



Design, synthèse et étude structure-activité d'analogues synthétiques du peptide antimicrobien Microcine J25

Mémoire

François Bédard

Maîtrise en sciences pharmaceutiques

Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© François Bédard, 2015

RÉSUMÉ

L'augmentation et la propagation alarmante de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes sont devenues un problème important de santé publique. Pour surmonter cette situation inquiétante, il y a un besoin croissant de nouveaux agents antimicrobiens avec des modes d'action innovants. La grande majorité des espèces bactériennes utilisent des peptides pour se défendre et se protéger contre d'autres microorganismes dans leur environnement. Ces peptides antimicrobiens possèdent des spectres d'activité et modes d'action très variés et représentent une source très intéressante pour découvrir et développer des agents antibactériens efficaces. L'objectif du projet consistait à faire le design et la synthèse d'analogues du peptide antimicrobien microcine J25 pour effectuer des études structure-activité et mieux comprendre les modes d'action.

Comme la microcine J25 possède une structure particulière en lasso et extrêmement difficile à reproduire de façon synthétique, la stratégie était de faire le design par approche computationnelle d'analogues capables de mimer la structure de la microcine J25 sans passer par le lasso. Après leur synthèse, ces analogues ont été utilisés dans une étude structure-activité pour mieux comprendre l'impact de la structure sur le mode d'action et identifier les parties de la microcine J25 qui sont impliquées dans le transport et les interactions avec les cibles bactériennes.

ABSTRACT

The increasing and alarming spread of antibiotic resistance by pathogenic bacteria have become an important public health problem. To overcome this worrying situation, there is a growing need for new antimicrobial agents with innovative modes of action. The vast majority of bacterial species use peptides to defend and protect themselves against other microorganisms in their environment. These antimicrobial peptides possess a wide range of activity spectra and modes of action and are a very good source to discover and develop effective antimicrobial agents. The objective of this project was to design and synthesize analogues of the antimicrobial peptide microcin J25 to perform structure-activity studies for a better understanding of its modes of action.

As the microcin J25 has a particular lasso structure that is extremely difficult to replicate synthetically, the strategy was to design by computational approach analogues capable of mimicking the microcin J25's structure without the lasso topology. After synthesis, these analogs were used in a structure-activity study to better understand the impact of the structure on the mode of action and identify parts of the microcin J25 that are involved in the transport and interactions with bacterial targets.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xix
Avant-propos	xxi
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	3
1.2 Développement d'un antibiotique	6
1.3 Les peptides antimicrobiens.....	8
1.4 Classes et modes d'action des bactériocines.....	8
1.4.1 Classe I – Acides aminés non-naturels	9
1.4.2 Classe II – Acides aminés naturels (<10 kDa)	12
1.4.3 Classe III – Acides aminés naturels (>10 kDa).....	17
1.4.4 Classe IV - Complexes.....	19
1.4.5 Les bactériocines de Gram négatif.....	20
1.5 La microcine J25.....	23
1.5.1 La maturation de la MccJ25	23
1.5.2 Structure de la MccJ25	25
1.5.3 Modes d'action de la MccJ25.....	28
1.5.4 Peptides analogues actifs à la MccJ25.....	31
Chapitre 2 : Hypothèse de travail et objectifs	33
2.1 Hypothèse de travail	35
2.2 Objectifs.....	37
Chapitre 3 : Design et synthèse des analogues peptidiques de la microcine J25	39
3.1 Design des analogues de la microcine J25	41
3.2 Synthèse des peptides sur support solide	43
3.2.1 Cyclisations des peptides.....	44
3.2.2 Purifications et caractérisations des peptides.....	46
Chapitre 4 : Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms	49

Résumé	51
Abstract.....	53
Introduction	54
Materials and methods.....	56
Results.....	61
Peptide design.....	61
Evaluation of antimicrobial activity and toxicity	62
Structural characterization of peptides using circular dichroism (CD).....	66
Mode of action.....	67
Interaction of peptides with membrane lipids using circular dichroism (CD).....	68
Interaction of peptides with membrane lipids using FTIR.....	69
Discussion	73
References	76
Chapitre 5: Discussion et conclusion.....	83
5.1 Discussion générale.....	85
5.2 Conclusion	87
Bibliographie	89
Annexe I.....	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. L'alignement des séquences matures des bactériocines de classe IIa. Les cystéines soulignées forment des ponts disulfures. ³⁷	12
Tableau 2. Caractérisation par HPLC de la production de la MccJ25 cyclique en fonction de la présence ou non du peptide guide par rapport à la MccJ25 linéaire (I-MccJ25). ⁸⁶	24
Tableau 3. Sensibilité de plusieurs souches d' <i>E. coli</i> et de <i>Salmonella</i> à la MccJ25 par le test de Lawn. ⁹⁰	29
Tableau 4. CMI de certains analogues actifs de la MccJ25 sur différentes souches. ⁸⁴	31
Tableau 5. Caractérisations des analogues de la MccJ25.	47

CHAPITRE 4

Table 1. Minimal inhibitory concentrations of MccJ25 and its derivatives for bacteria.....	63
Table S1. Secondary structures of MccJ25 derivatives alone or in POPC, POPE and POPG vesicles based on CD spectroscopy.....	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Processus de sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques. ²	3
Figure 2. L'acquisition d'un gène de résistance à un antibiotique par les bactéries. ⁷	4
Figure 3. Les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries. ⁷	5
Figure 4. Processus de découverte d'un nouveau médicament. ¹¹	6
Figure 5. Découverte de la résistance aux antibiotiques après leur introduction. ²	7
Figure 6. La lanthionine.	9
Figure 7. Modifications post-traductionnelles pour la famille des lantibiotiques. ³⁴	10
Figure 8. (A) La nisine dont le motif de liaison au Lipide II encadré. (B) Le Lipide II et son site de liaison par les lantibiotiques. (C) Les modes d'action de la nisine.	11
Figure 9. Structure tridimensionnelle à l'intérieur de micelles déterminé par RMN de la Sakacine P en bleu avec le pont disulfure en jaune. PDB:1OG7.....	13
Figure 10. Représentation schématique des deux étapes impliquées dans le mode d'action proposé pour la classe IIa des bactériocines. ³⁷	14
Figure 11. Schéma du modèle de la lactococcine G et son orientation dans la membrane des cellules visées. ²⁶	14
Figure 12. Structure tridimensionnelle de la subtilosine A en bleu déterminé par RMN en solution. PDB : 1PXQ.....	15
Figure 13. Représentation schématique du mécanisme d'action de la bactériocine AS-48. ⁵⁵	16
Figure 14. Schéma représentant un pore dans la membrane bactérienne par la lacticine Q. Le diamètre moyen du pore est entre 4,6 et 6,6 nm, résultant à la fuite de protéines. ⁶¹	17
Figure 15. Structure obtenue par cristallographie de la lysostaphine (en bleu) complexée par le zinc (en rouge) et les chaînes latérales des acides aminés qui participent à la liaison avec le zinc (en vert). PDB:1QWY.....	18
Figure 16. Site d'hydrolyse de la lysostaphine sur le peptidoglycan des staphylocoques. ⁶⁵	19

Figure 17. Structure tridimensionnelle de deux peptides de la classe IV. (A) Structure la glycocine F (en bleu) déterminée par RMN en solution avec les sucres de *N*-acétylglucosamine (NAG) (en blanc) dont un est lié à une sérine entre les hélices via un lien éther (oxygène en rouge) et l'autre à une cystéine en C-terminal via un lien thioéther (souffre en jaune). PDB:2KUY. (B) Structure de la Sublancine (en bleu) déterminée par RMN en solution avec un β -D-glucose (en blanc) lié à une cystéine via un lien thioéther (souffre en jaune). PDB:2MIJ.20

Figure 18. Structure obtenue par cristallographie de colicines. (A) Structure de la colicine N (40 kDa) (en bleu), la plus petite colicine capable de former des pores.⁷² PDB:1A87 (B) Structure de la colicine M (en rouge) qui clive le lien ester phosphate entre le transporteur de lipides (bactoprénol) et le précurseur de muréine.⁷³ PDB :2XMX.....21

Figure 19. Exemple de mécanismes d'action retrouvés chez les microcines de la classe I.⁸²22

Figure 20. Illustration schématique de la production de la MccJ25 par le plasmide pTUC100 comportant quatre gènes : *mcjA* (bleu), *mcjB* (jaune), *mcjC* (rose), *mcjD* (vert). Les gènes codent pour le précurseur de la MccJ25 (McjA), les enzymes de maturation (McjB et McjC) et la protéine de sécrétion (McjD).⁸⁴23

Figure 21. Représentation schématique de la MccJ25 synthétase. Le peptide de tête est représenté par le rectangle vide; l'enzyme fonctionnelle à chaque étape est indiquée en gris.⁸⁶24

Figure 22. Structure tridimensionnelle de l'homodimer McjD déterminée par diffraction de rayons X et montrée dans le plan de la membrane. La membrane est montrée en gris. Les hélices d'une sous-unité sont numérotées. Les liens AMP-PNP sont indiqués en bâtonnets.⁸⁸ PDB :4PL025

Figure 23. Structure en solution de la MccJ25 déterminée par RMN. PDB:1Q71.....26

Figure 24. Structure de la microcine J25 après traitement à la thermolysine. (A) Structure déterminée par RMN en solution. PDB:1S7P (B) Ensemble de 20 structures calculés à partir de la RMN en solution montrant le squelette du peptide, ainsi que les chaînes latérales E8, F19 et Y20. ⁸⁹ (C) L'anneau et la queue en représentation CPK (Corey, Pauling et Koltun) dont les sphères représentent le diamètre des atomes montrant l'encombrement stérique du peptide lasso.⁸⁹26

Figure 25. Structure de la liaison de la MccJ25 (bleu) et du récepteur de sidérophore FhuA (gris) chez <i>E. coli</i> déterminée par diffraction de rayons X. PDB:4CU4.....	27
Figure 26. Représentation de l'interaction de la MccJ25 (en jaune) avec FhuA chez <i>E. coli</i> . ⁹⁶	28
Figure 27. Modèle du complexe de la MccJ25 avec l'ARN polymérase. La MccJ25 (en vert), l'ARN polymérase en tubes blancs et les sites de mutation qui confèrent de la résistance à la MccJ25 (en rouge et rose). ⁹⁸	30
Figure 28. Effet de la MccJ25 sur <i>S. typhimurium</i> (pGC01) (points blancs) et de la MccJ25-Th19, la MccJ25 traitée avec la thermolysine, sur <i>S. typhimurium</i> (pGC01) (points noirs) et <i>S. newport</i> (carrés) sur la consommation d'oxygène. ⁹⁰	30
Figure 29. Résultats HPLC de la cyclisation de la MccJ25 linéaire (A) en solution à l'aide de l'activateur HBTU ayant la MccJ25 synthétique cyclisée de tête à queue (B), ainsi que la cyclisation de l'anneau sur la chaîne latérale de l'acide glutamique (D) en comparaison avec la MccJ25 native (C). ¹⁰¹	35
Figure 30. Schéma du réseau des ponts hydrogènes de la MccJ25 en représentation bâtonnets pour la région «β-hairpin» (A) et la boucle du lasso (B). ¹⁰¹	36
Figure 31. Mécanisme général pour la réaction Tsuji-Trost servant à la déprotection des ester allylique. (a) addition oxydative; (b) échange d'un contre anion; (c) élimination réductrice. ¹⁰³	45
Figure 32. Schéma réactionnel de la cyclisation des ponts disulfures à l'aide du DMSO.	46

CHAPITRE 4

Figure 1. Amino acid sequence, molecular weight and net charge of MccJ25 and derived-peptides thereof. Amide and disulfide bonds are colored in blue and yellow respectively.	61
Figure 2. Inhibition of growth of <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> ATCC 8387 by MccJ25 and its derived peptides (C1, C3, NC3, 8-21C, 7-21C and WK_7-21) at 0.5 μM (gray) and 7.8 μM (black). Data are means of triplicate measurements.....	64
Figure 3. Hemolysis of horse red blood cells by MccJ25 (triangle), C1 (circle), 7-21C (diamond) and WK-7-21 (square). A 1 % (w/v) solution of Triton X-100 was the positive control. The values are means ± SD of triplicate analyses.....	65

Figure 4. Circular dichroism spectra for MccJ25 (black), C1 (Blue), 7-21C (green) and WK_7-21 (red)..... 66

Figure 5. Inhibition of *E. coli* RNA polymerase in vitro by MccJ25 and peptides C1, C3, 7-21C and WK-7-21 at 5 μ M (gray) and 50 μ M (black). Rifampicin (200 nM) was the positive control. The values are means \pm SD of triplicate analyses..... 67

Figure 6. Inhibition of oxygen consumption by MccJ25 and peptides C1, C3, 7-21C and WK-7-21 at their respective MICs. The values are means \pm SD of triplicate analyses. 68

Figure 7. FTIR spectra showing the band corresponding to symmetric methylene stretching vibration $V_s(\text{CH}_2)$ of pure DPPG at pD 6 (A) and mixtures of DPPG and peptides C1 (B), 7-21C (C) or WK_7-21 (D)..... 70

Figure 8. Acyl chain transition temperature for DPPG (A) and DMPC (B) in the absence or presence of the different peptides, as revealed by the shift in the $V_s(\text{CH}_2)$ band of the FTIR spectra. DPPG (black diamond); DMPC (white diamond); C1 (square); 7-21 (triangle) 71

Figure 9. FTIR spectra showing the ester group (C=O) stretching vibration band at 1740 cm^{-1} for DPPG alone (A) and in the presence of C1 (B), 7-21C (C) and WK_7-21 (D)..... 72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Produits chimiques et solvants

ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
DCM	Dichlorométhane
Dha	Didéshydroalanine
Dhb	Didéshydrobutyryne
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMF	Diméthylformamide
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HCTU	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-O-(6-chloro-1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HPro	Dihydroxyproline
MeOH	Méthanol
NAG	<i>N</i> -acétylglucosamine
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
OPr	Oxopropionyl
OBu	Oxobutyryl
PEG	Polyéthylène glycol
Pip	Pipéridine
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
TIPS	Triisopropylsilane

Unités

°C	Degré Celsius
g	Gramme
h	Heure
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute

mL	Millilitre
µL	Microlitre
mmol	Millimole
mol	Mole
m/z	Masse sur charge
s	Seconde
nm	Nanomètre
µm	Micromètre
Å	Amstrong
equiv	Équivalents

Méthodes d'analyse

APCI	« <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> »
ESI	« <i>Electrospray ionization</i> »
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (« <i>High-performance liquid chromatography</i> »)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV	Ultraviolet
MS	Spectromètre de masse (« <i>Mass spectrometry</i> »)
LCMS	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

Termes biologiques

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AMP	« <i>Antimicrobial peptide</i> »
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Da	Dalton
Kb	Kilobases
LAB	« <i>Lactic acid bacteria</i> »
MccJ25	Microcine J25
CPK	Corey, Pauling et Koltun
sec	Sécrétion
pp.	<i>Species pluralis</i>

« Anyone who has never made a mistake has never tried anything new. »

-Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Éric Biron en premier lieu pour m'avoir donné sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire pour un stage d'été qui s'est transformé par la suite en maîtrise, mais surtout de m'avoir aidé et encouragé tout au long de cette étude.

