ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCC CCG TTG CTT TCG CTT TTC CTT TCG CTT TTG
TTC GTT TCG TCC CTG CTT CCT TTC TTG AGA TAG TAA GTG CAA TCT 3'

Les aptamères F23 et polyA(10)-F23-(6 carbones)-FAM (figure 12) sont achetés de BioCorp Inc, Canada. L'aptamère 2,5-diméthylfuran-maléimide-F23-(6)-FAM (figure 13) est fourni par Trilink biotechnologies, USA. Le produit est sous forme lyophilisé de poids moléculaire 30070 g/mol. La souche bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est fournie par American Type Culture Collection, Manassas, USA. Les souches *E. coli* DH5 α , *Pseudomonas putida* KT2440 et *Pseudomonas fluorescens* 279 nous ont été procurées par le laboratoire du professeur Éric Déziel, IAF-INRS. Les milieux de culture LB, TSB, MHB et MHA sont de chez BD Difco™, Fisher scientific, USA.

a)



b)

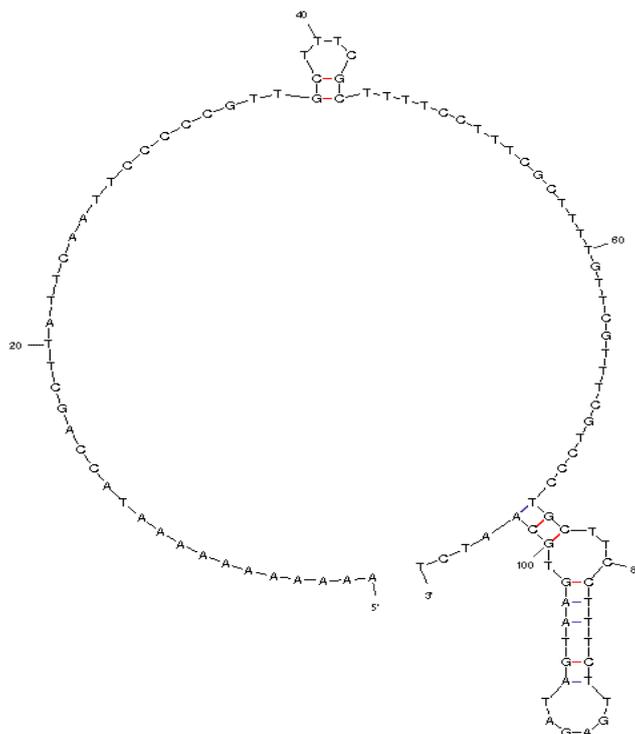


Figure 12 : Structures prédites de l'aptamère F23, a) de l'aptamère F23 et b) du poly (A)-F23 (figures prédites de mfold)

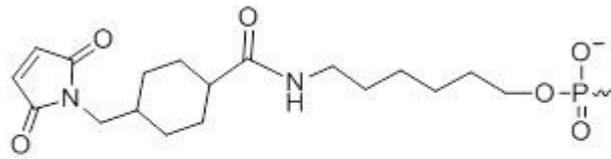


Figure 13: Modification de l'aptamère par le groupement maléimide.

Figure tirée de la fiche technique du produit mal-F23

2. Préparation des solutions stock

L'aptamère F23 est resuspendu dans l'H₂O DNase-RNase free (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled) pour en préparer une solution stock de 100µM. L'aptamère maléimide-F23-(6)-FAM est resuspendu dans l'H₂O DNase-RNase free pour préparer une solution stock de 2mM. Plusieurs aliquots de 2 nmoles sont préparés. Toutes les solutions stock et les aliquots sont gardés à -20°C après déshydratation par le lyophilisateur Flexi Dry™ MP. La quantification d'ADN simple brin fluorescent et de l'hybride ADN-peptide est réalisée par le nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, 1000.3.8.0) en mode ssDNA et lu en ng/µL.

3. Marquage radioactif

L'extrémité 5' de 10 pmol d'aptamère F23 est marquée à l'aide de la T4 polynucléotide kinase par 3 pmol d'adénosine 5' triphosphate $\gamma^{32}\text{P}$, pH 7,6 (Perkin Elmer, 300 ci/mmol, Boston MA). Un mélange de 16 µL contenant 2 µL (environ 10 pmol) d'ADN, 2 µL (environ 3 pmol) d'ATP, 2 µL d'enzyme T4 polynucléotide kinase (NEB, 10,000 units/ml), 1 µL du tampon de l'enzyme (T4 polynucléotide kinase buffer, 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7.6, 9 µL d'H₂O DNase-RNase free (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled)) est préparé. Il est ensuite incubé pendant une heure dans un bain à 37°C.

4. Purification par électrophorèse en gel

L'ADN F23 radioactif ou fluorescent est purifié sur gel de polyacrylamide pour le préparer aux tests d'affinité et spécificité. Un gel de polyacrylamide dénaturant 6% (acrylamide-bisacrylamide 19:1, urée 8M) est préparé avec du tampon TBE 10X (Tris-Borate EDTA, 0.9M tris, 0.9M borate, 10mM EDTA, pH8). La polymérisation du gel est immédiatement déclenchée après l'ajout des catalyseurs de réticulation APS 10% (persulfate d'ammonium) et le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine). Les puits sont chargés par le mix 1:1 ADN/ tampon de charge (bleu de bromophénol 0,02%, xylène cyanol 0,02%, glycérol 3%, tampon TBE). La migration est réalisée dans le tampon TBE 1X pendant 1 heure à 500 volts. Après migration, le gel radioactif est exposé pendant 5 minutes sur un écran phosphor (Molecular dynamics screen 35 * 43 cm). Les bandes correspondant à la taille recherchée des aptamères sont visualisées et localisées par le typhoon (FLA9500) par le mode phospho-imaging.

L'aptamère fluorescent est migré dans l'obscurité vue la sensibilité du groupement fluorescéine à la lumière. Le conjugué est purifié en plusieurs lots de 1 n mole. L'hétéro-conjugué est purifié sur gel de polyacrylamide 6% natif (acrylamide-bisacrylamide 19:1, eau, TBMg 1X (Tris Borate Magnesium, 0.9M tris, 0.9M borate, 50mM Mg (OAc)) pendant 8h à

350 volts dans le tampon de migration TBMg²⁺ 1M. Les puits sont chargés par un mix (1:1:1/1) ADN/ tampon de charge 2*/TBE-Mg²⁺. L'ADN fluorescent est également visualisé au typhoon par la méthode Cy2, $\lambda = 473\text{nm}$, filtre BPB1.

Dans tous les cas, l'ADN est ensuite élué du gel. Les bandes découpées sont incubées en rotation continue pendant la nuit dans le 400 μL tampon d'éluion (EDTA 0.1mM, 0.3 M NaCl, 0,005% SDS). Pour la précipitation d'ADN, 40 μL d'acétate de sodium (3M, pH6) sont ajoutés suivi de 880 μL d'éthanol absolu. La précipitation se déroule pendant une heure à -80 °C. Après centrifugation (Thermo Scientific, Sorvall legend 21R) à 13000 rpm à 4 °C pendant 20 min, le culot d'ADN est rincé par 200 μL d'éthanol 70%.

5. Purification par RP-HPLC

La vérification de la déprotection est effectuée par RP-HPLC analytique (Beckman Coulter, 32 karat software, Det: 168-254 nm) où 50 pmol d'ADN lyophilisé sont dilués dans un volume final de 100 μL d'ammonium acétate 0.1 M pH 7. La purification est effectuée sur colonne C18 (phenomenex, Jupiter® 5 μm C18 300 Å, LC Column 250 x 4.6 mm) par deux phases mobiles : A) 0.1 M ammonium acétate, pH 7 et B) acétonitrile et un débit de 1ml /min sur un cycle d'injection de 40 minutes (tableau 5).

La préparation de l'aptamère maléimide-F23 au test de conjugaison nécessite sa purification par RP-HPLC semi-analytique dans les conditions précédemment citées. La purification est réalisée en petits lots de 2 nmoles sur une colonne C18 (phenomenex, Jupiter® 10 μm C18 300 Å, LC Column 250 x 10 mm). Les fractions sont récupérées manuellement dans des tubes eppendorfs. Les fractions chargées en aptamère sont combinées en une fraction finale qui subit un passage sur colonne NAP 10 (GE Healthcare Life Sciences) initialement équilibrée avec l'eau milliQ. L'aptamère est ainsi repris dans 100 μL d'eau DNase-Rnase free puis lyophilisé pendant la nuit

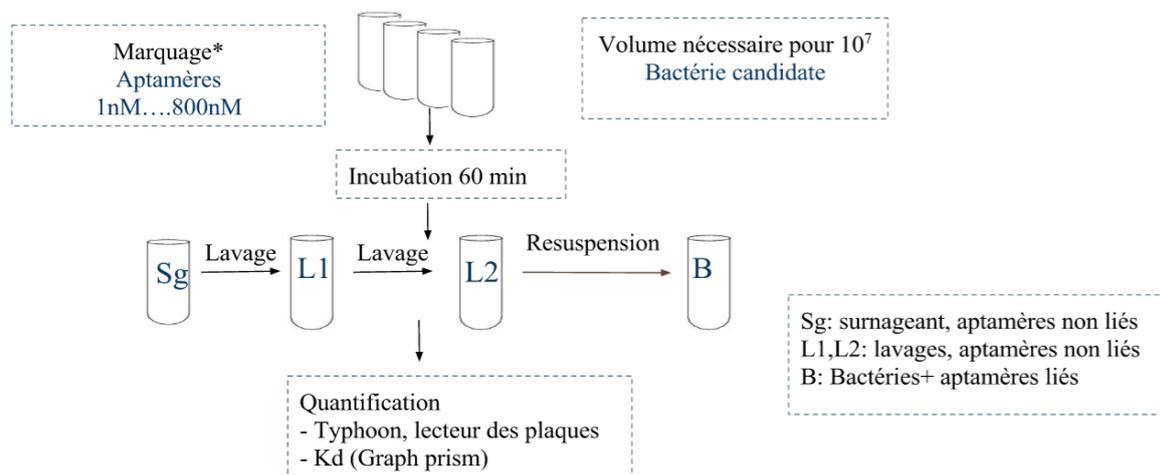
Tableau 5:Gradient de purification de l'aptamère F23-(6)-FAM

(Williams & Chaput 2010)

Temps (min)	Pourcentage de la phase mobile B
0	5
5	5
30	30
32	100
35	100
36	5
40	5

6. Tests d'affinité et de spécificité

Ce test a été effectué en adaptant les conditions d'hybridation des aptamères aux bactéries du protocole de SELEX décrit par Wang et collaborateurs. Les étapes des tests sont illustrées dans la figure 14.