Ensuite je voudrais remercier les équipes des Professeurs Ismail Fliss et Muriel Suribade de l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), co-auteurs de cet article, en particulier Riadh Hammami pour sa patience et de ses efforts dans la réalisation de cet article.

Je tiens aussi à remercier les organismes subventionnaires qui ont permis mes travaux tels le Fond d'Enseignement et de Recherche (FER) de la faculté de pharmacie de l'Université Laval, ainsi que le Centre de Recherche en Endocrinologie Moléculaire et Oncologie et Génomique Humaine (CREMOGH) pour leur soutien financier sous forme de bourses sans lequel cette étude n'aurait jamais pu voir le jour.

Et sans oublier ma famille, qui m'a encouragé et soutenu tout au long de mon parcours universitaire.

AVANT-PROPOS

Le troisième chapitre de ce mémoire fait l'objet d'un article intitulé *Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms* qui a été publié en ligne le 4 décembre 2014 dans le journal *Amino Acids*. Les images ont été déplacées afin de correspondre au format du mémoire.

Cet article a été réalisé en collaboration avec les équipes de recherche des Prs Ismail Fliss et Muriel Suribade de l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels de l'Université Laval. Sous la direction du Pr Éric Biron j'ai participé activement au design des analogues de la microcine J25, effectué toutes les synthèses, purifications et caractérisations des peptides et pris part aux tests d'activité antibactérienne. Le design des analogues ainsi que les tests d'activités antibactériens ont été pilotés par le post-doctorant Riadh Hammami de l'équipe du Pr Fliss tandis que les études de dichroïsme circulaire et de FTIR ont été réalisées par Ahmed Gomaa un post-doctorant de l'équipe du Pr Subirade.

La rédaction de l'article a été pilotée le Dr Hammami et j'ai été responsable de la partie synthèse et caractérisation de l'article tout assistant Riadh dans la design. Ma contribution totale pour cet article est d'environ 35%.

Autres publications ne faisant pas partie du présent mémoire :

Bédard F, Girard A, Biron E. (2013) A convenient approach to prepare topologically segregated bilayer beads for one-bead two-compound combinatorial libraries. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 19, 13-23

Bédard F, Liang X, Godzaridis E, Kukavica-Ibrulij I, Lévesque R, Biron E. (2012) Synthesis, structure activity relationship studies and antimicrobial activity of new Tigerinins analogs. In "*Peptides 2012*", Proceedings of 32nd European Peptide Symposium (G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou, J. Matsoukas, Eds.), European Peptide Society, Athens, Greece, pp. 188-189.

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1.1 La résistance bactérienne aux antibiotiques

Les infections de cause bactérienne sont très courantes et elles sont responsables d'un grand nombre de maladies affectant notre santé. Heureusement ces infections peuvent la plupart du temps être traitées à l'aide d'antibiotiques. Cependant, l'augmentation et la propagation alarmante de la résistance aux antibiotiques chez plusieurs souches de bactéries pathogènes représentent une menace sérieuse pour la santé publique.

En effet, cette résistance aux antibiotiques devient un phénomène de plus en plus problématique. Par exemple, aux États-Unis, on rapporte qu'il y a chaque année environ 2 049 000 personnes infectées par des bactéries résistantes aux antibiotiques et que 23 000 en décèdent. Sur les 1 200 000 infections causées par *Salmonella*, environ 100 000 seraient des cas de résistance aux antibiotiques et coûteraient 365 000 000\$ en frais médicaux par année uniquement pour cette bactérie.²

L'utilisation d'antibiotiques à grande échelle a accéléré l'apparition de résistance chez un grand nombre d'espèces bactériennes (Figure 1). La résistance aux antibiotiques peut aussi évoluer vers une multirésistance, c'est-à-dire une même bactérie résistante à plusieurs antibiotiques, qui se résume par l'acronyme « *ESKAPE* » pour désigner les organismes *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*³ Certaines souches d'*Actinobacter* sont même résistantes à tous les antibiotiques actuellement disponibles.⁴

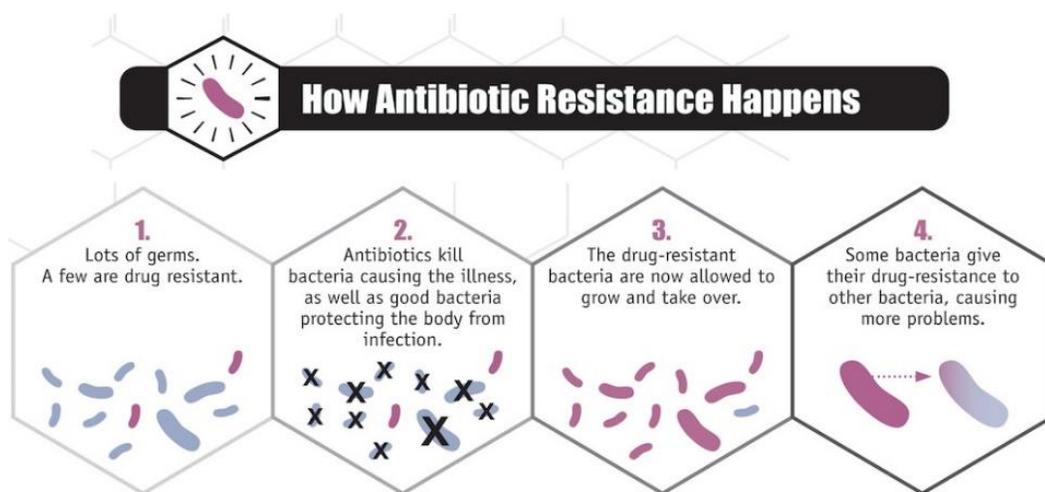


Figure 1. Processus de sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques.²

Cependant la résistance aux antibiotiques est très ancienne. Répertoriée il y a plus de 30 000 ans, elle est même un phénomène naturel très répandu dans l'environnement.⁵ Il existe plusieurs méthodes pour acquérir un gène de résistance à un antibiotique dans le chromosome d'une bactérie (Figure 2). Ces dernières peuvent donc incorporer du matériel génétique libre contenant le gène de résistance, comme un brin d'ADN à l'extérieur de la cellule, dans leur chromosome. Ce phénomène s'appelle la transformation. Certains gènes sont transmis suite à une infection par bactériophage (la transduction), ou encore par une autre bactérie à l'aide d'un plasmide (la conjugaison). Finalement, les mutations génétiques jouent aussi un rôle dans l'apparition de la résistance.⁶

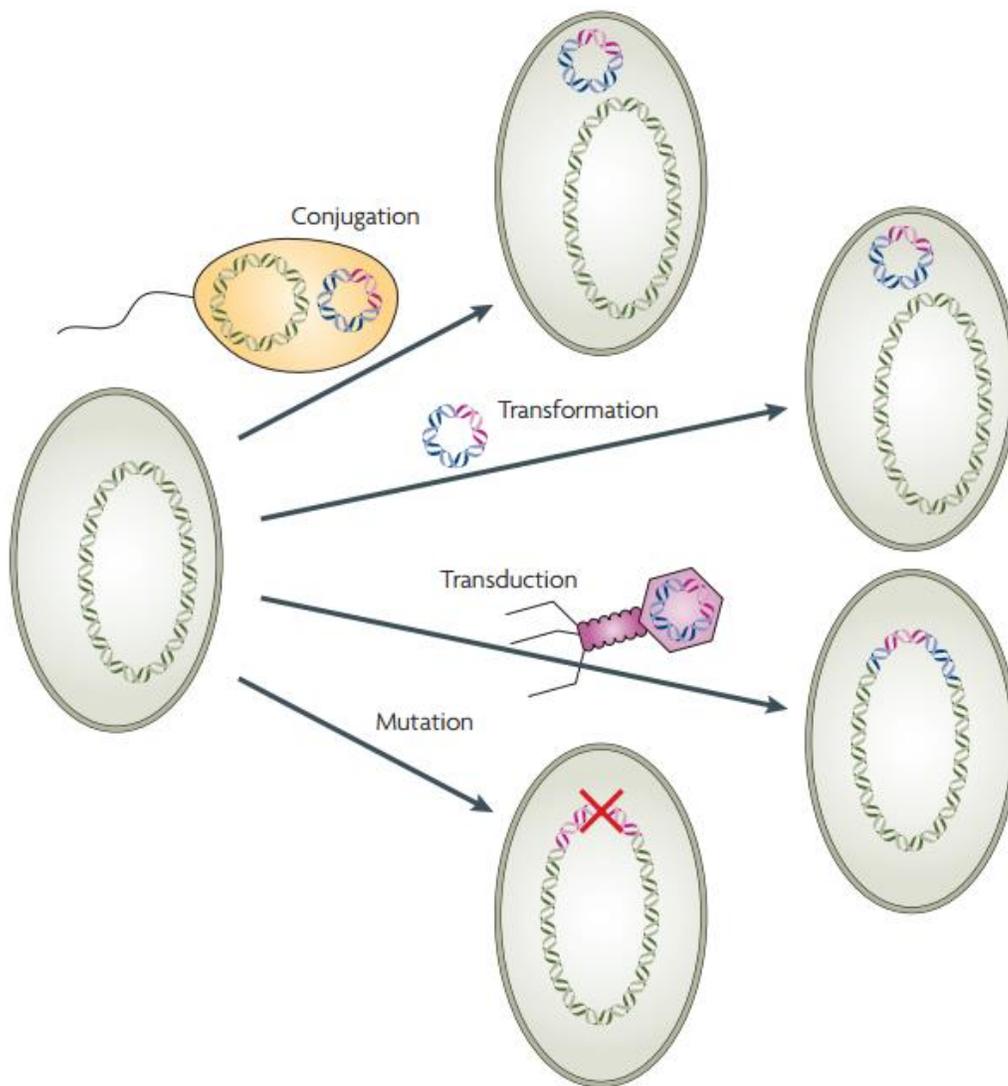


Figure 2. L'acquisition d'un gène de résistance à un antibiotique par les bactéries.⁷

Les stratégies exploitées par les bactéries et les mécanismes de résistance les plus fréquents sont maintenant bien compris (Figure 3).⁸ Parmi les stratégies les plus utilisées par les bactéries pour résister à un agent antibactérien on retrouve : 1) la destruction ou modification chimique de l'antibiotique, comme l'hydrolyse de la pénicilline par la β -lactamase; 2) la modification de la protéine cible, comme une mutation du gène RpsL, codant pour la sous-unité 30S ribosomales, qui confère une résistance à la streptomycine; 3) la modification de la perméabilité membranaire ou augmentation de l'efflux comme les pompes à efflux tel que la pompe AcrAB-ToiC; 4) la surproduction de la cible et 5) la mise en place de voies métaboliques alternatives.^{6, 9}

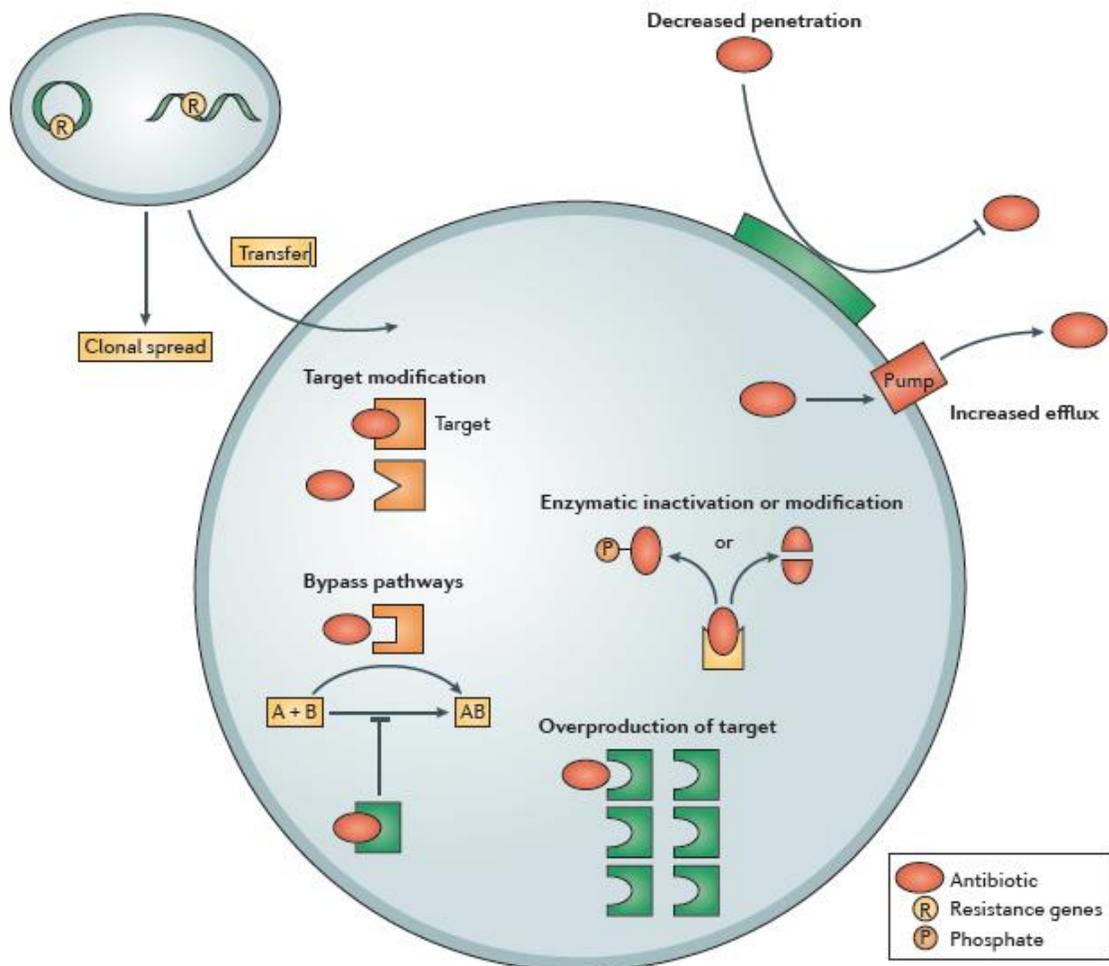


Figure 3. Les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries.⁷

1.2 Développement d'un antibiotique

Les antibiotiques, comme tout autre médicament, doivent passer par le processus de découverte de médicament. Ce processus peut s'étendre de 10 à 15 ans pour qu'une seule molécule sur environ 10 000 composés potentiels ne puisse partir du laboratoire jusqu'à la vente, en passant par de nombreuses phases cliniques, avec un coût moyen de 1,2 milliard de dollars pour réaliser ce processus (Figure 4).¹⁰

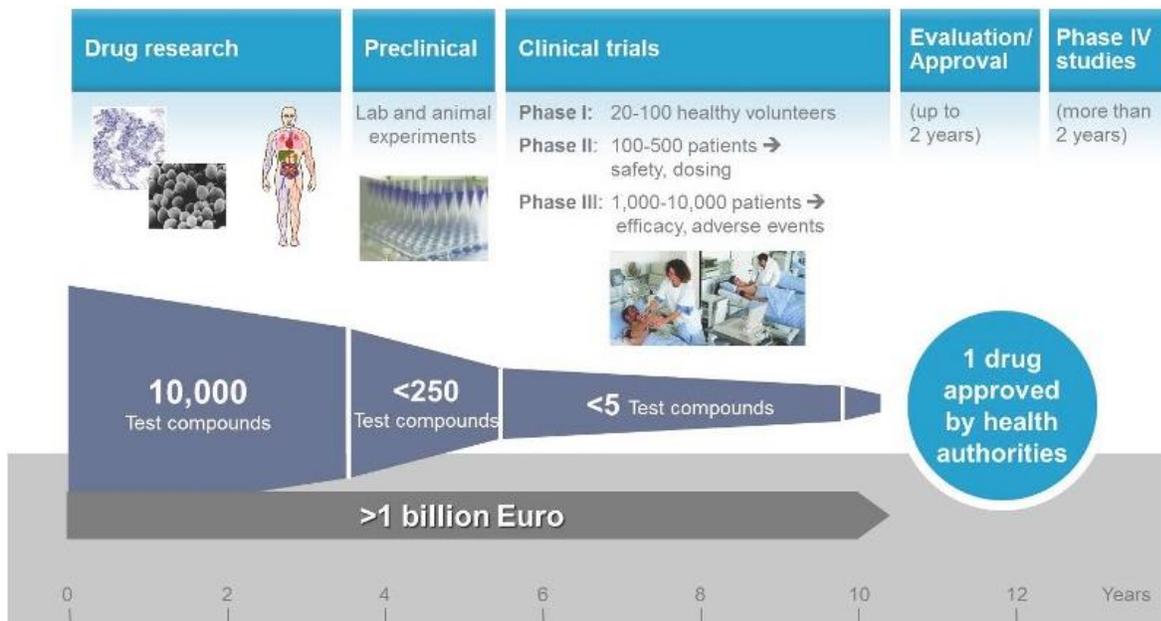


Figure 4. Processus de découverte d'un nouveau médicament.¹¹

Cependant, après des millions d'années d'évolution à s'adapter à divers environnements et à se battre contre d'autres microorganismes pour leur survie et l'occupation d'un territoire, les bactéries sont passées maîtres dans l'art de développer une résistance face à un agent chimique. Il n'est donc pas surprenant qu'il soit beaucoup plus rapide pour une bactérie de développer une résistance à un antibiotique que d'en développer de nouveaux (Figure 5). Même que certaines résistances sont apparues la même année que celle de l'introduction de l'antibiotique, comme ce fut le cas pour la fluoroquinone lévofloxacine (Lеваquin) et l'oxazolidinone linézolide (Zyvoxam).

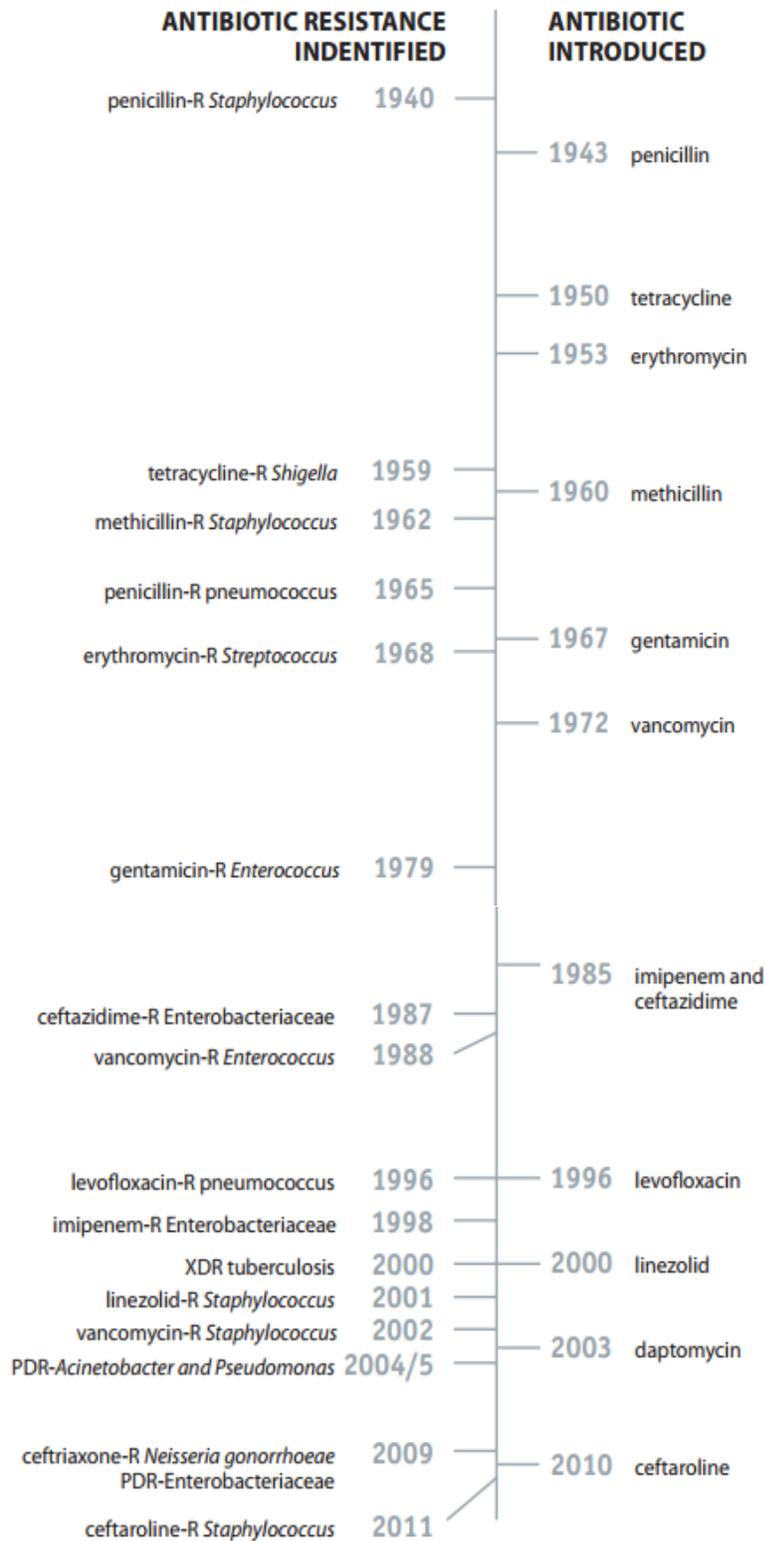


Figure 5. Découverte de la résistance aux antibiotiques après leur introduction.²

1.3 Les peptides antimicrobiens

Cette situation a mis en évidence l'urgence de développer de nouveaux agents antibactériens qui agissent via des modes d'action innovateurs. Pour contourner le problème de la résistance aux antibiotiques présentement disponibles, les efforts de plusieurs chercheurs pour développer de nouveaux agents antibactériens se sont tournés vers des cibles bactériennes encore "inexploitées".¹² La génomique bactérienne a permis d'identifier un grand nombre de nouvelles cibles antibactériennes prometteuses, mais le portfolio d'agents antibactériens avec un nouveau mode d'action en développement clinique demeure très mince.¹³ D'un autre côté, les produits naturels ont toujours été une source importante pour la découverte de nouveaux antibiotiques et l'étude des agents antimicrobiens produits par les insectes, plantes, champignons, bactéries et autres demeurent une stratégie très intéressante.

La majorité des bactéries produisent des peptides antimicrobiens connus sous le nom de bactériocines.¹⁴ Il a été démontré que près de 90% des bactéries produisent au moins une bactériocine.^{15, 16} Ces molécules servent aux bactéries qui les produisent à prévenir et limiter la croissance d'autres espèces de bactéries qui voudraient coloniser leur environnement. Faisant partie d'une guerre chimique impitoyable entre bactéries, les bactériocines possèdent une diversité importante de modes d'action. De plus, certaines bactériocines possèdent un spectre d'activité très large par exemple sur plusieurs bactéries Gram négatives tandis que d'autres possèdent un spectre très étroit et même spécifique par exemple contre une bactérie de la même espèce, mais d'une souche différente.¹⁷ En se basant sur leur importante diversité structurale, leurs différents modes d'action et leur grande variété de spectres d'activité, les bactériocines représentent une classe de peptides antimicrobiens extrêmement intéressante pour le développement de nouveaux agents antibactériens pour des applications en santé humaine, vétérinaire et conservation des aliments.¹⁸

1.4 Classes et modes d'action des bactériocines

Les bactériocines, ou encore « *antimicrobial peptides* » (AMPs), sont actuellement classées selon leur structure et le type de bactéries qui les produisent. La classification des bactériocines évolue avec nos connaissances sur ces dernières. La classification présentée

ici est une version adaptée de Cotter et *al.* (2005).¹⁴ Les bactériocines produites par les Gram positifs sont réparties dans 4 différentes classes :

- 1) la classe I qui réunit les lantibiotiques;¹⁹
- 2) la classe II qui regroupe les bactériocines thermostables sous quatre sous-classes :
 - Ila (anti-Listéria ou «*pediocin-like*»),²⁰⁻²⁵
 - Ilb (dimère),²⁶
 - Ilc (autres peptides thermostables),²⁷
 - Ild (linéaires, non modifiés et non «*pediocin-like*»);
- 3) la classe III qui contient les bactériocines thermosensibles;²⁸
- 4) la classe IV où on retrouve les bactériocines complexes.^{29, 30}

Les bactériocines produites par les Gram négatifs sont beaucoup moins connues. Il n'existe seulement que deux classes pour le moment, dont les colicines et les microcines.

1.4.1 Classe I – Acides aminés non-naturels

Cette classe comprend les bactériocines avec des acides aminés lanthionines (Figure 6). Cette dernière étant composée de deux résidus alanine liés par un pont thioéther sur leur atome de carbone β , ce qui a pour effet d'induire un cycle dans la structure du peptide et de leur apporter une résistance à la lyse enzymatique.³¹ Ces derniers sont formés post-traductionnellement, c'est-à-dire que la bactériocine subit des modifications enzymatiques après sa synthèse par le ribosome. Cette classe est aussi appelée la classe des lantibiotiques pour «antibiotique comportant une lanthionine»³², car la majorité des peptides de cette classe ont une activité antibactérienne.³³

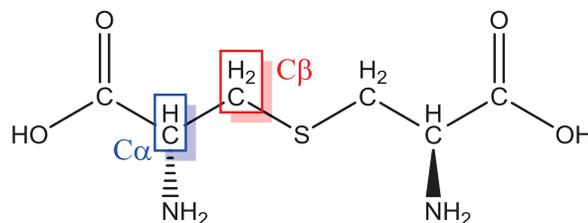


Figure 6. La lanthionine.

De plus, cette classe regroupe d'autres acides aminés rares tels que la didéhydroalanine (Dha), didéhydrobutyrine (Dhb), oxopropionyl (OPr), oxobutyryl (OBu), dihydroxyproline (HPro) et bien d'autres (Figure 7).³⁴

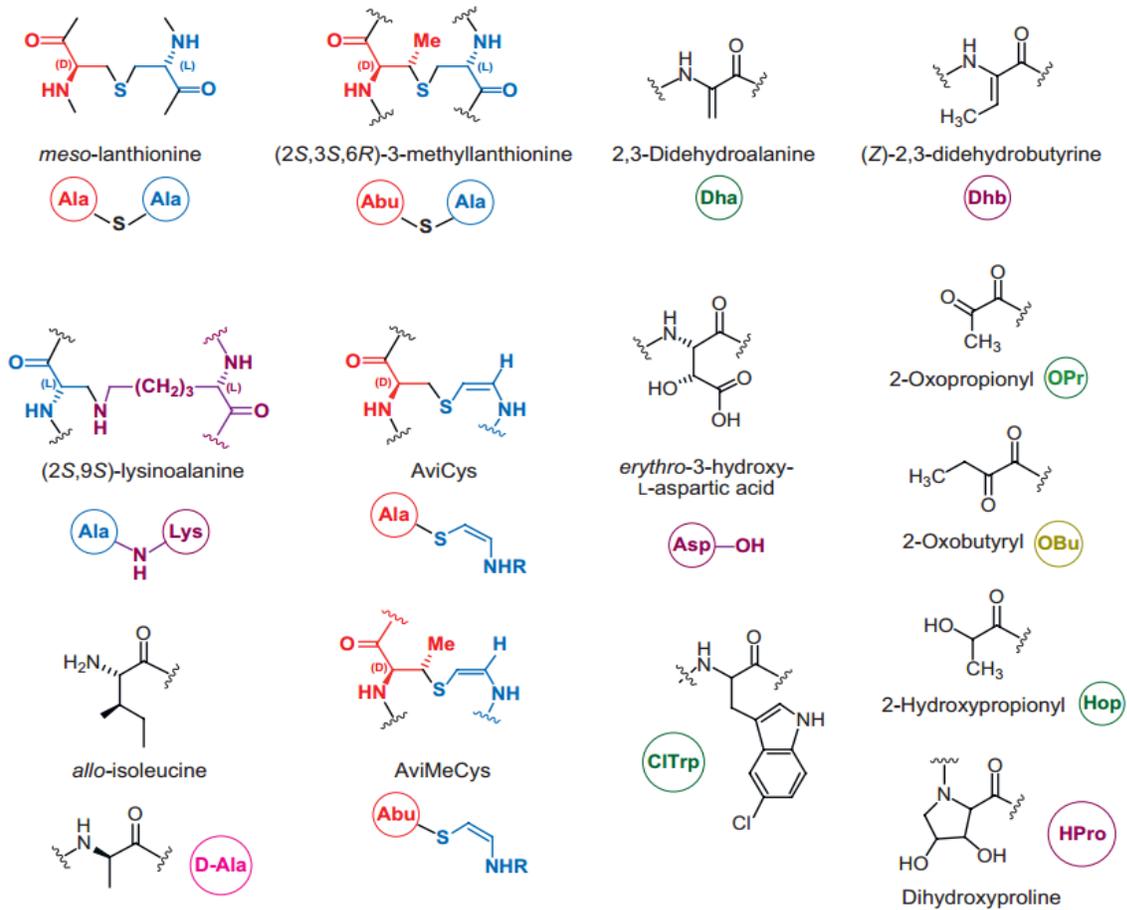


Figure 7. Modifications post-traductionnelles pour la famille des lantibiotiques.³⁴

Les lantibiotiques sont classés en trois classes I, II et III selon le type d'enzymes utilisés pour la maturation post-traductionnelle des peptides.³⁴ Un des plus beaux exemples de bactériocines de la classe I est certainement la nisine. Ce peptide possède des modes d'action très intéressants et efficaces (Figure 8). La nisine a été utilisée comme alternative sécuritaire aux produits chimiques comme agent de conservation dans la nourriture dans 50 pays pendant 40 ans sans développement apparent de résistance naturelle.³⁵