* Marquage radioactif en 5' (^{32}P), marquage fluorescent (6-FAM)

Figure 14: Schéma explicatif du test d'affinité.

6.1. Préparation de la suspension bactérienne

Le test d'affinité de l'aptamère F23 est effectué pour *P.aeruginosa* ATCC 27853. Les bactéries *E. coli* DH5 α , *Pseudomonas putida* KT2440 et *Pseudomonas fluorescens* 279 nous ont servi pour le test de spécificité. La culture bactérienne d'*E. coli* DH5 α est préparée dans du LB. *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas fluorescens* 279 et *P.aeruginosa* ATCC 27853 sont cultivées dans du milieu TSB. À partir d'une culture bactérienne de 18 heures, une suspension bactérienne de DO (Bio Spectrophotometer, eppendorf) entre 0,05 et 0,13 (ce qui correspond au 0,5 mcfarland, soit environ 10^8 CFU/ml selon la vérification avec l'hémacymètre) est préparée. Les bactéries sont séparées du milieu par centrifugation à 6,000 rpm, 4°C pour 10 min (Thermo Scientific, Sorvall Legend micro 21 centrifuge). Le culot bactérien est lavé trois fois par une solution de NaCl 0.9% et resuspendu dans le tampon de liaison à 10^7 CFU/100 μL .

6.2. Préparation des solutions d'aptamères

Pour des raisons de l'étude, l'aptamère F23 et maléimide-F23 sont marqués respectivement par radioactivité et fluorescence ce qui implique quelques différences pour la préparation des concentrations et la lecture et analyse de résultats. Pour tester l'affinité de l'aptamère F23, une très faible concentration fixe d'aptamères marqués ^{32}P est combinée à une concentration variable d'aptamères froids. A partir d'une solution mère de 1.6 μM préparée dans le tampon de liaison, des concentrations d'aptamère maléimide-F23-(6)-FAM allant de 1600 nM à 3.125 nM sont obtenues par dilution en série de $\frac{1}{2}$. Le test d'affinité du conjugué est réalisé dans les mêmes conditions et en suivant les mêmes étapes que l'aptamère maléimide-F23-(6) FAM en tenant compte de la différence des poids

moléculaires des deux produits pour la préparation des solutions mères. Les aptamères ainsi préparés sont dénaturés par incubation pendant 5 min à 95 °C suivi de 10 min dans la glace et 20 min à température ambiante.

6.3. Incubation et lavages

Deux tampons de liaison et de lavage sont préparés selon les compositions suivantes et stockés à 4°C pendant un mois, tampon de liaison: 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) avec 0.0001% de BSA finale même que le tampon de lavage: 0,02% BSA final pour le lavage. Les tubes eppendorfs (1.5ml, MCT-150-R, Axygen INC, USA) utilisés dans ces tests sont initialement lavés par 1 ml de tampon de lavage.

Les différentes concentrations d'aptamères sont incubées avec la bactérie cible dans un volume final de 200µL pendant 60 min, 37°C avec agitation moyenne. Une incubation obscure est nécessaire pour l'aptamère fluorescent. Cette incubation est suivie d'une centrifugation de 15 minutes à 8000g. Le surnageant est ainsi récupéré et le culot est lavé par 200 µL de tampon de lavage. Deux autres lavages sont nécessaires avant la resuspension du culot dans 200 µL de tampon de liaison. La fin de manipulation génère quatre produits: les surnageants, les produits des deux lavages et les aptamères liés aux bactéries. Ces derniers sont séparés et conservés dans une plaque de 96 puits.

6.4. Analyse des résultats

Pour l'aptamère F23, 30 µL de chaque puit sont déposés sur un spot différent du papier filtre (quatre spots par concentration d'aptamère). Le papier filtre est séché puis recouvert de papier cellophane et incubé pendant la nuit dans une cassette à écran radioactif et scanné au typhoon. Dans le cas de *P.aeruginosa*, tous les produits sont traités par l'eau de javel avant dépôt sur papier filtre pour tuer les bactéries avant de poursuivre les manipulations. La quantification de l'aptamère lié repose sur la quantification de la radioactivité retenue pour chaque concentration (lu sur le spot de culot repris dans le tampon de liaison) par rapport à un total (somme d'évènement radioactif de tous les spots) en tenant compte du ratio marqué/froid.

L'analyse de liaison de l'aptamère maléimide F23 et du conjugué repose sur l'intensité de la fluorescence des bactéries marquées avec l'aptamère. L'intensité de fluorescence est déterminée par le lecteur de plaques Cytation 3-imaging Reader à $\lambda = 438$ nm. L'intensité de fluorescence des aptamères retenus est ajustée par rapport à un bruit de fond dû à une liaison non spécifique par le logiciel GEN5 2.04. La vérification de la présence des bactéries dans les différents produits est également effectuée par le même appareil à $\lambda = 600$ nm. Pour le calcul de la constante de dissociation (Kd) de l'aptamère, l'intensité de fluorescence

ou de radioactivité des aptamères d'ADN a été tracée et les points de données ont été ajustés à l'équation $Y = (B_{max} * X) / (X + K_d)$, où X= la concentration de l'aptamère et Y l'intensité de liaison, en utilisant Graphpad Prism V5.0.0.

7. Préparation du conjugué

La préparation du conjugué est réalisée en plusieurs étapes (figure 15). Initialement, le 2,5-diméthyl furane-maléimide-F23-(6)-FAM est purifié par reverse-HPLC puis déprotégé. Ainsi l'oligonucléotide maléimide-F23-(6)-FAM est réagi avec le peptide (figure 16). Le complexe est purifié sur gel de polyacrylamide, dessalé et lyophilisé. Chaque étape de la procédure est détaillée dans la partie suivante de cette section.

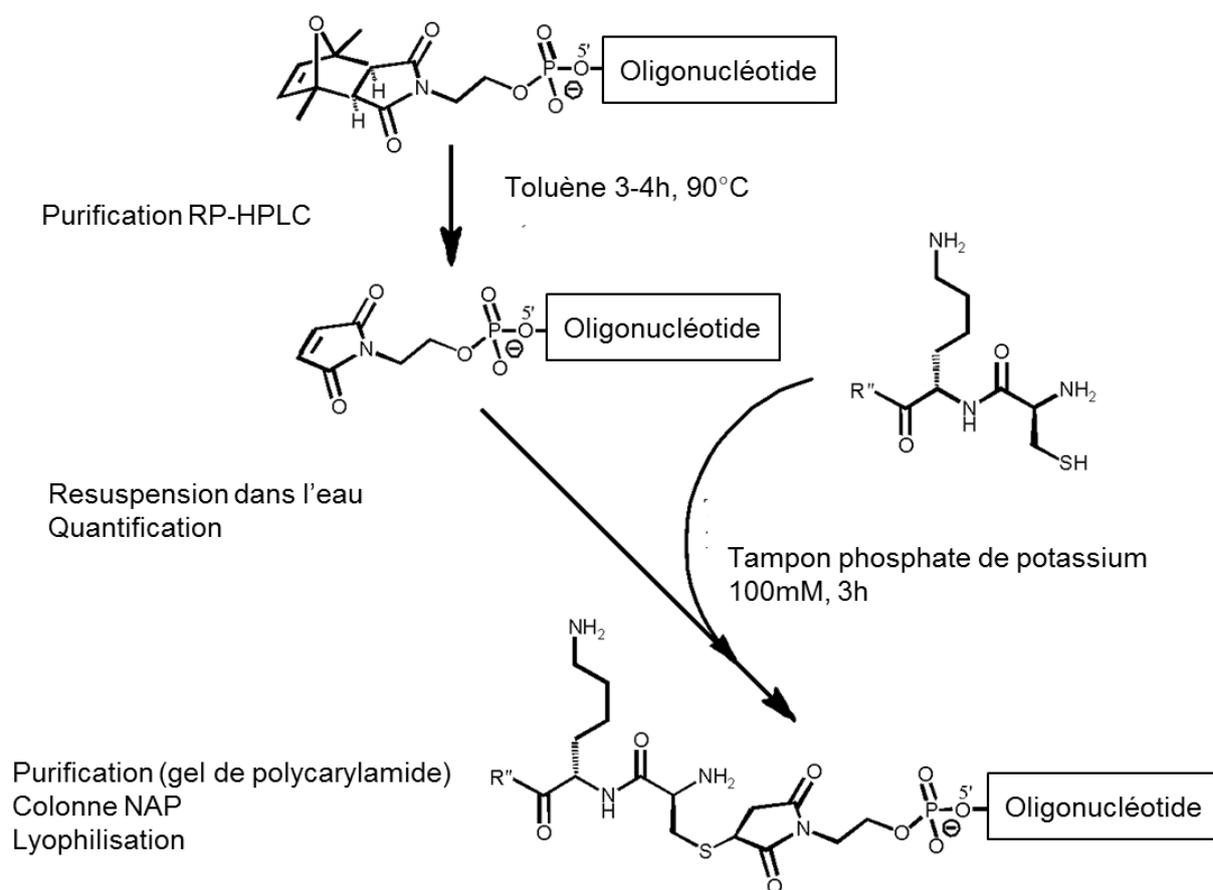


Figure 15: Schéma explicatif de la préparation du conjugué.

7.1. Déprotection du 2,5-dimethyl furane-maléimide-F23-(6)-FAM

La préparation du conjugué est réalisée en lots de 2 nmoles d'oligonucléotides lyophilisés qui sont initialement resuspendus dans un 1 ml d'acétonitrile anhydre. L'étape de déprotection repose sur la réaction de rétro-Diels-Alder. Après évaporation au speedvac (Vacufuge™), l'oligonucléotide est incubé dans 1.5 ml de toluène dans un bain d'huile pendant 4 heures à 90°C. Après refroidissement à la température ambiante, le toluène est évaporé et l'oligonucléotide est prêt à la conjugaison. L'oligonucléotide déprotégé est stocké à -20°C pendant la nuit. Ce protocole est adapté de la fiche technique du produit fourni par Trilink biotechnologies. Le produit de déprotection est purifié par RP-HPLC (tel que décrit à la section 5).

7.2. Synthèse du conjugué

Le peptide cystéine-pep 1037 est solubilisé dans l'eau à une concentration finale de 1 mg/ml dans H₂O DNase-RNase free. Dans 80 µL du tampon KH₂PO₄ (0.1M, pH 7), 2 nmoles d'oligonucléotide déprotégé purifié par RP-HPLC sont solubilisés. 15nmoles de peptides sont (20 µL, environ 7 équivalent du peptide) y sont ajoutés progressivement. La réaction thiol-ène (figure 16) se déroule pendant 3 heures sous une faible agitation à 25°C (Harrison & Balasubramanian 1998, Williams & Chaput 2010).

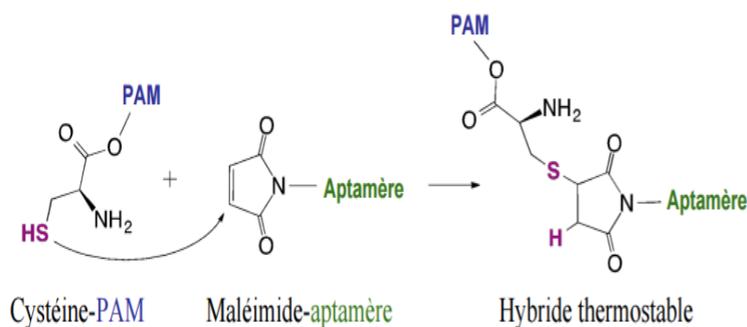


Figure 16: Schéma réactionnel pour la préparation d'hybride aptamère-(PAM)

8. Test d'activité antimicrobienne

Ce test est réalisé selon les directives du protocole de susceptibilité des bactéries aérobies aux méthodes de dilution antimicrobiennes proposé par l'institut des standards cliniques et laboratoires (Matthew A. Wikler et al 2012) . Trois à cinq coloniesensemencées sur milieu MHA servent à inoculer 25 ml du milieu MHB incubé à 35°C pendant 18-20 heures avec agitation de 200 rpm. La DO initiale de la culture mère est mesurée. Une première dilution de X fois pour atteindre Une DO entre 0.05 et 0.13 10^8 CFU/ml ($0.05 < DO < 0.13$) suivie d'une dilution de 1:100 (10^6 CFU/ml) sont effectuées pour préparer la suspension du test d'activité antimicrobienne.

Le conjugué pep 1037-cys-maléimide-F23-(6)-FAM lyophilisé est solubilisé dans l'H₂O DNase-RNase free à une concentration finale de 1 mM. Une dilution en série de 1:2 est effectuée dans le milieu MHB ajusté (CaCl₂ 25 mg/L et MgCl₂ 12.5 mg/L) dans une plaque de 96 puits (BD falcon # 353912). Ensuite, 5×10^4 CFU de la suspension bactérienne préparée sontensemencées dans chaque puit à un volume final de 100 µL. La plaque est incubée sans agitation à 35°C pendant 18 heures avant la détermination de la croissance bactérienne par lecture de DO à $\lambda = 600$ nm au lecteur de plaques Cytation. La première concentration qui correspond à l'inhibition de croissance bactérienne correspond à la concentration minimale inhibitrice. La conformité du test est validée par des contrôles négatifs (milieux utilisés) et d'autres positifs (croissance bactérienne en absence d'agents antimicrobiens). Le contrôle de standardisation de la biomasse inoculée dans chaque puit est effectué par ensemencement et dénombrement sur boîtes de pétri du milieu MHA. Un triplicata de test a été réalisé.

Résultats

1. Tests d'affinité et de spécificité

1.1. Validation de l'aptamère F23

Les résultats obtenus par ces expériences sont réalisés dans le cadre de confirmation des travaux précédemment publiés par Wang et collaborateurs. Le test d'affinité par marquage radioactif (figure 17) montre que l'aptamère F23 est présent majoritairement dans la fraction des bactéries pour *P.aeruginosa* contrairement aux bactéries *E.coli* et *P.putida*. Pour ces dernières, l'aptamère F23 est présent majoritairement dans les fractions de surnageant et lavage. Il en découle que F23 est capable de lier de manière robuste sa cible *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec une constante de dissociation $K_d = 39$ nM (Figure 18). Cette valeur paraît dans le même rang que celle initialement définie (17nM). Elle paraît également satisfaisante pour entamer les expériences suivantes. L'aptamère F23 paraît également spécifique pour *P.aeruginosa* ATCC 27853 en comparaison aux bactéries *E. coli* DH5 α , *Pseudomonas putida* KT2440 et *Pseudomonas fluorescens* 279. La figure 18 montre que l'aptamère F23 est capable de lier *E.coli* avec une constante de liaison $K_d = 22$ nM. L'intensité de radioactivité enregistrée demeure moindre que celle pour *P.aeruginosa* Cependant, il ne montre, comme prévue, aucune affinité à *Pseudomonas putida*.

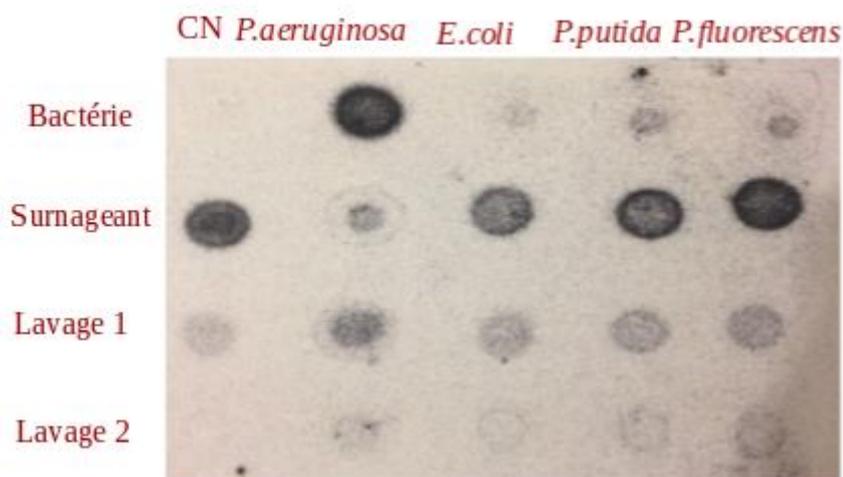


Figure 17: Test de spécificité de l'aptamère F23. CN= contrôle négatif (aptamère en absence de bactéries), Quatre bactéries testées: *E.coli* DH5 α , *Pseudomonas putida* KT2440 et *Pseudomonas fluorescens* 279 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

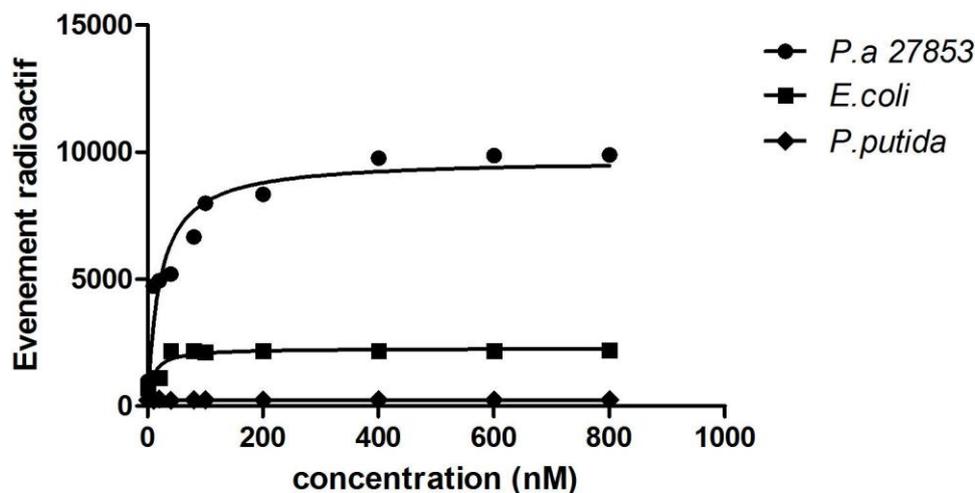


Figure 18: Test d'affinité de l'aptamère F23, (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, $K_d=39nM$, *E.coli* et *Pseudomonas putida*)

1.2. Affinité de l'aptamère maléimide-F23-cystéine-pep 1037

La modification maléimide en 5' affecte peu l'habileté de l'aptamère à lier sa cible. En effet on a enregistré une légère augmentation de la K_d par rapport à celle de l'aptamère F23, de 39 nM à environ 160nM (figure 19). L'effet du maléimide est peut-être combiné à celui de la fluorescéine en extrémité 3' de l'oligonucléotide. La sensibilité de l'étude par fluorescence par rapport à celle par la radioactivité reste également un facteur à prendre en considération. L'emploi de la fluorescence est imposé par les étapes ultérieures telles que la conjugaison, la caractérisation, la purification et le test d'activité antimicrobienne du conjugué. En conclusion, nos résultats paraissent encourageants pour entamer l'étude du conjugué.