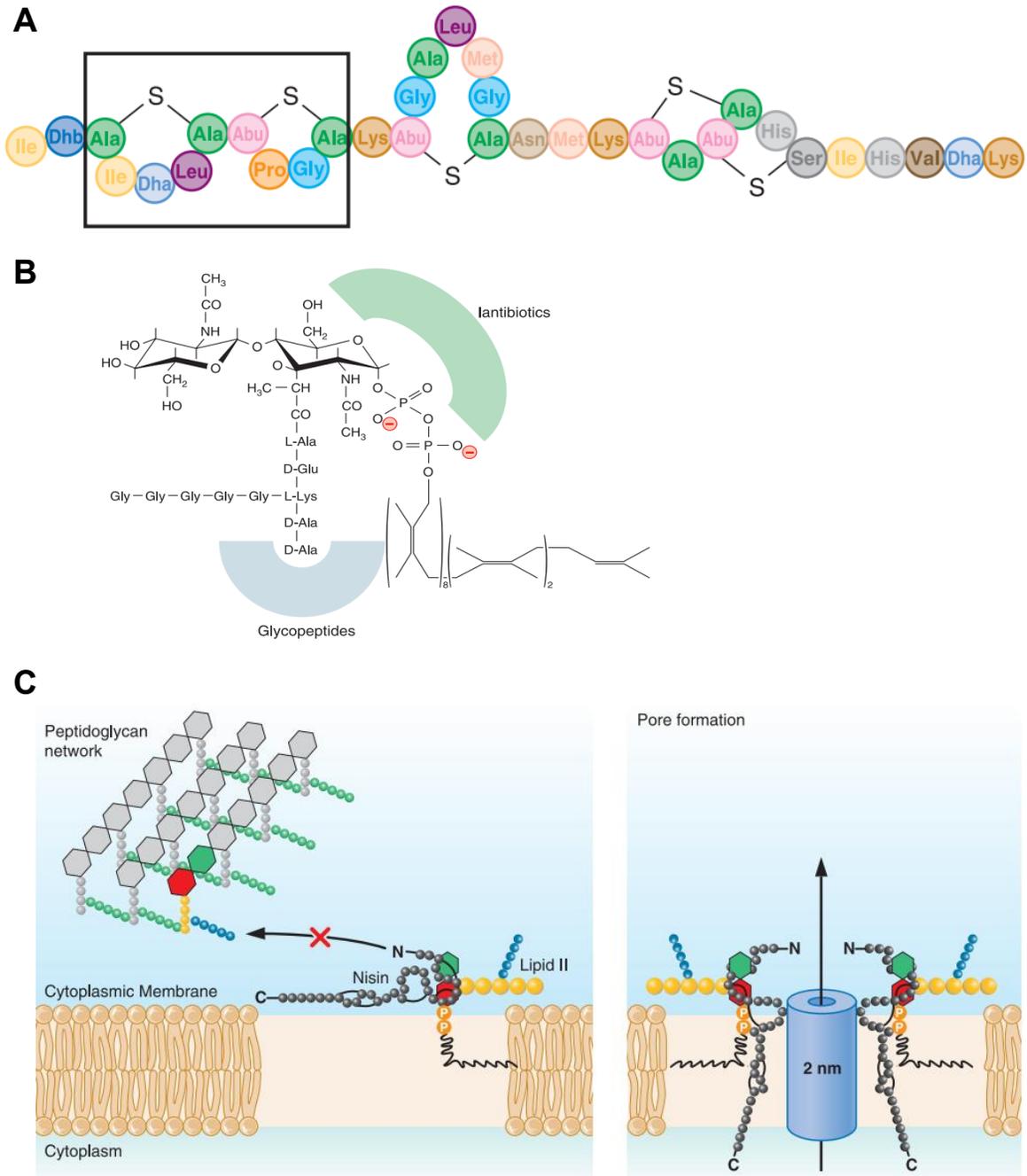


Figure 8. (A) La nisine dont le motif de liaison au Lipide II encadré. (B) Le Lipide II et son site de liaison par les lantibiotiques. (C) Les modes d'action de la nisine. La nisine forme un complexe sociométrique avec le Lipide II qui génère deux phénomènes : le précurseur de la paroi cellulaire n'est plus apte à s'incorporer pour l'agrandissement du peptidoglycane (gauche); le complexe N-terminal de carbohydrate-phosphate du Lipide II permet au C-terminal de la nisine de s'insérer dans la membrane et ainsi former des pores (droite).³⁶

1.4.2 Classe II – Acides aminés naturels (<10 kda)

Cette classe des bactériocines comprend les thermostables, car la seule modification post-traductionnelle est la cyclisation soit par formation de ponts disulfures ou de lien amide, ce qui a pour effet de stabiliser la structure. La classe II comprend seulement de petits peptides soit moins de 10 kDa (Tableau 1; voir annexe I pour les codes des acides aminés). Cette classe est elle aussi subdivisée en sous-classes dont la classe IIa, IIb, IIc et IId.¹⁴

Tableau 1. L'alignement des séquences matures des bactériocines de classe IIa. Les cystéines soulignées forment des ponts disulfures.³⁷

	1	10	20	30	40
Mesentericin Y105	KYYGNGVH	CTKSGC	SVNWGE	AASAGI	HRLANGGNGFW
Leucocin A	KYYGNGVH	CTKSGC	SVNWGE	AFSAGV	HRLANGGNGFW
Leucocin C	KNYGNGVH	CTKKGC	SVDWGY	AWTNI	ANNSVMNGLTGGNAGWHN
Mundticin	KYYGNGVS	CNKKGC	SVDWGA	IIGI	IGNNSAANLATGGAAGWSK
Mundticin KS	KYYGNGVS	CNKKGC	SVDWGA	IIGI	IGNNSAANLATGGAAGWSK
Sakacin P	KYYGNGVH	CGKHS	CTVDWGT	AIGN	IGNNAAANWATGWNAGG
Curvacin A	ARSYNGVY	CNNKCC	WVNRGE	ATQSI	IIGMI SGWASGLAGM
Piscicolin 126	KYYGNGVS	CNKNCC	TVDWSKA	IIGI	IGNNAAANLTTGGAAGWNKG
Carnobacteriocin B1	AISYNGVY	CNKECC	WVNKAENKQ	AITG	IIVIGGWASSLAGMGH
Carnobacteriocin B2	VNYGNGVS	CSKTKC	SVNWGQA	AFQERY	TAGINSFVSGVASGAGSIGRRP
Bavaricin MN	TKYYGNGVY	CNSKCC	WVDWGA	AGGIG	QTVVxGWLGGAIIPGK
Bacteriocin 31	ATYYGNGLY	CNKQCC	WVDWNKA	SREIG	KIIVNGWVQHGPWAPR
Enterocin P	ATRSYNGVY	CNNSKC	WVNWGE	AKENI	IAGIVISGWASGLAGMGH
Bifidocin B	KYYGNGVT	CGLHDC	RVDRGKA	TCGI	INNGGMWGDIG
Sakacin G	KYYGNGVS	CNSHGC	SVNWGQA	AWTC	GVNHLANGGHGGVC
Pediocin PA-1	KYYGNGVT	CGKHS	SVDWGA	ATT	CIINNGAMAWATGGHQGNHCC
Coagulin	KYYGNGVT	CGKHS	SVDWGA	ATT	CIINNGAMAWATGGHQGTHCC
Enterocin A	TTHSGKYYGNGVY	CTKNCC	TVDWAKA	TT	CIAGMSIGGFLGGAIPGKC
Divercin V41	TKYYGNGVY	CNSKCC	WVDWGA	ASGCI	IGQTVVGGWLGGAIIPGKC
Plantaricin 423	KYYGNGVT	CGKHS	SVNWGQA	AFSC	SVSHLANFVGHGKC
Plantaricin C19	KYYGNGLS	CSKKGCC	TVNWGQA	AFSC	GVNRVATAGHGKx
Listeriocin 743A	KSYGNGVH	CNKKCC	WVDWGA	AI	STIGNNSAANWATGGAAGWSK
Sakacin 5X	KYYGNGLS	CNKSGC	SVDWSKA	AI	SIGNNAVANLTTGGAAGWSK
Lactococcin MMFII	TSYGNGVH	CNKSKC	WIDVSE	LETYK	AGTVSNPKDILW
Bifidocin B	KYYHNGVT	CGLHDD	CRVDRGKA	TCGI	INNGGMWGDIG
Consensus	YYGNGV	C	C V W G A	I	

1.4.2.1 Classe IIa

La sous-classe IIa est plus connue sous le nom de la classe des pédiocines ou encore la classe anti-listéria, car elle porte la séquence consensus YGNG(V/L) du côté N-terminal du peptide, ou encore la « *pediocin box* », qui est responsable de l'activité contre les souches de *Listeria*, et elle comprend au moins un pont disulfure.^{37, 38} Les peptides de la

classe IIa sont majoritairement des peptides des « *lactic acid bacteria* », LAB.²¹ Elles sont produites par plusieurs bactéries Gram positif et ont démontré un potentiel dans le domaine alimentaire comme agent de conservation et certaines applications biomédicales.³⁷

À ce jour, la structure tridimensionnelle de cette sous-classe a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la leucocine A,³⁹ sakacine P,⁴⁰ carnobacteriocine B2⁴¹ et la curvacine A (Figure 9).⁴² Cependant, la structure de la bactériocine qui porte le nom de cette classe, la pédiocine PA-1, n'a pas encore été déterminée. Une étude par simulation bio-informatique de la pédiocine PA-1 dans le trifluoroéthanol (TFE), un solvant qui a pour propriété de simuler la membrane bactérienne, a démontré une structure très similaire à la classe IIa.²¹ En effet, il a été démontré que cette classe est désordonnée dans l'eau, mais structurée lorsqu'elle est en présence d'un milieu hydrophobe comme les membranes des parois bactériennes.^{39, 40, 42, 43}

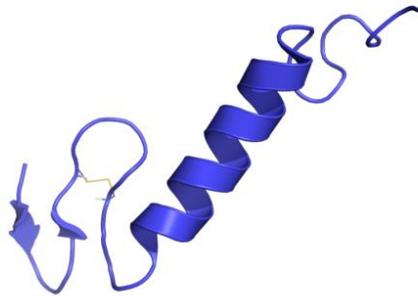


Figure 9. Structure tridimensionnelle à l'intérieur de micelles déterminée par RMN de la Sakacine P en bleu avec le pont disulfure en jaune. La partie N-terminale très conservée comportant la « *pediocin box* », un pont disulfure et un feuillet β . L'hélice α en C-terminal est responsable de l'activité par formation de pores dans les membranes. PDB:1OG7

La classe IIa utilise la protéine transmembranaire de perméase du mannose comme récepteur pour la reconnaissance cellulaire^{44, 45} pour ensuite pénétrer la membrane et former un pore perméable aux ions de potassium, acides aminés et d'autres petites molécules de souches sensibles (Figure 10).^{46, 47}

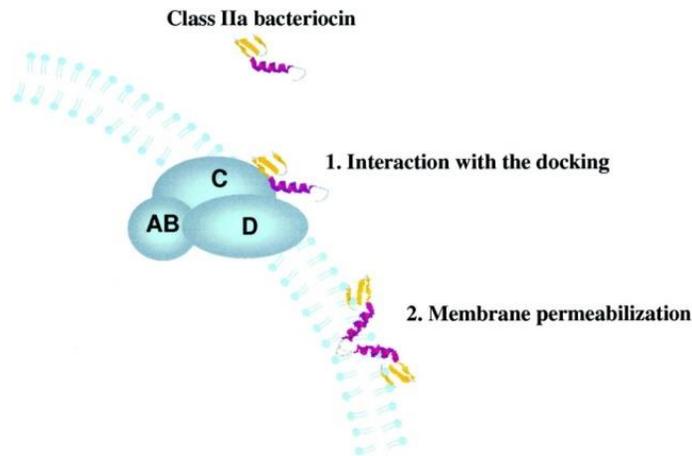


Figure 10. Représentation schématique des deux étapes impliquées dans le mode d'action proposé pour la classe IIa des bactériocines.³⁷

1.4.2.2 Classe IIb

Cette classe regroupe les bactériocines comprenant deux unités peptidiques différentes. Ils ont une structure et un mode d'action similaires à ceux de la classe IIa, c'est-à-dire qu'ils forment des hélices α transmembranaires qui s'assemblent pour former des pores dans la membrane de la cellule (Figure 11). Pour une activité optimale, les sous unités α et β doivent se retrouver en quantité équivalente dans la membrane.⁴⁸⁻⁵¹

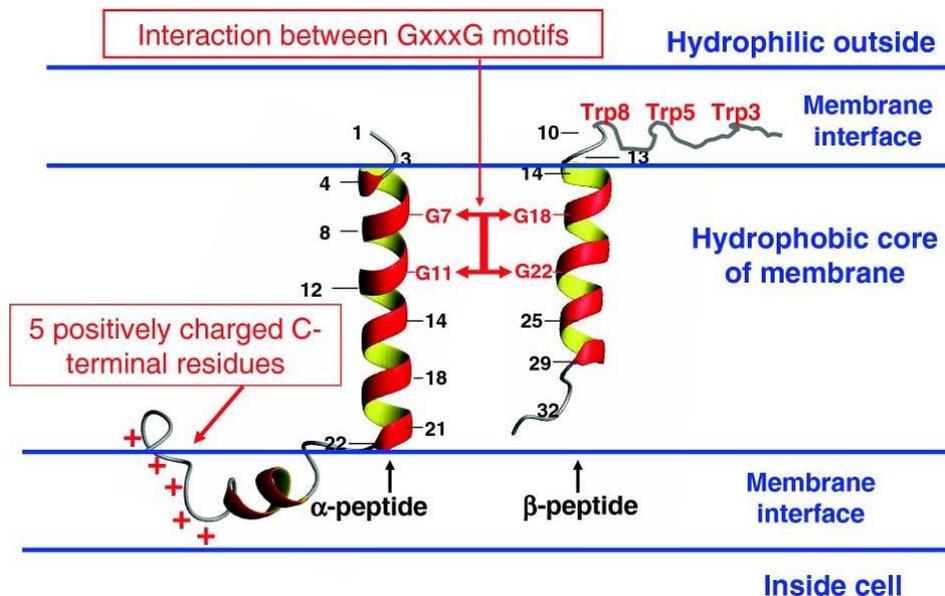


Figure 11. Schéma du modèle de la lactococcine G et son orientation dans la membrane des cellules visées. Les deux peptides interagissent à l'aide du motif GxxxG de chaque

peptide, formant une hélice transmembranaire. La terminaison C-terminale flexible du peptide α est positivement chargée, ce qui lui permet d'être ancrée du côté interne de la cellule qui est chargée négativement. La section N-terminale du peptide β reste près de la surface extérieure de la membrane.²⁶

1.4.2.3 Classe IIc

La classe IIc ou encore la classe des bactériocines circulaires comporte uniquement les bactériocines cycliques du N-terminal au C-terminal, tête à queue, avec un lien covalent (Figure 12). Cette modification post-traductionnelle diminue l'entropie conformationnelle du peptide désordonné pour stabiliser la conformation bioactive, ainsi que la plage de température viable et augmente la résistance à la lyse enzymatique en éliminant les sites accessibles aux exopeptidases.⁵²

Cette classe de bactériocines fait référence à la classe IIc,¹⁴ cependant, puisque cette classe ne subit pas de modification post-traductionnelle, certains groupes de recherche suggèrent de la transférer dans une classe à part et non dans un sous-groupe.⁵²