1.3. Affinité du conjugué

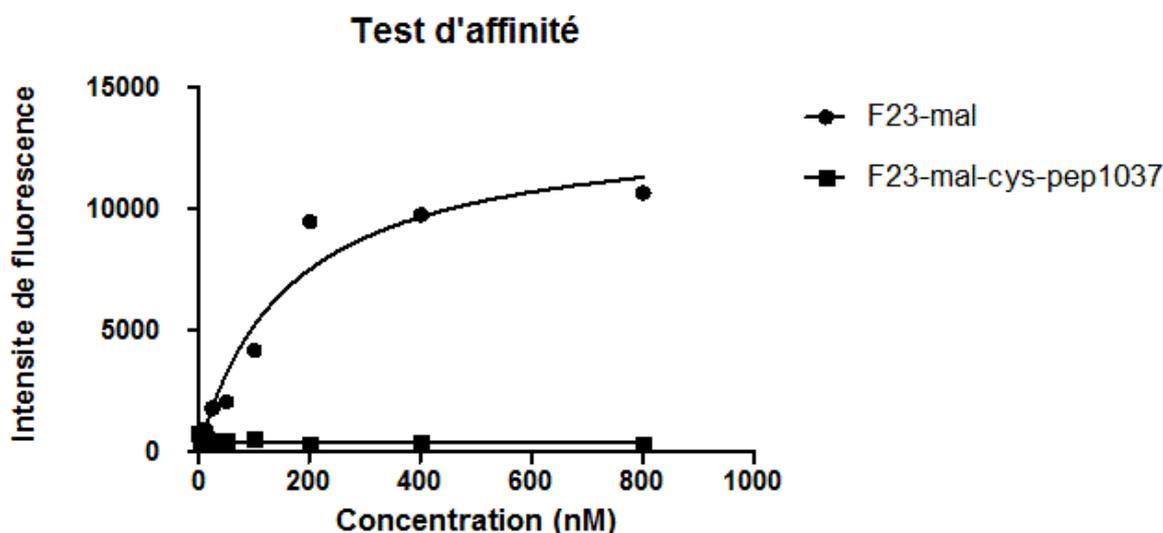


Figure 19: Affinité de l'aptamère maléimide-F23 (*P.aeruginosa* ATCC 27853)

Le conjugué F23-mal-cys-pep1037 (figure 19) ne montre aucune interaction avec sa cible *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Toute la fluorescence se trouve en totalité dans le surnageant et le premier lavage. On en conclut que la modification de l'aptamère par le peptide cys-1073 empêche sa liaison à sa cible. Une interaction électrostatique pourrait avoir lieu entre les deux entités anionique (oligonucléotide) et cationique (peptide). Puisqu'il s'agit d'une première tentative pour une nouvelle plateforme, on se réfère aux études de POC préparés pour d'autres applications, telles que la thérapie antisens, pour comparer l'effet de la conjugaison du peptide sur l'affinité de l'oligonucléotide à sa cible.

Les peptides cationiques interagissent avec le phosphate chargé négativement de l'ADN par des interactions électrostatiques par un phénomène qui rappelle la condensation d'ADN (Miyoshi et al 2003). Il en résulte la formation de nanoparticules qui sont capables d'interagir avec les membranes cellulaires (Bolhassani 2011). Ce résultat paraît en cohérence avec les résultats de Harrison et collaborateurs qui montrent que les peptides cationiques interagissent avec l'ADN simple brin. Ces liens sont encore plus stables pour les séquences riches en arginine. Cette propriété a été exploitée pour la thérapie génique. Il est établi que la conjugaison de l'oligonucléotide au CPP renforce sa capacité à s'hybrider à l'ADN complémentaire cible. Cette conjugaison aide également son administration dans le noyau

sans interférer avec son rôle d'inhibition d'expression du gène cible et sa sélectivité (de La Torre et al 1999). Cette conjugaison paraît à l'origine de la stabilité du complexe (Astakhova et al 2013, Astriab-Fisher et al 2002) .

Le nombre de bases insérées entre l'ADN et le peptide est d'un effet important sur l'affinité du conjugué (Pazos et al 2015). L'insertion d'un espaceur de 10 bases adénine à l'extrémité 3' de l'aptamère a également un effet néfaste sur son affinité. Il nous faut donc étudier la taille de la séquence espaceur et en trouver une qui ne nuira pas à la conformation tridimensionnelle finale de l'aptamère, facteur clé de l'affinité à la bactérie.

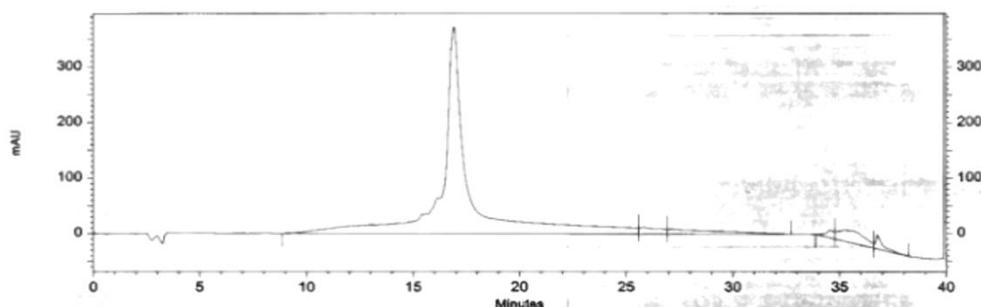
2. Préparation et caractérisation du conjugué

Le peptide 1037 (KRFIRVRV) issu des travaux de la Fuente-Núñez et collaborateurs a été synthétisé, testé pour son activité antimicrobienne (de la Fuente-Nunez et al 2012) puis modifié par un groupement cystéine en son extrémité N terminale (CKRFIRVRV) en vue de le conjuguer au groupement maléimide de l'aptamère F23 après sa déprotection.

L'oligonucléotide F23 a été modifié en son extrémité 3' par un groupement maléimide stabilisé par le groupement protecteur 2,5-diméthyl furane. Le choix de cette extrémité s'explique par notre volonté de positionner le groupement fluorescent FAM en extrémité 5' en vue de réduire les facteurs de changements par rapport aux conditions de SELEX à l'origine de cet aptamère.

Les figures 20 a et b montrent que les aptamères maléimide-F23-(6)-FAM et 2,5-diméthylfuran-maléimide-F23-(6)-FAM sont élués respectivement après 15.9 min et 17 min. C'est ainsi qu'on a pu valider l'étape de déprotection avant d'initialiser la conjugaison pour chaque lot.

a)



b)

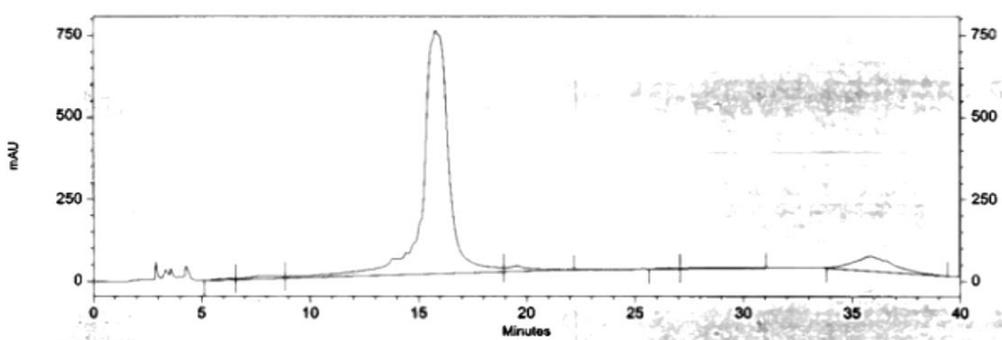


Figure 20: Purification des aptamères F23 par RP-HPLC

a) 2,5 Diméthylfurane maléimide-F23-(6)FAM b) maléimide-F23-(6)FAM (après élimination du groupement furane), $T_R = 17$ min et b) protégé par le groupement furane $T_R = 15.9$ min.

La figure 20 montre qu'on a réussi à conjuguer l'aptamère de 96 nucléotides au peptide de neuf acides aminés. En effet la séquence peptidique est à l'origine du retard de migration observé par rapport à celle du maléimide-F23 sur gel. Le rendement final reproductible de conjugaison est d'environ 28%. L'estimation de ce rendement est basée sur la détermination du nombre de moles de conjugué purifié par rapport au nombre de moles d'oligonucléotides purifié initialement protégé. Après purification sur gel, les oligonucléotides non conjugués sont restaurés du gel de polyacrylamide. Ce rendement a été amélioré en agissant sur plusieurs facteurs:

- La concentration en sel. Elle a permis d'empêcher le phénomène de précipitation.
- La purification par RP-HPLC initiale de l'oligonucléotide et du peptide.
- Les concentrations finales (dite la disponibilité molaire) des deux agents de couplage dans le milieu réactionnel. Un excès de sept fois plus de peptide s'est avéré idéal.

- L'instabilité du groupement maléimide en absence du groupement protecteur (toute réaction avec les molécules d'eau peut être à l'origine d'une déprotection incomplète).

La réaction de conjugaison a été effectuée immédiatement après la déprotection. On a observé des réductions du produit final si on laisse l'aptamère déprotégé dans l'eau trop longtemps.

En agissant sur une combinaison des paramètres cités, on a pu améliorer le rendement de 5% aux environs de 28% en utilisant le RP-HPLC au lieu de la purification sur gel. Ce rendement de 28% est faible en comparaison aux rendements atteints pour des réactions similaires. A titre comparatif, la conjugaison d'un oligonucléotide de 20 mers au peptide c-myc de 10 aa donne un rendement de plus de 50% après purification par RP-HPLC. Harrison et collaborateurs rapportent des rendements supérieurs à 80%, comparables à ceux de librairies de peptides de six aa riches en aa dibasiques avec des polymères de huit nucléotides (Harrison & Balasubramanian 1998). La richesse de la séquence peptidique en arginine et lysine n'est donc pas responsable de la réduction du taux de conjugaison. Par contre la principale différence réside dans la taille de l'aptamère. Habituellement, les études de POC rapportent des oligonucléotides de taille typiquement inférieure à 20 mer pour éviter les problèmes liés à l'accessibilité de la cystéine du peptide au groupement maléimide de l'oligonucléotide ou à la caractérisation d'hybrides de longues chaînes d'ADN et de courts peptides.

La caractérisation des hétéro-conjugués peptides oligonucléotides a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (figure 21), par RP-HPLC ou spectrométrie de masse. Cependant, elle reste une étape compliquée étant données les propriétés physico-chimiques très différentes des nucléotides et des acides aminés. Bien que les conditions d'analyse soient séquences dépendantes, des oligonucléotides plus courts sont plus faciles à analyser. Les hétéro-conjugués sont difficilement analysés par MALDI vue l'incompatibilité des matrices telles que l'acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA) utilisée pour la séparation par HPLC des oligonucléotides et l'acide 4-hydroxy- α -cyanocinnamique ou l'acide sinapinique employées pour les peptides dépendamment de leur taille. Leur analyse demeure possible par ESI même si la séquence protéique reste plus sensible aux fragmentations en mode positif contrairement aux oligonucléotides analysés en mode négatif (Steen & Jensen 2002). Dans notre cas on a opté pour caractériser le conjugué par gel de polyacrylamide et quelques essais d'ESI-MS. Cependant la caractérisation par la MALDI-MS a été difficile vue la nécessité de détection d'oligonucléotides et des peptides sur deux matrices de natures différentes. Pour nos tests, on a employé les matrices : 4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid et la sinapinic acid. Aucune des matrices n'a permis de caractériser le produit.