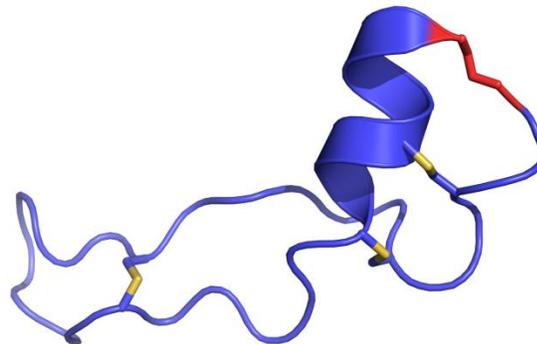


Figure 12. Structure tridimensionnelle de la subtilosine A en bleu déterminée par RMN en solution. Les ponts thioéther du soufre des cystéines et du carbone α des résidus de phénylalanine ou de thréonine en jaune et la liaison covalente entre le N-term et le C-term en rouge. Malgré la cyclisation tête à queue, certains groupes de recherche classent ce peptide dans la classe I des bactériocines en raison de ses modifications post-traductionnelles pour la formation des ponts thioéther et de sa petite taille comparée aux autres de sa classe. Cependant, les ponts thioéthers de la classe I sont sur le carbone β , alors, il est aussi suggéré de créer une nouvelle classe de bactériocine pour les peptides comme la subtilosine.⁵³ PDB : 1PXQ

Comme la majorité des autres bactériocines, la grande majorité des peptides de cette classe affecte également la perméabilité membranaire. Les modes d'action de la CcIA,⁵⁴ entéroccine AS-48,⁵⁵ gasséricine⁵⁶ et la subtilosine A⁵⁷ ont été étudiés et les résultats obtenus ont démontré cette perméabilité d'ions à travers la membrane des cellules cibles. Par exemple, l'insertion de la AS-48 dans la membrane bactérienne, produit une accumulation de charges à la surface de la membrane, en déstabilisant le potentiel de cette dernière, menant à la formation de pores rendant la membrane perméable (Figure 13).⁵⁵

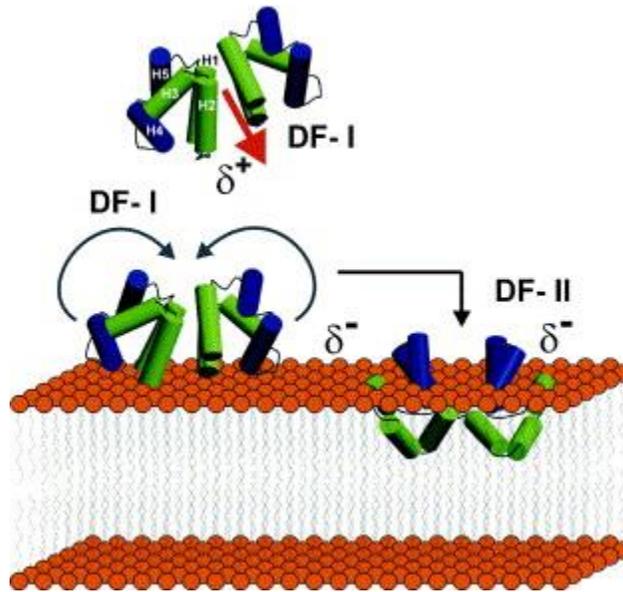


Figure 13. Représentation schématique du mécanisme d'action de la bactériocine AS-48. Le modèle inclut l'approche de la forme dimérique I, DF-I, à la membrane et la transition de DF-I à la forme dimérique II, DF-II, à la surface de la membrane. Les hélices hydrophobes sont représentées en vert et les polaires en bleu. La flèche rouge représente la direction du moment dipolaire intrinsèque de DF-I.⁵⁵

1.4.2.4 Classe IId

La classe IId comprend les bactériocines linéaires seules, non modifiées et non « *pediocin-like* ». Cette sous-classe est elle aussi subdivisée. Elle comprend les bactériocines sécrétion-dépendantes, sans peptide de tête et les bactériocines non subdivisées.

Le type sécrétion-dépendant, *sec*-dépendant, utilise une signalisation différente de la majorité des bactériocines de classe II qui ont un peptide de tête qui se termine par le motif

glycine-glycine, servant à détacher le peptide de tête lors de la maturation et en même temps à l'exporter à travers de la membrane cytoplasmique par une protéine de type transporteur-ABC.⁵⁸ Le N-terminal comporte donc un peptide signal de type *sec* utilisant la voie de signalisation *sec* pour traverser la membrane cytoplasmique sans transporteur spécifique.^{58, 59}

Le type sans peptide de tête, comme son nom l'indique, est pour les bactériocines de classe II qui n'ont pas besoin d'enzyme de maturation. Les peptides de cette classe ont très souvent une activité seule ou en synergie avec un autre peptide. Par exemple, l'entérococcine L50 comporte les deux sous-unités EntL50A et EntL50B qui sont actives en paire, mais aussi individuellement, contrairement à la classe IIb, en plus de ne pas avoir de peptide de tête.⁶⁰

Les bactériocines de classe IIc sont linéaires, « *non-pediocin-like* », avec un peptide de tête *sec*-dépendant, mais transportées par un transporteur de type ABC spécifique.

Cette dernière sous-classe de la classe II comporte donc une grande diversité de structures et de modes d'action. Certaines vont former des pores allant jusqu'à 6,6 nm dans la membrane comme la lacticine Q (Figure 14),⁶¹ et d'autres vont inhiber la division cellulaire en interférant avec la formation de septum tel que la lactococcine 972.⁶²

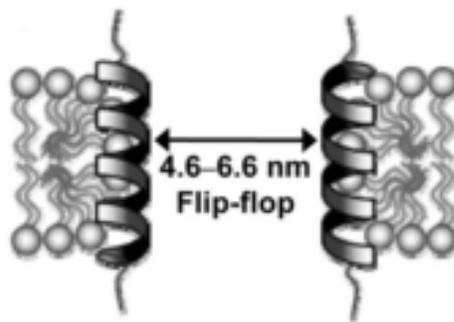


Figure 14. Schéma représentant un pore dans la membrane bactérienne par la lacticine Q. Le diamètre moyen du pore est entre 4,6 et 6,6 nm, résultant à la fuite de protéines.⁶¹

1.4.3 Classe III – Acides aminés naturels (>10 kDa)

Cette classe réunit les bactériocines non modifiées, de grandes tailles soit plus de 10 kDa et thermosensibles qui comportent souvent une activité enzymatique.

1.4.3.1 Classe IIIa

Dans cette sous-classe on retrouve les bactériolysines, c'est-à-dire les protéines ayant une activité lytique sur les bactéries. La lysostaphine est considérée comme la bactériocine modèle de cette classe (Figure 15). Elle a été rapportée dans la littérature par Schindler et Schuhardt en 1964.⁶³ En raison de son activité sur la majorité des staphylocoques, comme *Staphylococcus aureus*, il a été suggéré d'en faire une application médicale.⁶⁴ Elle hydrolyse le peptidoglycane pour ainsi lyser la cellule (Figure 16).⁶⁵

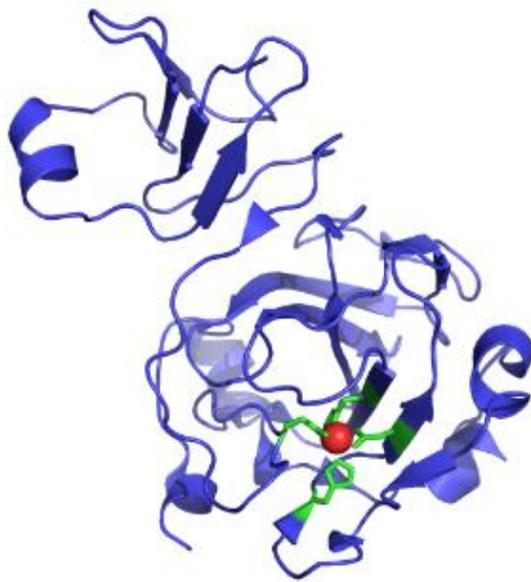


Figure 15. Structure obtenue par cristallographie de la lysostaphine (en bleu) complexée par le zinc (en rouge) et les chaînes latérales des acides aminés qui participent à la liaison avec le zinc (en vert). PDB:1QWY

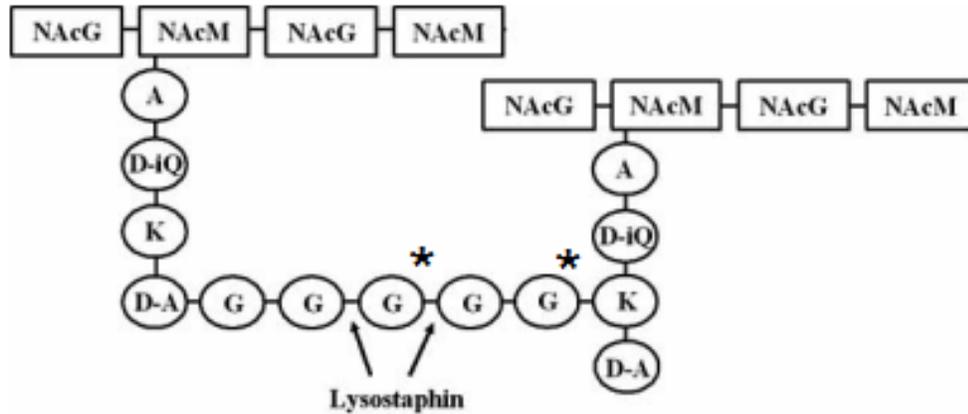


Figure 16. Site d'hydrolyse de la lysostaphine sur le peptidoglycan des staphylocoques. Une mutation des glycines (*) par des sérines apporte une résistance à la lysostaphine. NacG = N-acétylglucosamine; NacM = N-acetylmuramic acide; A = L-alanine; D-iQ = D-isoglutamine; K = L-lysine; D-A = D-alanine; G = glycine.⁶⁵

1.4.3.2 Classe IIIb

Aucune structure n'a encore été déterminée clairement pour cette classe. Il existe seulement des prédictions de structures secondaires impliquant un pont disulfure qui est nécessaire à l'activité. Il a été démontré que la classe IIIb utilise un mode d'action différent de la lyse de la cellule comme dans le cas de la dysgalacticyne, 22 kDa. Le mode d'action est toujours incertain.⁶⁶

1.4.4 Classe IV - Complexes

Les bactériocines de la classe IV sont des bactériocines complexes, c'est-à-dire qu'elles ont subi une ou des modifications post-traductionnelles par addition de sucres ou de lipides. Il a été démontré que leur activité nécessite ces modifications. Un bel exemple est le lien éther entre le sucre et la partie peptidique de la glycocine F qui est essentiel pour conserver la concentration inhibitrice (IC_{50}) de 2 nM (Figure 17).⁶⁷

Les modes d'action de cette classe sont très variés. Par exemple, le mode d'action de la sublancine (Figure 17) est de se lier au canal à ion mécanosensitif MscL pour forcer la conformation ouverte, menant à la fuite des ions et ainsi à la mort cellulaire.⁶⁸

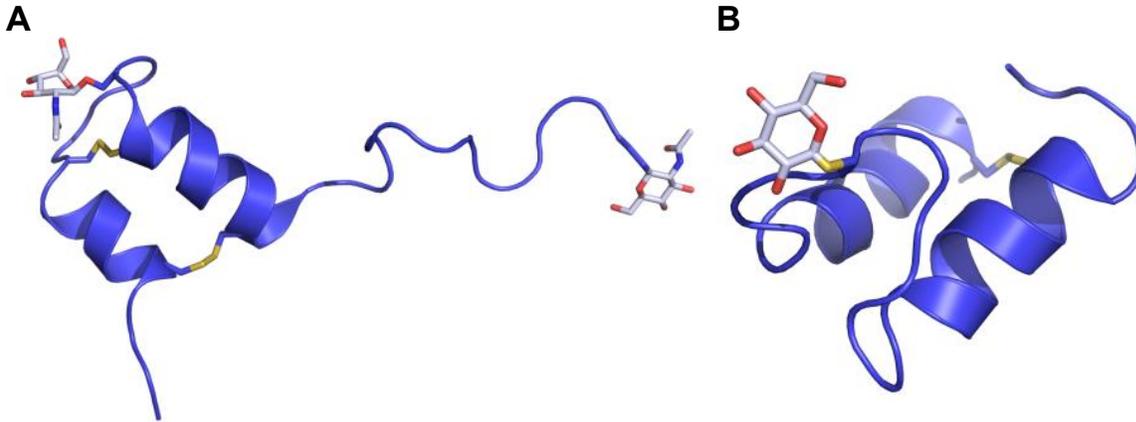


Figure 17. Structure tridimensionnelle de deux peptides de la classe IV. (A) Structure de la glycine F (en bleu) déterminée par RMN en solution avec les sucres de *N*-acétylglucosamine (NAG) (en blanc) dont un est lié à une sérine entre les hélices via un lien éther (oxygène en rouge) et l'autre à une cystéine en C-terminal via un lien thioéther (souffre en jaune). PDB:2KUY. (B) Structure de la Sublancine (en bleu) déterminée par RMN en solution avec un β -D-glucose (en blanc) lié à une cystéine via un lien thioéther (souffre en jaune). PDB:2MIJ.

1.4.5 Les bactériocines de Gram négatif

Les bactériocines produites par les bactéries Gram négatif ont simplement été classées selon leur poids moléculaire soit les bactériocines de poids supérieur pour les colicines et celles de poids inférieur pour les microcines.⁶⁹

1.4.5.1 Les colicines

Les colicines sont des protéines de masse moléculaire variant de 30 à 80 kDa synthétisée en période de stress (Figure 18). Elles sont divisées en deux classes selon leur mode d'importation à l'intérieur des cellules cibles et certaines ne sont pas classées. Les colicines du groupe A sont transportées dans la cellule par le système de protéines Tol constitué des protéines TolA, TolB, TolQ, TolR et Pal à travers la membrane externe. Les colicines du groupe B sont transportées par le système de protéines Ton constitué de TonB, ExbB et ExbD dans la membrane externe.⁷⁰ Les colicines ont trois mécanismes d'actions majoritaires, dont la formation de pores dans la membrane, la dégradation de l'ADN et la dégradation de l'ARN.⁷¹

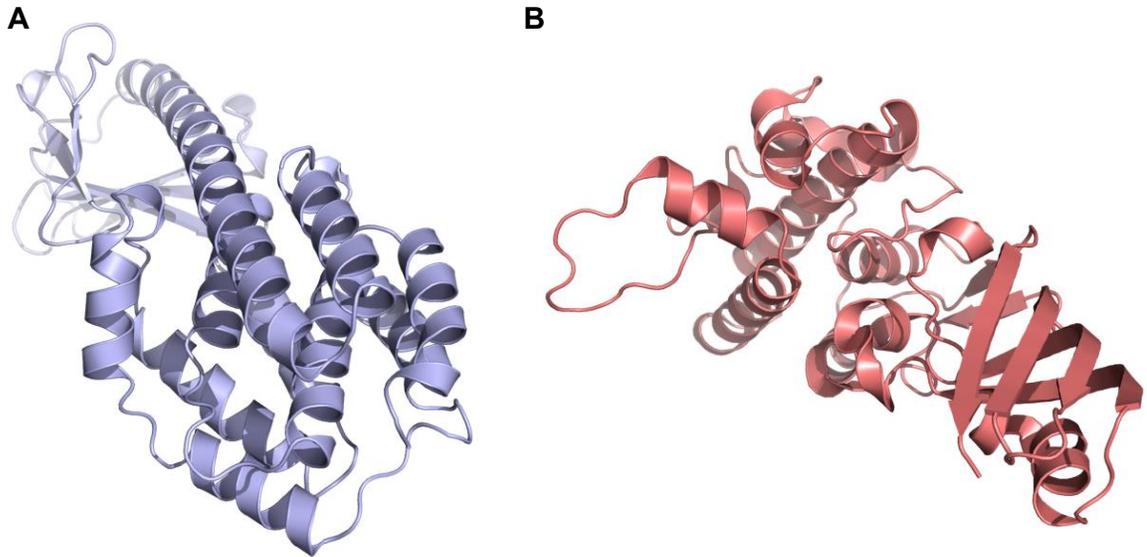


Figure 18. Structure obtenue par cristallographie de colicines. (A) Structure de la colicine N (40 kDa) (en bleu), la plus petite colicine capable de former des pores.⁷² PDB:1A87 (B) Structure de la colicine M (en rouge) qui clive le lien ester phosphate entre le transporteur de lipides (bactoprénol) et le précurseur de muréine.⁷³ PDB :2XMX

1.4.5.2 Les microcines

Contrairement aux autres peptides antimicrobiens, les microcines sont plus difficiles à classées. En plus d'y avoir moins d'individus répertoriés, leurs structures et modes d'action sont très variés (Figure 19). Parmi les modes d'action utilisés par les microcines on retrouve : l'arrêt de la biosynthèse de la méthionine par l'inhibition de l'homosérine-O-transsuccinylase;⁷⁴ l'inhibition de la synthèse de protéines;⁷⁵ l'inhibition de la réplication de l'ADN; l'inhibition du transport de la proline;⁷⁶ la modulation du potentiel électrique transmembranaire empêchant la production d'ATP;⁷⁷ une activité sidérophore, c'est-à-dire chélateur de fer;⁷⁸⁻⁸⁰ et plusieurs autres.⁸¹ Néanmoins, elles ont été classées par le groupe de la Dre Sylvie Rebuffat en classe I et II.⁸² La classe I englobe les petites microcines de 1 à 3 kDa ayant plusieurs modifications post-traductionnelles tandis que la classe II réunit les plus grandes microcines de 4,9 à 8,9 kDa avec pour seules modifications des ponts disulfures ou l'attachement à un domaine chélateur.⁸³

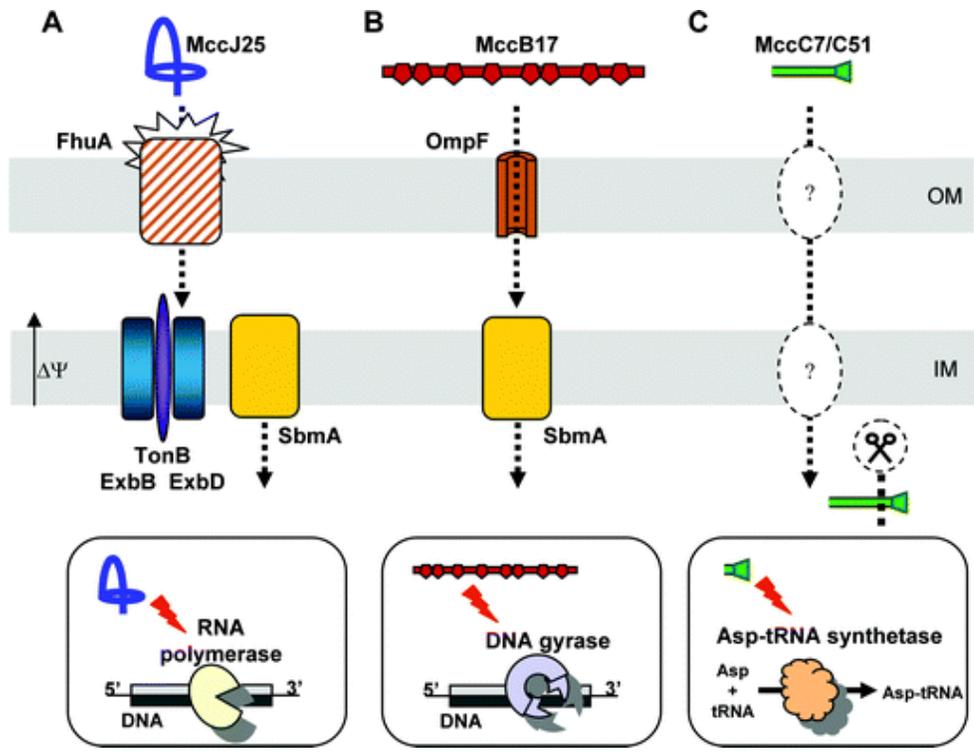


Figure 19. Exemple de mécanismes d'action retrouvés chez les microcines de la classe I. (A) La microcine J25 (MccJ25) est reconnue par le récepteur de haute affinité FhuA sur la membrane extérieure (outer membrane, OM). Le motif structural de reconnaissance est la région "β-hairpin" de la MccJ25. L'incorporation de la MccJ25 dans le cytoplasme à travers la membrane interne (inner membrane, IM) a besoin du complexe protéique TonB/ExbB/ExbD et de la protéine SbmA dans la membrane interne. Une fois dans le cytoplasme, la MccJ25 inhibe la transcription en obstruant le canal secondaire de l'ARN polymérase. (B) La microcine B17 (MccB17) passe au travers de la membrane externe via la porine OmpF. La protéine SbmA est impliquée dans l'internalisation vers le cytoplasme, où la MccB17 va empêcher le super enroulement de l'ADN par l'inhibition de l'ADN gyrase. (C) Les mécanismes impliqués dans l'incorporation de la microcine C7/C51 (MccC7/C51) à travers les membranes sont inconnus. Une enzyme protéolytique dans le cytosol permet l'activation de la MccC7/C51 qui va inhiber la translation en ciblant l'ARNt-aspartyl synthétase.⁸³

1.5 La microcine J25

Parmi toutes les bactériocines qui ont été étudiées, la Microcine J25 (**MccJ25**) a été sélectionnée pour cette étude. La MccJ25 est une bactériocine unique, ayant une structure particulière tout comme son mode d'action. Composée de 21 acides aminés, elle fait partie des peptides lasso ayant une grande résistance à la lyse enzymatique et est active contre plusieurs organismes pathogènes, dont certaines souches d'*Escherichia*, *Salmonella* et *Shigella*. Ces caractéristiques démontrent tout le potentiel de la MccJ25 comme agent de préservation alimentaire.⁸⁴

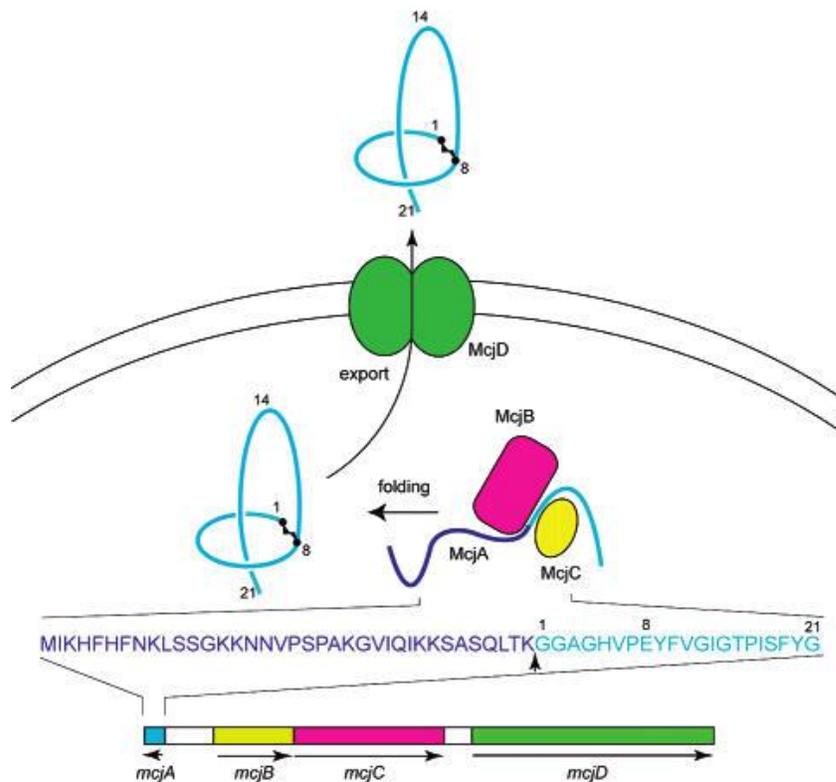


Figure 20. Illustration schématique de la production de la MccJ25 par le plasmide pTUC100 comportant quatre gènes : *mcjA* (bleu), *mcjB* (jaune), *mcjC* (rose), *mcjD* (vert). Les gènes codent pour le précurseur de la MccJ25 (McjA), les enzymes de maturation (McjB et McjC) et la protéine de sécrétion (McjD).⁸⁵

1.5.1 La maturation de la MccJ25

La production de la MccJ25 se fait à l'aide du plasmide pTUC100 de 4,8 kb comportant les quatre gènes *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* et *mcjD*⁸⁵ chez la cellule productrice de la famille des

Enterobacteriaceae (Figure 20).⁸⁶ La production de la MccJ25 est régulée par le début de l'approche de la phase stationnaire et aussi par la concentration en fer dans le milieu.

1.5.1.1 *McjA*

Le gène *mcjA* code pour le peptide *McjA* comportant 58 acides aminés, le précurseur de la MccJ25. La microcine J25 représente les acides aminés de la glycine 37 à la glycine 58 de *McjA*. Le peptide de tête, ou encore peptide guide de 37 acides aminés, est très important pour la maturation et l'activité du peptide final, car son absence réduit grandement la production de la MccJ25 mature (Tableau 2).

Tableau 2. Caractérisation par HPLC de la production de la MccJ25 cyclique en fonction de la présence ou non du peptide guide par rapport à la MccJ25 linéaire (I-MccJ25).⁸⁷

Substrats	Enzymes utilisés	Aire sous la courbe des produits (aire sous la courbe HPLC)	
		I-MccJ25	MccJ25
McjA	McjB+McjC	38243	365896
guide + MccJ25	McjB+McjC	n.a.	2330
I-MccJ25	McjB+McjC	n.a.	748

* Plus le chiffre est élevé, plus la production du produit est importante.

1.5.1.2 *McjB* et *McjC*

Ces deux enzymes sont absolument nécessaires à la maturation de la MccJ25 (Figure 21). *McjA* arrive premièrement à *McjB*, ou le peptide de tête se fera détacher de la MccJ25 linéaire, puis la *McjC* formera le lien amide pour la cyclisation.

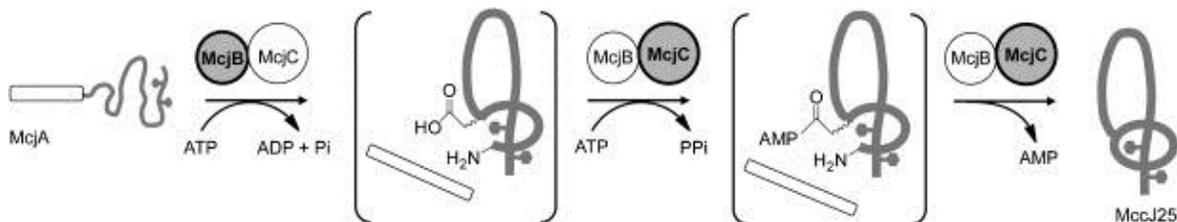


Figure 21. Représentation schématique de la MccJ25 synthétase. Le peptide de tête est représenté par le rectangle vide; l'enzyme fonctionnelle à chaque étape est indiquée en gris.⁸⁷

1.5.1.3 McjD

Cette dernière protéine est un transporteur membranaire de type ABC qui transporte la MccJ25 vers l'extérieur de la cellule à l'aide d'ATP (Figure 22). McjD est donc utile à la fois pour relarguer la MccJ25 vers les autres bactéries, mais aussi comme protéine de résistance à la MccJ25 en exportant constamment cette dernière à l'extérieur de la cellule pour que la concentration à l'intérieur de celle-ci ne soit pas critique.^{88, 89}

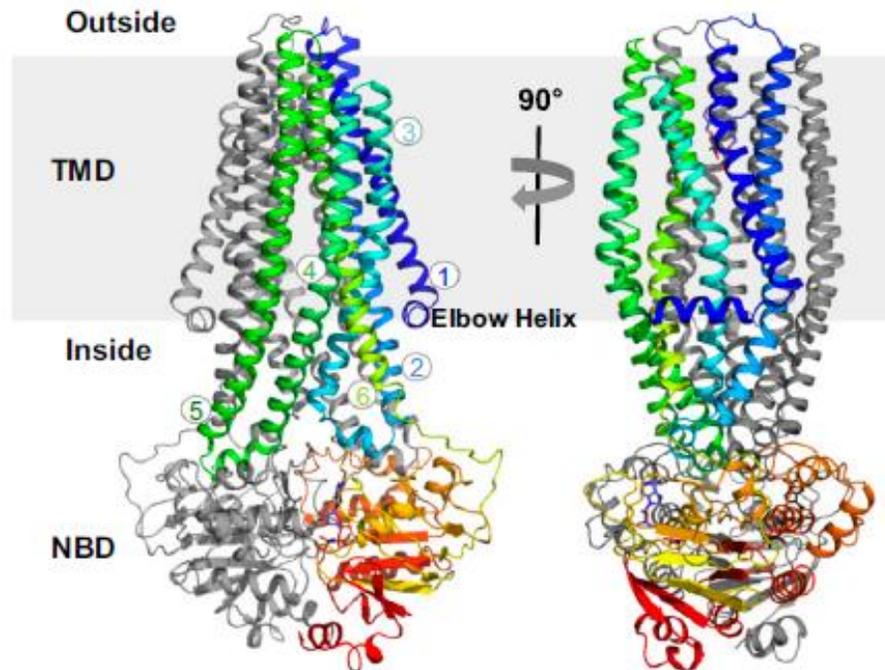


Figure 22. Structure tridimensionnelle de l'homodimer McjD déterminée par diffraction de rayons X et montrée dans le plan de la membrane. La membrane est montrée en gris. Les hélices d'une sous-unité sont numérotées. Les liens AMP-PNP sont indiqués en bâtonnets.⁸⁹ PDB :4PL0

1.5.2 Structure de la MccJ25

La structure de la MccJ25 est caractéristique des peptides lassos (Figure 23). Elle est constituée de la chaîne d'acides aminés GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG. Les huit premiers acides aminés forment un cycle via la formation d'un lien amide entre l'amine libre de la glycine en N-terminal, une fois que le peptide de tête est libéré, et l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique. La partie C-terminale passe au travers de cette boucle et est bloqué par la phénylalanine 19 et la tyrosine 20 qui se trouve de part et d'autre de cette dernière.^{90, 91}

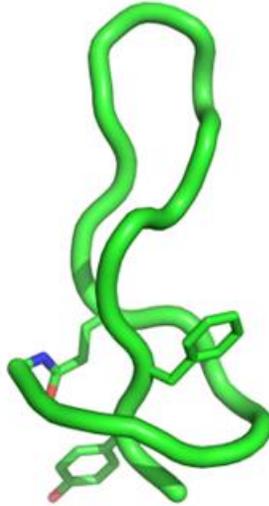


Figure 23. Structure en solution de la MccJ25 déterminée par RMN dont la F19, la Y20 et le pont entre le G1 et E8 représentés en batonnets. PDB:1Q71

Cette structure particulière lui permet une grande rigidité conformationnelle pouvant supporter des grandes températures comme le passage dans un autoclave sans perdre d'activité,⁹² ainsi qu'une grande résistance à la lyse enzymatique.⁹³

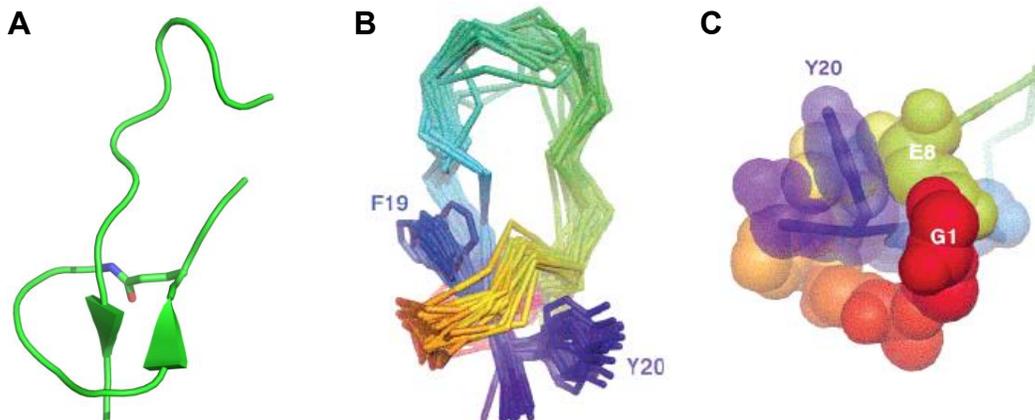


Figure 24. Structure de la micrococcine J25 après traitement à la thermolysine. (A) Structure déterminée par RMN en solution. PDB:1S7P (B) Ensemble de 20 structures calculées à partir de la RMN en solution montrant le squelette du peptide, ainsi que les chaînes latérales E8, F19 et Y20.⁹⁰ (C) L'anneau et la queue en représentation CPK (Corey, Pauling et Koltun) dont les sphères représentent le diamètre des atomes montrant l'encombrement stérique du peptide lasso.⁹⁰

La thermolysine, une endopeptidase, peut couper la MccJ25 (Figure 24). Cependant, la structure qui n'est plus reliée en lasso devient un rotaxane, c'est-à-dire un macrocycle lié mécaniquement à un fragment linéaire qui le traverse de part et d'autre, ne pouvant se dissocier en raison de l'encombrement stérique exercé par le diamètre du macrocycle et les cycles aromatiques de la Phe19 et la Tyr20 dans le cas de la MccJ25.