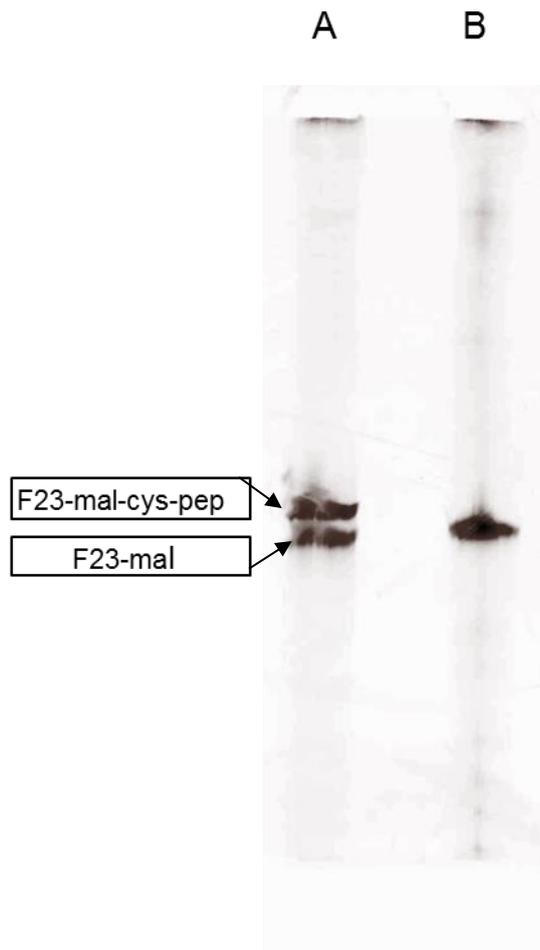


Figure 21 Purification du conjugué pep 1037-cys-mal-F23 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A) Hybride F23-mal-cys-pep + F23-mal B) F23-mal

3. Activité antimicrobienne du conjugué

A une concentration de peptide équivalente à la CMI du maléimide-cys-pep 1037 libre, le peptide conjugué ne semble exercer aucun effet antibactérien contre *P.aeruginosa* ATCC 27853 (figure 22). Trois facteurs indispensables à l'activité antimicrobienne semblent être influencés:

- L'indisponibilité du peptide à proximité de la bactérie par l'encombrement stérique. En effet le peptide lié via la cystéine peut établir des interactions électrostatiques avec une seconde chaîne d'acides aminés via ses charges libres (arginines et lysines).
- L'annulation de la charge cationique nécessaire à l'initiation de la lyse cellulaire.
- La structure en hélice parallèle ou perpendiculaire à la membrane qui serait empêchée par la présence de l'aptamère.

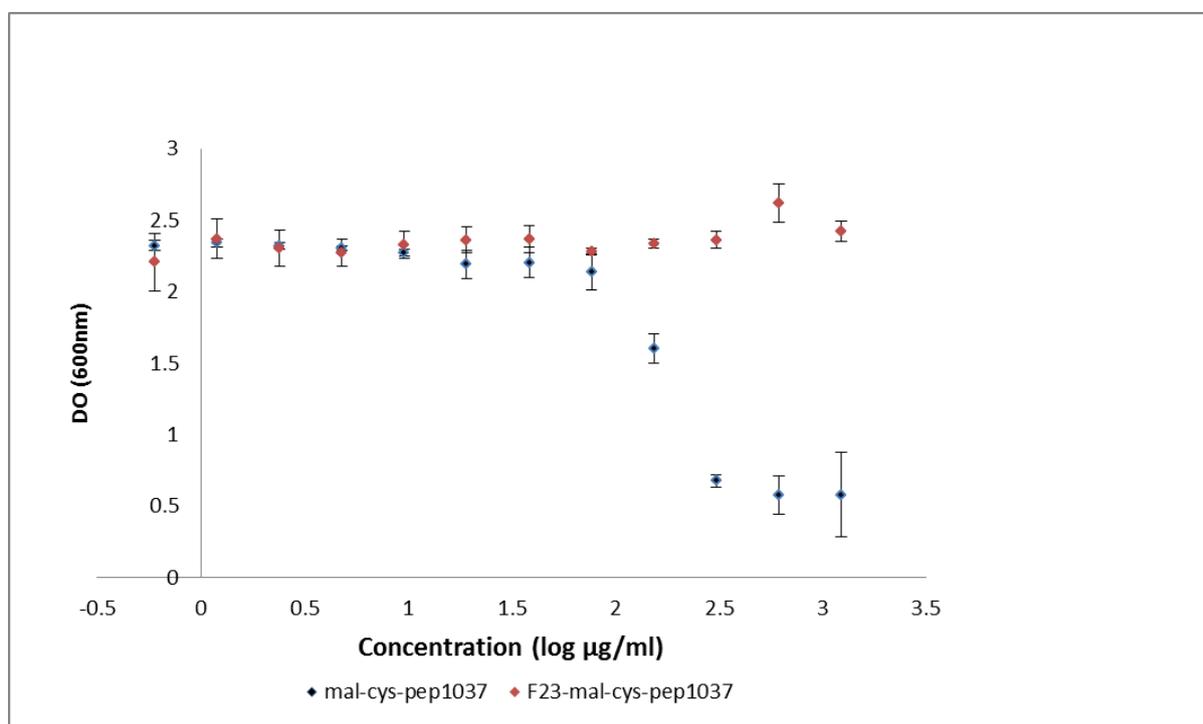


Figure 22 : *P.aeruginosa* ATCC 27853 est incubée séparément avec le peptide cys-pep 1037 et le conjugué F23-mal-cys-pep1037

Discussion

Ces travaux nous ont permis de:

- Mettre au point la caractérisation d'hétéro-conjugués oligonucléotides-peptides de longues séquences.
- D'identifier, comprendre et optimiser certains paramètres critiques de conjugaison.
- Tester la robustesse d'un aptamère et la tolérance de son affinité aux changements post SELEX.
- Tester la variation des conditions de SELEX sur l'affinité de l'aptamère.
- Tester un modèle peptidique comme une première catégorie d'agents antimicrobiens dans une plateforme d'administration ciblée.
- Révéler les paramètres à moduler des deux agents de la plateforme: charge, taille, séquence, etc
- Démontrer la faisabilité technique de synthèse et purification pour cette plateforme.

1. Aptamères : De bon vecteurs qui nécessitent de l'optimisation

Il est reconnu que les aptamères sont devenus des molécules faciles à synthétiser, à conserver et à modifier par des groupements chimiques, comme le thiol dans notre cas. Ces avantages expliquent leurs applications diversifiées précédemment discutées et leur emploi dans les conjugués POC. Notre étude confirme que la modification chimique par le groupement maléimide n'interfère pas avec l'affinité de l'aptamère. Ce qui n'est pas le cas suite à la ramification par la chaîne peptidique. Sachant que toute amélioration de l'action de l'agent antimicrobien (CMI, spécificité, vitesse bactéricide, etc) est basée en premier lieu sur le maintien de l'affinité de l'aptamère, la création de ce type de plateforme semble difficile à moins de supprimer l'effet négatif exercé par le PAM sur son vecteur. Ainsi, la continuité de cette étude est conditionnée par l'adaptation de l'aptamère vecteur de façon à préserver sa fonctionnalité après insertion dans la plateforme. Pour ce faire, plusieurs pistes dont certaines sont citées ci-dessous peuvent être explorées.

1.1. Taille d'aptamères

La taille de l'aptamère a joué un rôle de facteur limitant pour sa caractérisation et sa conjugaison au peptide. Il en découle la nécessité de réduction de sa taille. Il est possible de générer des aptamères de 30-50 nucléotides par plusieurs variantes de SELEX en raccourcissant ou supprimant les séquences constantes communes nécessaires pour l'amplification (amorces). On peut suggérer la « primer free SELEX » où la librairie initiale constituée de séquences oligonucléotidiques variables est incubée avec la cible. En deuxième étape, une élongation des oligonucléotides retenus par la cible est effectuée par des séquences contenant des sites de restriction enzymatiques à l'aide d'une enzyme ADN ligase. Ces séquences jouent le rôle d'amorces au moment de l'amplification et sont digérées avant le début du prochain tour de sélection (figure 23). Sachant qu'on ne dispose que d'une liste d'aptamères de plus de 90 nucléotides pour *Pseudomonas aeruginosa* où F23 a le meilleur K_d comparativement aux autres aptamères sélectionnés (Wang et al 2011), il serait plutôt convenable de changer la cible si le but principal est la preuve de concept. En effet, il reste possible de sélectionner un aptamère plus court pour une autre cible bactérienne. A titre d'exemple, on pourra se baser sur les travaux de Chang et collaborateurs pour cibler *Staphylococcus aureus* par l'aptamère S17 de 62 nucléotides et $K_d=35nM$ (Chang et al 2013). Alternativement, des aptamères plus petits peuvent parfois être obtenus par une série de délétion des séquences sélectionnées pour trouver la région essentielle.

Pour faciliter l'étape de caractérisation, plusieurs études proposent des analyses par MS/MS après réduction de la séquence d'oligonucléotides en mono, di ou trinucleotides. L'hétéro-conjugué aura ainsi les propriétés du peptide (Flett et al 2015). Il s'agit de digérer l'oligonucléotide par une enzyme nucléase et libérer le bout combinant le peptide et un ou deux nucléotides. La mise au point de cette technique dans notre laboratoire nous permettra d'analyser les conjugués avec des agents antimicrobiens différents. Elle permettra aussi de détecter la liaison de ces derniers aux oligonucléotides même si leur taille est minime ou ne porte pas une différence de taille aisément détectée sur gel de polyacrylamide.