Comme la cible principale de la MccJ25, l'ARN polymérase, est intracellulaire, cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de la boucle formée par le lasso pour l'incorporation du peptide à l'intérieur des cellules cibles. *In vivo*, ce traitement lui fait perdre toute activité antibactérienne. Par contre, lorsqu'elle est testée *in vitro* avec l'ARN polymérase, elle conserve son activité.⁹⁴ La structure de la MccJ25 lui permet de passer à travers les deux membranes des bactéries à Gram négatifs. Pour entrer à l'intérieur de la cellule cible, la MccJ25 utilise le sidérophore FhuA de la membrane externe (Figures 25 et 26)⁹⁵ et la protéine membranaire SbmA de la membrane interne.⁹⁶

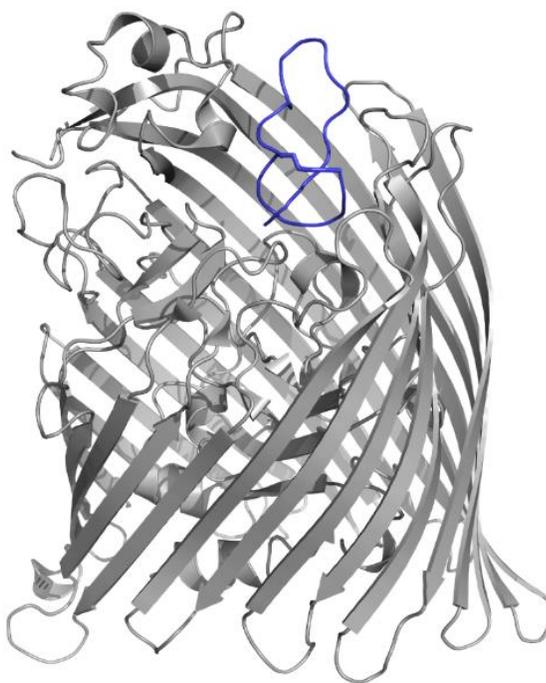


Figure 25. Structure de la liaison de la MccJ25 (bleu) et du récepteur de sidérophore FhuA (gris) chez *E. coli* déterminée par diffraction de rayons X. PDB:4CU4

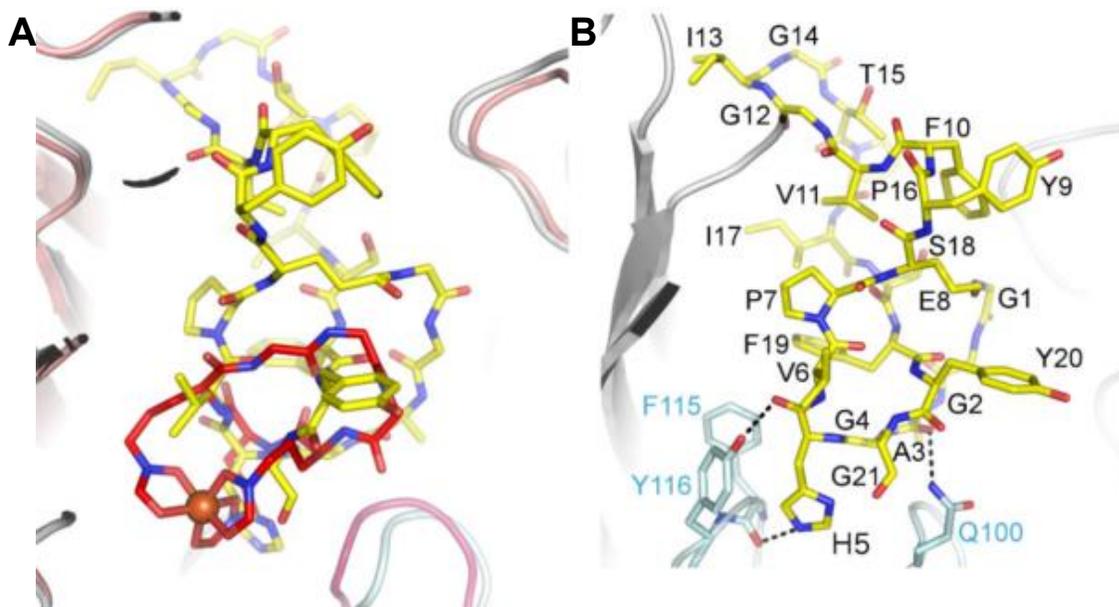


Figure 26. Représentation de l'interaction de la MccJ25 (en jaune) avec FhuA chez *E. coli*. (A) La MccJ25 mime la liaison au ferochrome (bâtonnets rouges et le fer est représenté par une sphère orange). (B) La MccJ25 fait 3 liaisons hydrogènes avec le domaine de liaison.⁹⁷

Il a été récemment démontré que la MccJ25 peut entrer à l'intérieur des cellules cibles indépendamment de FhuA et SbmA en utilisant un peptide perméabilisateur de membrane telle que (KFF)₃K, pouvant ainsi permettre de sensibiliser les souches résistantes à la MccJ25.⁹⁸

1.5.3 Modes d'action de la MccJ25

La MccJ25 agit selon deux modes d'action pour avoir une concentration minimale inhibitrice (CMI) allant jusqu'à 0,007 μM sur les souches les plus sensibles (Tableau 3).⁹¹ Comme décrit précédemment, elle agit sur l'ARN polymérase,⁹⁹ mais aussi sur la chaîne respiratoire de la cellule cible.⁹¹

Tableau 3. Sensibilité de plusieurs souches d'*E. coli* et de *Salmonella* à la MccJ25 par le test de Lawn ou de leur résistance (R).⁹¹

Souches	CMI (µM)	Souches	CMI (µM)
<i>E. coli</i> DH5	0.24	<i>E. coli</i> MC4100 (pPAV01 et pMM73.4)	0.012
<i>E. coli</i> XL-blue	0.12	<i>E. coli</i> EZE100 (MC4100 sbmA::Tn5)	R
<i>E. coli</i> AB1133	0.24	<i>E. coli</i> EZE100 (MC4100 sbmA::Tn5) (pGC01)	R
<i>E. coli</i> MG1655	0.24	<i>E. coli</i> SBG303 (MC4100 fhuA::Tn5)	R
<i>E. coli</i> MC4100	0.12	<i>E. coli</i> SBG303 (MC4100 fhuA::Tn5) (pMM73.4)	R
<i>E. coli</i> AB259	0.48	<i>E. coli</i> SBG231 (AB259 rpoC T931I)	R
<i>E. coli</i> MC4100 tolC::Tn10	0.06	<i>E. coli</i> SBG231 (AB259 rpoC T931I) (pGC01)	R
<i>E. coli</i> MC4100 (pGC01)	0.007	<i>S. newport</i>	0.012
<i>E. coli</i> AB259 (pGC01)	0.007	<i>S. typhimurium</i>	R
<i>E. coli</i> MC4100 (pMM73.4)	0.06	<i>S. typhimurium</i> (pGC01)	0.007

*Les bactéries sont identifiées par leurs genres et espèces puis la souche s'il y a lieu. Les plasmides et les mutations sont entre parenthèses.

1.5.3.1 Inhibition de l'ARN polymérase

Le mode d'action principal de la MccJ25 est l'inhibition de l'ARN polymérase. Il a été démontré que la MccJ25 inhibe la synthèse de l'ARN par obstruction du canal secondaire de l'ARN polymérase. Cette interaction empêche donc le substrat d'atteindre son site d'accès sur l'enzyme tel qu'un « bouchon de liège dans une bouteille » (Figure 27).⁹⁹

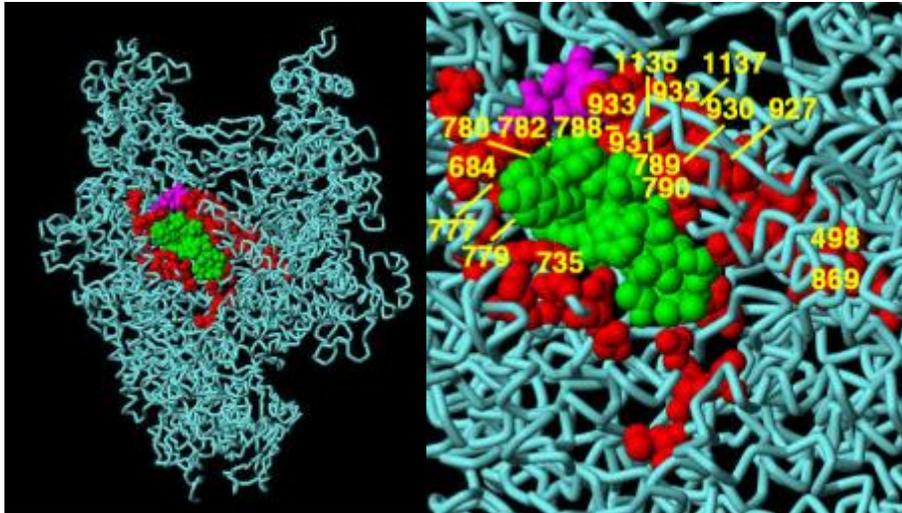


Figure 27. Modèle du complexe de la MccJ25 avec l'ARN polymérase. La MccJ25 (en vert), l'ARN polymérase en tubes blancs et les sites de mutation qui confèrent de la résistance à la MccJ25 (en rouge et rose).⁹⁹

1.5.3.2 Inhibition de la chaîne respiratoire

Le second mode d'action de la MccJ25 est l'inhibition de la consommation d'oxygène qui est nécessaire à la viabilité de la cellule cible induite par le groupement fonctionnel de la Tyr9.¹⁰⁰ Ce processus qui perturbe le potentiel membranaire chez *Salmonella newport* ne se produit pas chez *E. coli* (Figure 28).⁹¹

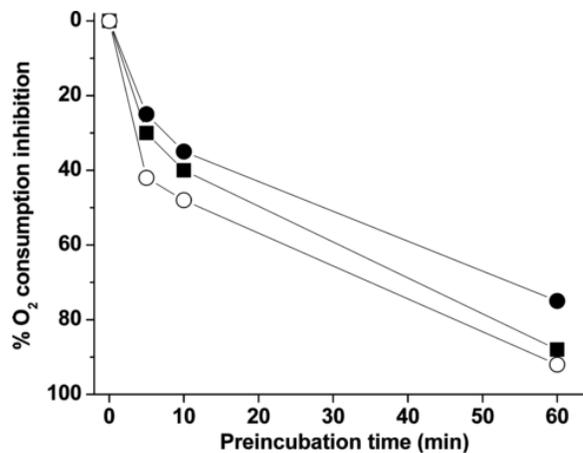
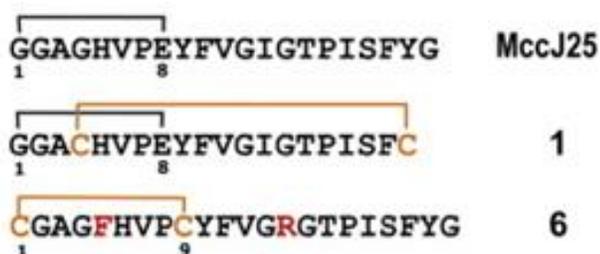


Figure 28. Effet de la MccJ25 sur *S. typhimurium* (pGC01) (points blancs) et de la MccJ25-Th19, la MccJ25 traitée avec la thermolysine, sur *S. typhimurium* (pGC01) (points noirs) et *S. newport* (carrés) sur la consommation d'oxygène.⁹¹

1.5.4 Peptides analogues actifs à la MccJ25

À cause de sa structure très particulière, la synthèse totale de la microcine J25 est un défi de taille. Certains groupes de recherche ont exploré la possibilité de synthétiser des analogues de la MccJ25. Cependant, ils n'ont obtenu qu'une faible activité (>25 µM) comparativement à la MccJ25 native (0,5 µM) pour seulement deux analogues (Tableau 4). Pour l'analogue **1**, la queue peptidique est repliée sur l'anneau sans passer dans ce dernier, et pour l'analogue **6**, le lien amide est remplacé par un pont disulfure pour former l'anneau, ainsi que l'ajouter d'hydrophobicité sur le cycle par une phénylalanine et une charge positive (arginine).¹⁰¹ Ces résultats sont très intéressants et laisse sous-entendre qu'il serait possible avec un design approprié de développer des analogues bioactifs de la McJ25 sans passer par la structure en lasso.