Primer-Free SELEX Protocol (Random DNA Library)

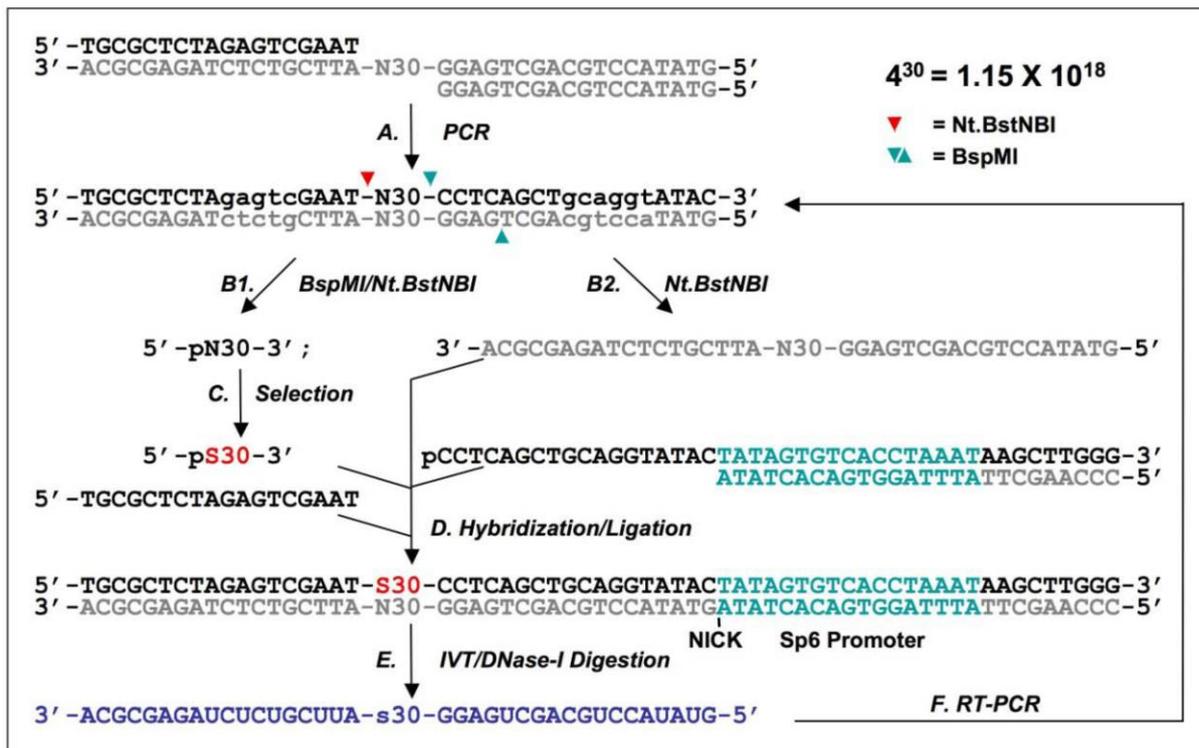


Figure 23: Exemple de protocole de SELEX sans amorces.

Figure tirée de (Pan et al 2008)

1.2. Aptamères avec un bras espaceur

Dans cette étude, l'oligonucléotide étant lié directement au peptide a annulé son rôle antimicrobien tout en perdant sa capacité d'interagir avec la bactérie. On prévoit dans les études ultérieures l'insertion d'un bras espaceur PEG en tirant profit de ce qui a été précédemment rapporté pour ce type de modification chimique des aptamères. L'objectif est d'éloigner l'oligonucléotide de l'agent antimicrobien pour éviter toute interaction structurale ou la limiter dans la zone des amorces (ou du moins une région non-essentielle pour lier la cible). En plus, le PEG donne à l'aptamère une résistance dans le corps contre la dégradation par les nucléases. L'espaceur peut être également une séquence oligonucléotidique dont la taille reste à optimiser (Pazos et al 2015). Indépendamment de la nature de l'espaceur inséré, selon d'anciennes études de POC, l'espaceur s'avère capable d'améliorer l'effet désiré. A titre d'exemple, le POC préparé pour l'inhibition de l'enzyme neutrophile elastase ne montre aucune amélioration par rapport au tetrapeptide seul en absence du bras liant (Lin et al 1995). La taille de l'espaceur choisi et le taux d'amélioration paraissent structure-dépendants.

1.3. Aptamère et biofilm

Notre tentative de tester la liaison de l'aptamère F23 au biofilm de *P.aeruginosa* montre que ce dernier n'a aucune affinité aux bactéries séssiles. Bien qu'il reste à tester l'affinité et l'activité antibiofilm du conjugué, cette première observation laisse suggérer une amélioration de l'efficacité du pep1037-F23 sur l'éradication du biofilm de *P.aeruginosa*. Cependant, certains aptamères ont été générés pour lier le flagelle des bactéries afin d'inhiber précocement et spécifiquement la formation de leur biofilm (Ning et al 2015) quand ils sont conjugués aux agents antimicrobiens (peptides, antibiotiques, etc). Par analogie aux travaux récemment publiés par Lijuan et collaborateurs et dans le cadre de la poursuite de notre étude, il sera utile d'intégrer des aptamères développés contre des flagelles de *P.aeruginosa* dans le système d'administration ciblée du pep1037, le dimère ou un antibiotique conventionnel pour appuyer l'action antibiofilm de l'agent antimicrobien (Lijuan et al 2016).

2. Agent antimicrobien : stratégies pour pallier aux problèmes de séquences, charges et positions de conjugaison

La séquence peptidique riche en arginine et lysine présente également sa part de problèmes de conjugaison comparés à celles moins riches en ces deux acides aminés. Impliqués dans l'activité antimicrobienne par leurs charges positives, ces aa dibasiques ne peuvent pas être retirés de la chaîne peptidique en principe. De ce fait, on pense plutôt opter pour:

- Étudier l'effet de la longueur de la chaîne peptidique sur l'activité antimicrobienne. Pour ce faire, on commence par conjuguer une cystéine suivi des acides aminés du peptide antimicrobien un par un. On reconnaît également dans les bases de données plusieurs candidats peptidiques potentiels moins courts.
- Étudier la conjugaison aptamère-peptide en 5' ou en C terminal. Ce changement de position reste une alternative pour optimiser la quantité du produit final et peut-être améliorer son affinité
- Changer la catégorie d'agents antimicrobiens. Essentiellement, on pourra s'intéresser aux antibiotiques conventionnels reconnus pour la cible tels que la Ciprofloxacine et la ceftazidime pour *P.aeruginosa*. Il reste aussi possible de conjuguer des séquences mimiques des PAM débarrassés de leur charge positive telles que les peptoides. Plusieurs exemples ont été rapportés pour leur effet comparable à celui de LL 37 contre *P.aeruginosa* (Kapoor et al 2011, Lin et al 1995).

Dans des étapes ultérieures et pour éviter un effet négatif similaire sur l'affinité de l'aptamère et l'activité antimicrobienne, une stratégie de conjugaison de type thermosensible (contrairement au conjugué thermostable préparé durant cette étude) peut être adoptée. Une réaction réversible de type Diels-Alder entre le furane-maléimide peut être exploitée. Dans ce cas, l'aptamère F23 garde son groupement maléimide et le pep1037 sera modifié par un groupement furane en son extrémité N-terminale. Dans cette stratégie, un scénario en trois étapes peut être imaginé et est illustré dans la figure 24 :

- L'aptamère F23 achemine le peptide vers la cible bactérienne.
- Le vecteur F23 et l'agent antimicrobien pep1037 sont séparés progressivement sous l'effet de la température du corps (qui accélère la réaction de rétro Diels-Alder).
- Le pep1037 entame son action antimicrobienne.

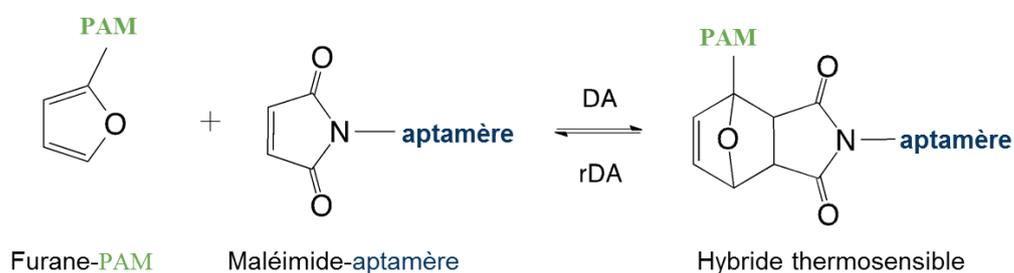


Figure 24: Conjugué thermosensible

Conclusion

Ces travaux ont généré le dimère cys-pep1037 qui combine un effet antimicrobien élevé et une activité antibiofilm. Ce dimère peut constituer un candidat antimicrobien pour une plateforme thermosensible d'administration ciblée, voire servir de base pour être utilisé en tant que peptide non-conjugué. Également, un aptamère de 96 nucléotides a été conjugué à un peptide pour mettre en place une nouvelle génération d'agents antimicrobiens, même si la conjugaison d'aptamères de taille plus réduite reste recherchée. L'étude du maintien de la fonctionnalité du vecteur et de l'agent effecteur (aptamère et PAM) au sein du conjugué a montré un effet négatif pour les deux composantes, supprimant à la fois l'activité antimicrobienne globale du POC et l'affinité de l'aptamère. Il en découle une réflexion sur les caractéristiques d'agents antimicrobiens (peptide cationique, anionique, antibiotique classique, peptide mimique, etc) et des aptamères (longueur, position...) à intégrer. La possibilité d'un bras espaceur (nucléotides, PEG, etc) reste une alternative prometteuse.

Pour conclure, un essai d'optimisation de toutes les composantes de la plateforme est nécessaire pour la rendre fonctionnelle.

Références

- Abraham T, Marwaha S, Kobewka DM, Lewis RN, Prenner EJ, et al. 2007. The relationship between the binding to and permeabilization of phospholipid bilayer membranes by GS14dK4, a designed analog of the antimicrobial peptide gramicidin S. *Biochim Biophys Acta* 1768: 2089-98
- Andrès E, Dimarcq JL. 2007. Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. Mise à jour. *Médecine et Maladies Infectieuses* 37: 194-99
- Antisense Drug Technology: Principles: Strategies aA. 2001. Crooke ST.: CRC Press.
- Astagneau P AT. 2011. *Surveillance épidémiologique: Principes, méthodes et applications en santé publique.*: Lavoisier.
- Astakhova IK, Hansen LH, Vester B, Wengel J. 2013. Peptide-LNA oligonucleotide conjugates. *Org Biomol Chem* 11: 4240-9
- Astriab-Fisher A, Sergueev D, Fisher M, Shaw BR, Juliano RL. 2002. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm Res* 19: 744-54
- Bahar AA, Ren D. 2013a. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 6: 1543-75
- Bahar AA, Ren D. 2013b. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* 6 6: 1543-75
- Batista CV, da Silva LR, Sebben A, Scaloni A, Ferrara L, et al. 1999. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 20: 679-86
- Bayer TS, Smolke CD. 2005. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nat Biotechnol* 23: 337-43
- Begolo D, Erben E, Clayton C. 2014. Drug target identification using a trypanosome overexpression library. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 6260-4
- Berens C, Thain A, Schroeder R. 2001. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* 9: 2549-56
- Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. 2016. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulmonary Medicine* 16: 174
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Micro* 13: 42-51
- Blind M, Blank M. 2015. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e223
- Bolhassani A. 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1816: 232-46
- Bongartz JP, Aubertin AM, Milhaud PG, Lebleu B. 1994. Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res* 22: 4681-8
- Boyd A, Chakrabarty AM. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol* 15: 162-8
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238-50
- Brogden NK, Brogden KA. 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* 38: 217-25
- Canadian-Cystic-Fibrosis-Registry. 2016. Annual report, 2016, Cystic fibrosis Canada
- Castro MS, Fontes W. 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* 12: 13-8

- Cerchia L, Esposito CL, Camorani S, Catuogno S, Franciscis V. 2011. Coupling Aptamers to Short Interfering RNAs as Therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)* 4: 1434-49
- Chandrasekhar S, Moorthy BS, Xie R, Topp EM. 2016. Thiol-Disulfide Exchange in Human Growth Hormone. *Pharm Res* 33: 1370-82
- Chang YC, Yang CY, Sun RL, Cheng YF, Kao WC, Yang PC. 2013. Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep* 3: 1863
- Chongsiriwatana NP, Miller TM, Wetzler M, Vakulenko S, Karlsson AJ, et al. 2011. Short alkylated peptoid mimics of antimicrobial lipopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 417-20
- Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, Orlando F, Riva A, et al. 2008. Protective effects of the combination of α -helical antimicrobial peptides and rifampicin in three rat models of Pseudomonas aeruginosa infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62: 1332-38
- Comité d'experts sur la résistance aux antibiotiques BA-M, Domingo M-C, Fortin A, Malouin F, Troesch M. 2014. Surveillance intégrée de la résistance aux antibiotiques, Institut national de santé publique du Québec.
- Costa JR, Silva NC, Sarmento B, Pintado M. 2016. Delivery Systems for Antimicrobial Peptides and Proteins: Towards Optimization of Bioavailability and Targeting. *Curr Pharm Biotechnol*
- Crusca E, Jr., Rezende AA, Marchetto R, Mendes-Giannini MJ, Fontes W, et al. 2011. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. *Biopolymers* 96: 41-8
- Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. 2003. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15416-21
- Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 501: 146-50
- 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 (BBA) - Biomembranes* 1462: 71-87
- Datta A, Kundu P, Bhunia A. 2016. Designing potent antimicrobial peptides by disulphide linked dimerization and N-terminal lipidation to increase antimicrobial activity and membrane perturbation: Structural insights into lipopolysaccharide binding. *J Colloid Interface Sci* 461: 335-45
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-22
- de la Fuente-Nunez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EB, et al. 2012. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 2696-704
- de la Fuente-Nunez C, Mansour SC, Wang Z, Jiang L, Breidenstein EB, et al. 2014a. Anti-Biofilm and Immunomodulatory Activities of Peptides That Inhibit Biofilms Formed by Pathogens Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Antibiotics (Basel)* 3: 509-26
- de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. 2014b. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog* 10: e1004152
- de La Torre BG, Albericio F, Saison-Behmoaras E, Bachi A, Eritja R. 1999. Synthesis and binding properties of oligonucleotides carrying nuclear localization sequences. *Bioconjug Chem* 10: 1005-12
- Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. 2011. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front Microbiol* 2: 128

- Dempsey CE, Ueno S, Avison MB. 2003. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. *Biochemistry* 42: 402-9
- Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. 2008. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17356-61
- Di Luca M, Maccari G, Maisetta G, Batoni G. 2015. BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling* 31: 193-9
- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47: 465-77
- Duan N, Wu S, Chen X, Huang Y, Xia Y, et al. 2013. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). *J Agric Food Chem* 61: 3229-34
- Durham-Colleran MW, Verhoeven AB, van Hoek ML. 2010. *Francisella novicida* forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol* 59: 457-65
- Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA. 2013. Selection of DNA aptamers for capture and detection of *Salmonella Typhimurium* using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3677-86
- Eulberg D, Klussmann S. 2003. Spiegelmers: biostable aptamers. *ChemBiochem* 4: 979-83
- Filloux A, Vallet I. 2003. [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* 19: 77-83
- Fishman N. 2006. Antimicrobial stewardship. *Am J Med* 119: S53-61; discussion S62-70
- Flett FJ, Walton JG, Mackay CL, Interthal H. 2015. Click chemistry generated model DNA-peptide heteroconjugates as tools for mass spectrometry. *Anal Chem* 87: 9595-9
- Franklin R, Cockerill I, MD, Matthew A, Wikler M, MBA, FIDSA, Jeff Alder P, Michael N, Dudley P, FIDSA, George M, Eliopoulos M, et al. 2012. Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9 Clinical and laboratory standards institute
- Franzman MR, Burnell KK, Dehkordi-Vakil FH, Guthmiller JM, Dawson DV, Brogden KA. 2009. Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. *Int J Antimicrob Agents* 33: 14-20
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, et al. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 276: 5836-40
- Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18: 1049-56
- Gilljam H, Ellin A, Strandvik B. 1989. Increased bronchial chloride concentration in cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest* 49: 121-4
- Godballe T, Nilsson LL, Petersen PD, Jenssen H. 2011. Antimicrobial beta-peptides and alpha-peptoids. *Chem Biol Drug Des* 77: 107-16
- Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 22: 667-74
- Gulot E, Georges P, Brun A, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Briandet R. 2002. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation. *Photochem Photobiol* 75: 570-8
- Guo KT, Ziemer G, Paul A, Wendel HP. 2008. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci* 9: 668-78
- Guyomard A, Dé E, Jouenne T, Malandain J-J, Muller G, Glinel K. 2008. Incorporation of a Hydrophobic Antibacterial Peptide into Amphiphilic Polyelectrolyte Multilayers: A Bioinspired Approach to Prepare Biocidal Thin Coatings. *Advanced Functional Materials* 18: 758-65

- Ha DG, O'Toole GA. 2015. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a Pseudomonas Aeruginosa Review. *Microbiol Spectr* 3: MB-0003-2014
- Hancock RE. 2000. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1723-9
- Harrison JG, Balasubramanian S. 1998. Synthesis and hybridization analysis of a small library of peptide-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res* 26: 3136-45
- He K, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW. 1996. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys J* 70: 2659-66
- Hernandez LI, Machado I, Schafer T, Hernandez FJ. 2015. Aptamers overview: selection, features and applications. *Curr Top Med Chem* 15: 1066-81
- Hong KL, Sooter LJ. 2015. Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. *Biomed Res Int* 2015: 419318
- Horswill AR, Stoodley P, Stewart PS, Parsek MR. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal Bioanal Chem* 387: 371-80
- Hoyle CE, Bowman CN. 2010. Thiol-ene click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 49: 1540-73
- Hua J, Yamarthy R, Felsenstein S, Scott RW, Markowitz K, Diamond G. 2010. Activity of antimicrobial peptide mimetics in the oral cavity: I. Activity against biofilms of *Candida albicans*. *Mol Oral Microbiol* 25: 418-25
- Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, et al. 2009. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *ChemBiochem* 10: 862-8
- Izquierdo-Barba I, Vallet-Regi M, Kupferschmidt N, Terasaki O, Schmidtchen A, Malmsten M. 2009. Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials* 30: 5729-36
- Jayasena SD. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45: 1628-50
- Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263: 1425-9
- Jordan GM, Yoshioka S, Terao T. 1994. The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state. *J Pharm Pharmacol* 46: 182-5
- Joris L, Dab I, Quinton PM. 1993. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev Respir Dis* 148: 1633-7
- Juby CD, Richardson CD, Brousseau R. 1991. Facile preparation of 3'oligonucleotide-peptide conjugates. *Tetrahedron Letters* 32: 879-82
- Kapoor R, Wadman MW, Dohm MT, Czyzewski AM, Spormann AM, Barron AE. 2011. Antimicrobial peptoids are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3054-7
- Keefe AD, Cload ST. 2008. SELEX with modified nucleotides. *Curr Opin Chem Biol* 12: 448-56
- Kichler A, Leborgne C, Marz J, Danos O, Bechinger B. 2003. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1564-8
- Lai Y, Gallo RL. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* 30: 131-41
- Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. 2013. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* 5: 34-43
- Larrick JW, Hirata M, Shimomoura Y, Yoshida M, Zheng H, et al. 1993. Antimicrobial activity of rabbit CAP18-derived peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2534-9
- Latulippe DR, Szeto K, Ozer A, Duarte FM, Kelly CV, et al. 2013. Multiplexed microcolumn-based process for efficient selection of RNA aptamers. *Anal Chem* 85: 3417-24
- Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. 2011. The potential of antimicrobial peptides as biocides. *Int J Mol Sci* 12: 6566-96

- Lee JY, Yang ST, Lee SK, Jung HH, Shin SY, et al. 2008. Salt-resistant homodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. *FEBS J* 275: 3911-20
- Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122-9
- Li W, Tailhades J, O'Brien-Simpson NM, Separovic F, Otvos L, Jr., et al. 2014. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. *Amino Acids* 46: 2287-94
- Lijuan C, Xing Y, Minxi W, Wenkai L, Le D. 2016. Development of an aptamer-ampicillin conjugate for treating biofilms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- Lin Y, Padmapriya A, Morden KM, Jayasena SD. 1995. Peptide conjugation to an in vitro-selected DNA ligand improves enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11044-8
- Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U. 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 21: 99-103
- Liu SP, Zhou L, Lakshminarayanan R, Beuerman RW. 2010. Multivalent Antimicrobial Peptides as Therapeutics: Design Principles and Structural Diversities. *Int J Pept Res Ther* 16: 199-213
- Luo C, Lei Y, Yan L, Yu T, Li Q, et al. 2012. A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of. *Electroanalysis* 24: 1186-91
- Mairal T, Ozalp VC, Lozano Sanchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 390: 989-1007
- Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN, Fauci AS. 2016. Antimicrobial resistance. *JAMA* 316: 1193-204
- Matsuzaki K. 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376: 391-400
- 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: 11361-8
- Matthew A. Wikler M, MBA, FIDSA, Jeff Alder P, Michael N. Dudley P, FIDSA, George M. Eliopoulos M, Mary Jane Ferraro P, MPH, et al. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9, Clinical and laboratory standards institute
- Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo J-D, Jeannot K. 2011. Pseudomonas aeruginosa et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011: 49-62
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, et al. 2007. Pseudomonas aeruginosa : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques* 9: 189-98
- Miyoshi D, Matsumura S, Li W, Sugimoto N. 2003. Structural polymorphism of telomeric DNA regulated by pH and divalent cation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22: 203-21
- Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. 2008. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21: 595-99
- Moremi N, Claus H, Mshana SE. 2016. Antimicrobial resistance pattern: a report of microbiological cultures at a tertiary hospital in Tanzania. *BMC Infect Dis* 16: 756
- Morrison GM, Rolfe M, Kilanowski FM, Cross SH, Dorin JR. 2002. Identification and characterization of a novel murine beta-defensin-related gene. *Mamm Genome* 13: 445-51

- Mosca DA, Hurst MA, So W, Viajar BS, Fujii CA, Falla TJ. 2000. IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1803-8
- Nagant C, Pitts B, Nazmi K, Vandenbranden M, Bolscher JG, et al. 2012. Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5698-708
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29: 464-72
- Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 518-23
- Nichols WW, Evans MJ, Slack MP, Walmsley HL. 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135: 1291-303
- Ning Y, Cheng L, Ling M, Feng X, Chen L, et al. 2015. Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer. *Pathog Dis* 73: ftv034
- Nizet V. 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* 8: 11-26
- O'Toole GA. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*: 2437
- Obst U, Schwartz T, Volkmann H. 2006. Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. *Int J Artif Organs* 29: 387-94
- Ohk SH, Koo OK, Sen T, Yamamoto CM, Bhunia AK. 2010. Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *J Appl Microbiol* 109: 808-17
- Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. 2008. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun* 76: 4176-82
- Palermo EF, Kuroda K. 2010. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 1605-15
- Pan W, Xin P, Clawson GA. 2008. Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries. *Biotechniques* 44: 351-60
- Paris C, Brun O, Pedroso E, Grandas A. 2015. Exploiting Protected Maleimides to Modify Oligonucleotides, Peptides and Peptide Nucleic Acids. *Molecules* 20: 6389
- Park S-C, Park Y, Hahm K-S. 2011. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 5971
- Pasupuleti M, Chalupka A, Morgelin M, Schmidtchen A, Malmsten M. 2009. Tryptophan end-tagging of antimicrobial peptides for increased potency against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* 1790: 800-8
- Paulsen VS, Blencke HM, Benincasa M, Haug T, Eksteen JJ, et al. 2013. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1 - and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. *PLoS One* 8: e53326
- Payne D, Tomasz A. 2004. The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. *Curr Opin Microbiol* 7: 435-8
- Pazos E, Portela C, Penas C, Vazquez ME, Mascarenas JL. 2015. Peptide-DNA conjugates as tailored bivalent binders of the oncoprotein c-Jun. *Org Biomol Chem* 13: 5385-90
- Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. 2010. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 8: 340-9
- Peschen D, Li H-P, Fischer R, Kreuzaler F, Liao Y-C. 2004. Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nat Biotech* 22: 732-38
- Peyrottes S, Mestre B, Burlina F, Gait MJ. 1998. The synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates by a fragment coupling approach. *Tetrahedron* 54: 12513-22

- Pinto-Alphandary H, Andremont A, Couvreur P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13: 155-68
- Potvin E, Lehoux DE, Kukavica-Ibrulj I, Richard KL, Sanschagrín F, et al. 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* 5: 1294-308
- Pozarowska D, Pozarowski P. 2016. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Cent Eur J Immunol* 41: 311-16
- Radzishewsky IS, Rotem S, Bourdetsky D, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Mor A. 2007. Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers. *Nat Biotechnol* 25: 657-9
- Reffuveille F, de la Fuente-Nunez C, Mansour S, Hancock RE. 2014. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 5363-71
- Rhodes A, Smithers N, Chapman T, Parsons S, Rees S. 2001. The generation and characterisation of antagonist RNA aptamers to MCP-1. *FEBS Letters* 506: 85-90
- Romling U, Balsalobre C. 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 272: 541-61
- Rusconi CP, Scardino E, Layzer J, Pitoc GA, Ortel TL, et al. 2002. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* 419: 90-4
- Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. 2017. Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: Results from Four years (2012-2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*
- Said Hassane F, Saleh AF, Abes R, Gait MJ, Lebleu B. 2010. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol Life Sci* 67: 715-26
- Sajjan US, Tran LT, Sole N, Rovaldi C, Akiyama A, et al. 2001. P-113d, an Antimicrobial Peptide Active against *Pseudomonas aeruginosa*, Retains Activity in the Presence of Sputum from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3437-44
- Saravanan R, Bhunia A, Bhattacharjya S. 2010. Micelle-bound structures and dynamics of the hinge deleted analog of melittin and its diastereomer: implications in cell selective lysis by D-amino acid containing antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1798: 128-39
- Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, et al. 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2: 1133-7
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, et al. 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human [bgr]-defensin 1. *Nature* 469: 419-23
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 325-35
- Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. 1997. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 43: 340-5
- Singerman LJ, Masonson H, Patel M, Adamis AP, Buggage R, et al. 2008. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: third-year safety results of the VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation (VISION) trial. *Br J Ophthalmol* 92: 1606-11
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417: 552-5

- Singh Y, Murat P, Defrancq E. 2010. Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem Soc Rev* 39: 2054-70
- Smulevitch SV, Simmons CG, Norton JC, Wise TW, Corey DR. 1996. Enhancement of strand invasion by oligonucleotides through manipulation of backbone charge. *Nat Biotechnol* 14: 1700-4
- Splith K, Neundorff I. 2011. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal* 40: 387-97
- Stanton TB. 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol* 21: 111-3
- Steen H, Jensen ON. 2002. Analysis of protein-nucleic acid interactions by photochemical cross-linking and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 21: 163-82
- Steiner H, Andreu D, Merrifield RB. 1988. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim Biophys Acta* 939: 260-6
- Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW. 2001. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J Am Chem Soc* 123: 4928-31
- Suh SH, Dwivedi HP, Choi SJ, Jaykus LA. 2014. Selection and characterization of DNA aptamers specific for *Listeria* species. *Anal Biochem* 459: 39-45
- Tan L, Neoh KG, Kang ET, Choe WS, Su X. 2011. PEGylated anti-MUC1 aptamer-doxorubicin complex for targeted drug delivery to MCF7 breast cancer cells. *Macromol Biosci* 11: 1331-5
- Tombelli S, Minunni M, Mascini M. 2007. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomolecular Engineering* 24: 191-200
- Tomlin KL, Coll OP, Ceri H. 2001. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can J Microbiol* 47: 949-54
- Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, et al. 2000. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 68: 2748-55
- Tung CH, Stein S. 2000. Preparation and applications of peptide-oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem* 11: 605-18
- Uchegbu IF, Schätzlein, A.G., Cheng, W.P., Lalatsa, A. (Eds.). 2013. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*.
- Vavalle JP, Rusconi CP, Zelenkofske S, Wargin WA, Alexander JH, Becker RC. 2012. A phase 1 ascending dose study of a subcutaneously administered factor IXa inhibitor and its active control agent. *J Thromb Haemost* 10: 1303-11
- Wang G. 2015. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol* 1268: 43-66
- Wang G, Li X, Wang Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37: D933-7
- Wang KY, Zeng YL, Yang XY, Li WB, Lan XP. 2011. Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 273-8
- Wei Z, Tung CH, Zhu T, Stein S. 1994. Synthesis of oligoarginine-oligonucleotide conjugates and oligoarginine-bridged oligonucleotide pairs. *Bioconjug Chem* 5: 468-74
- Williams BA, Chaput JC. 2010. Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates using a heterobifunctional crosslinker. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* Chapter 4: Unit4 41
- Wu S-L, Leung D, Tretyakov L, Hu J, Guzzetta A, Wang YJ. 2000. The formation and mechanism of multimerization in a freeze-dried peptide. *International Journal of Pharmaceutics* 200: 1-16
- Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK, Barth S. 2008. Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 554-65
- Yang C, Yan N, Parish J, Wang X, Shi Y, Xue D. 2006. RNA aptamers targeting the cell death inhibitor CED-9 induce cell killing in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 281: 9137-44
- Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55

- Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T. 1996. Purification of the 11- and 5-kDa antibacterial polypeptides from guinea pig neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 328: 219-26
- Yoshioka S, Aso Y, Izutsu K, Terao T. 1993. Aggregates formed during storage of beta-galactosidase in solution and in the freeze-dried state. *Pharm Res* 10: 687-91
- Zaknoon F, Sarig H, Rotem S, Livne L, Ivankin A, et al. 2009. Antibacterial properties and mode of action of a short acyl-lysyl oligomer. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3422-9
- Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, et al. 2010. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4684-93
- Zhang M, Zhao J, Zheng J. 2014. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. *Soft Matter* 10: 7425-51
- Zhang Y, Hong H, Cai W. 2011. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr Med Chem* 18: 4185-94