Tableau 4. CMI de certains analogues actifs de la MccJ25 sur différentes souches.⁸⁴



Souches	CMI (µM)		
	MccJ25	1	6
<i>S. newport</i>	0.5 ± 0.05	25 ± 3.0	30 ± 4.0
<i>S. enteritidis</i> PT8	1.5 ± 0.8	80 ± 3.0	—
<i>S. enteritidis</i> ATCC13076	1.8 ± 0.7	—	—
<i>S. enteritidis</i> AFLB 11	2.0 ± 0.6	—	—
<i>S. enteritidis</i> AFLB 41	1.6 ± 1.0	—	—
<i>S. enteritidis</i> AFLB 81	1.7 ± 1.2	—	—
<i>S. typhimurium</i> AFLB 25	2.8 ± 0.8	85 ± 5.2	—
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	—	75 ± 6.5	—
<i>S. heidelberg</i> ATCC 8326	—	83 ± 6.1	—
<i>S. montevideo</i> 20	—	—	—
<i>S. paratyphi</i>	1.5 ± 1.0	—	—
<i>S. choleresius</i> ATCC 10708	1.5 ± 0.6	90 ± 5.7	—
<i>E. coli</i> DH5α	5.0 ± 1.0	—	—
<i>E. coli</i> MC4100	5.0 ± 2.0	—	—

CHAPITRE 2 :
HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

2.1 Hypothèse de travail

Comme la MccJ25 agit via plusieurs modes d'action et possède un large spectre d'activité, elle représente une molécule très attrayante et un excellent point de départ pour le développement de nouveaux agents antibactériens efficaces pouvant être utilisés en santé humaine et animale ou encore comme agent de conservation. Cependant, il est très difficile de la produire en très grande quantité par fermentation et encore plus difficilement par voie chimique. En effet, la structure en lasso est très défavorisée par l'encombrement stérique des « *lock* » aromatiques lors de la formation de la cyclisation entre la glycine 1 et l'acide glutamique 8 lorsque la MccJ25 linéaire est cyclisée en solution (Figure 29).¹⁰²

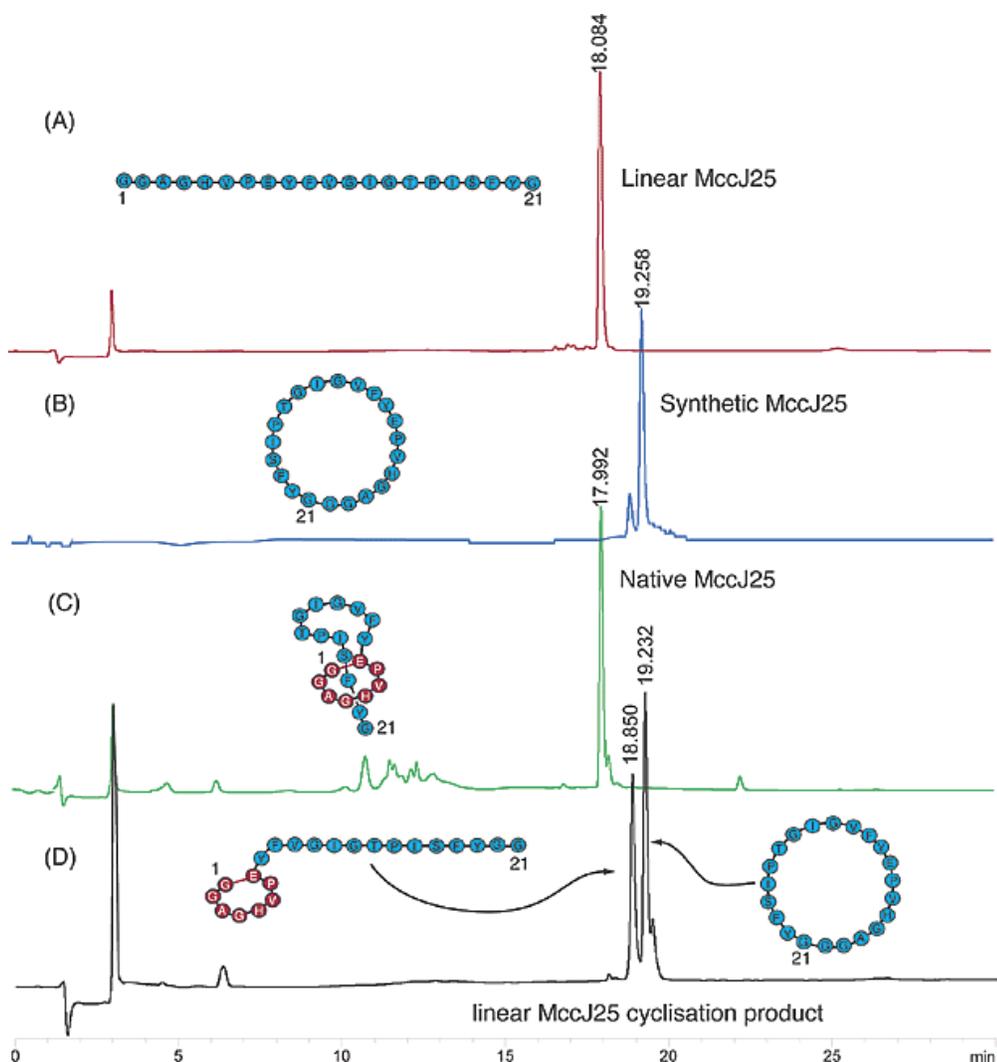


Figure 29. Analyses HPLC de la MccJ25 sous différentes formes. (A) MccJ25 linéaire; (B) cyclisation tête à queue en solution de la MccJ25 linéaire synthétique avec le HBTU; (C) MccJ25 native et active; (D) cyclisation de l'anneau sur la chaîne latérale en solution.¹⁰²

Un autre obstacle important est que la structure tridimensionnelle particulière de la MccJ25 doit être respectée. De minces variations structurales causent une perte d'activité, car sa structure en épingle à cheveux β l'aide à passer au travers de la membrane par un transporteur spécifique, sans toutefois influencer son activité sur l'ARN polymérase à l'intérieur de la bactérie par la boucle du lasso (Figure 30).¹⁰²

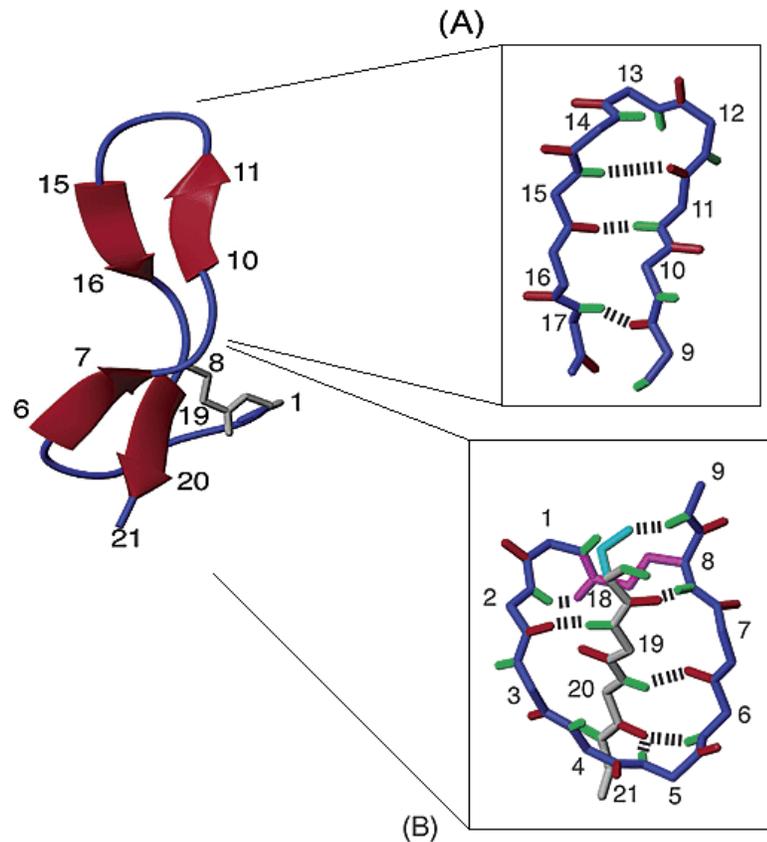


Figure 30. Schéma du réseau des ponts hydrogènes de la MccJ25 en représentation bâtonnets pour la région « β -hairpin» (A) et la boucle du lasso (B).¹⁰²

Notre hypothèse était qu'il est possible de mimer la structure en lasso à l'aide de peptides cycliques analogues, c'est-à-dire des peptides qui conservent une partie de la séquence d'origine, tout en conservant l'activité en totalité ou en majeure partie. Différentes stratégies de cyclisation peuvent être utilisées comme l'utilisation de ponts disulfures ou de liens amides comme dans la MccJ25 native.

2.2 Objectifs

En se basant sur notre hypothèse de travail et les résultats obtenus par Soudy et al., l'objectif principal de ce travail était de développer des analogues synthétiques de la microcine J25 capables de mimer la structure en lasso et ayant une activité antibactérienne. Pour atteindre cet objectif, il était nécessaire de franchir les étapes suivantes :

- 1) faire le design computationnel d'analogues cycliques de la MccJ25;
- 2) effectuer la synthèse chimique des analogues sélectionnés;
- 3) évaluer leur activité antibactérienne et leur spectre d'activité;
- 4) étudier le mode d'action des analogues actifs;
- 5) réaliser une étude structure-activité avec les analogues actifs afin d'optimiser l'activité antibactérienne.

CHAPITRE 3 :

Design et synthèse des analogues peptidiques de la microcine J25

3.1 Design des analogues de la microcine J25

Le design des analogues s'est fait *in silico*, en se basant sur la séquence primaire en acides aminés de la MccJ25, mais aussi en plusieurs étapes. En collaboration avec l'équipe du Pr Ismail Fliss, le logiciel MODELLER v9.9 a été utilisé avec le RMN de la MccJ25 native (PDB 1Q71) pour obtenir une structure par homologie qui a ensuite été minimisée avec le logiciel GROMOS96 (Figure 31).

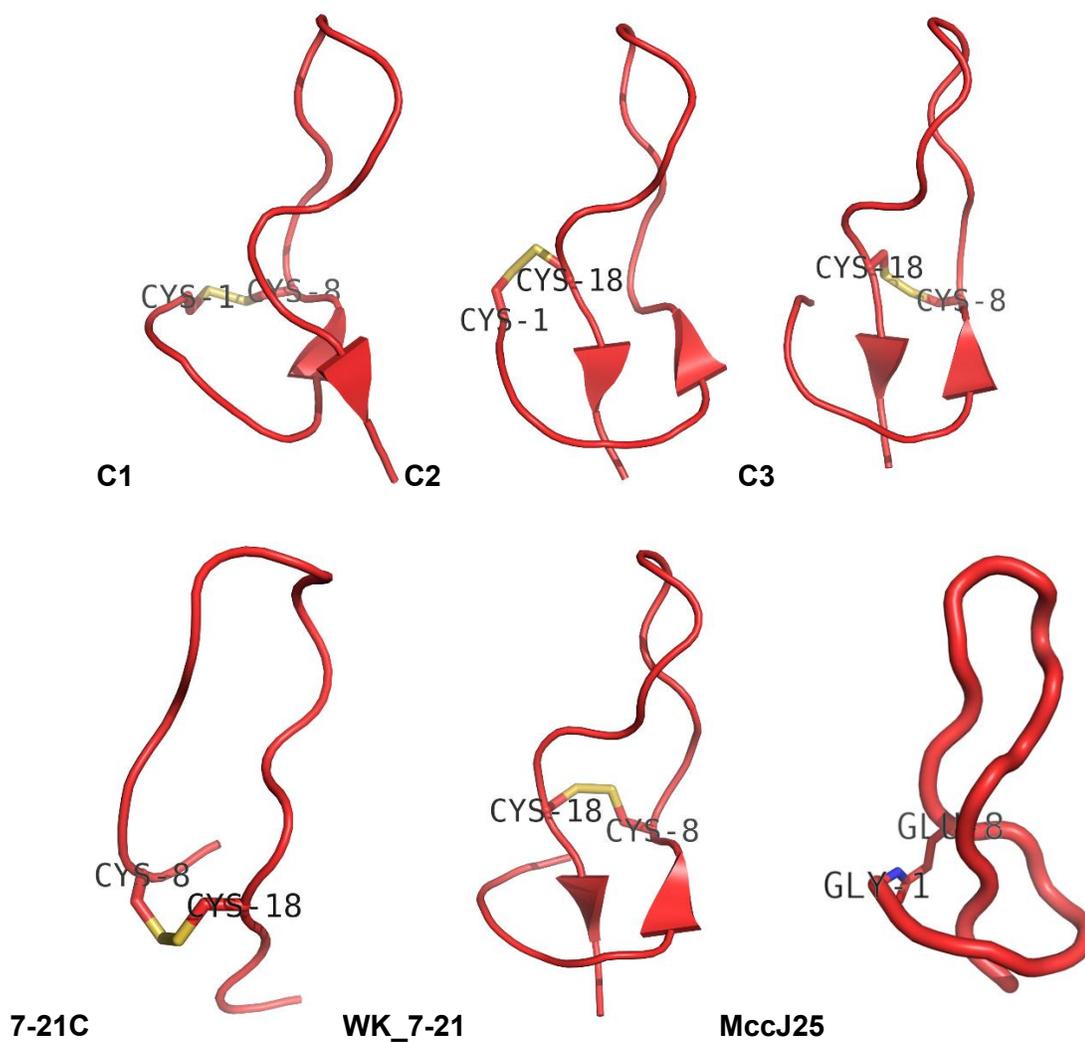


Figure 31. Représentation des structures tridimensionnelles des analogues déterminés *in silico* (**C1**, **C2**, **C3**, **7-21C** et **WK_7-21**) et celle de la **MccJ25** déterminée par RMN (PDB 1Q71). Le squelette peptidique en rouge, les ponts disulfures en jaune, lien amide Gly¹-Glu⁸ de la **MccJ25** en bleu.

En premier lieu, nous avons préparé des séquences analogues pour obtenir des échantillons de références en utilisant des séquences du N-terminal et du C-terminal plus courtes comme celles décrites dans la littérature et qui ont démontré une activité.⁹² Pour le N-terminal : l'anneau formant la boucle linéarisée **1-8L** et sa forme cyclique par le lien amide original **1-10C** où les deux acides aminés aromatiques ont été ajoutés sur la boucle cyclisée pour conserver le second mode d'action sur la respiration cellulaire, mais aussi pour augmenter le signal lors de la purification, car certains peptides cycliques perdent l'intensité du signal au HPLC. Pour le C-terminal : la portion **9-21L** qui a aussi été synthétisée pour former un cycle, mais par un pont disulfure pour les analogues **8-21C** et **9-21C** dont les acides aminés 8 et 9, respectivement, et le 18^e sont remplacés par des cystéines. Nous avons aussi ajouté un acide aminé qui n'est pas présent dans la MccJ25 native, la lysine en position 7 pour le **7-21C** dont les cystéines en position 8 et 18 forment un pont disulfure (Figure 31). Cette modification avait pour hypothèse que la lysine pourrait remplacer la charge positive apportée par l'histidine dans la boucle N-terminale. Cette première série de peptides synthétiques a été testée *in vitro* dans un lecteur de microplaques. La densité optique des puits permet d'établir la concentration minimale inhibitrice selon la quantité de bactéries pouvant se répliquer à l'intérieur.

À la lumière des résultats obtenus avec cette première série, nous avons remarqué que la dernière modification par ajout d'une lysine permet de rendre plusieurs souches sensibles aux analogues. Nous avons alors élaboré une seconde hypothèse dans laquelle l'ajout de charges et de groupements hydrophobes supplémentaires, tels les tryptophanes, pouvait à la fois augmenter la solubilité et possiblement induire une structure en épingle à cheveux β comme observée sur la MccJ25 native. Le premier membre de cette deuxième série, l'analogue **WK_7-21**, possède des lysines aux positions 3, 5 et 7, des tryptophanes aux positions 2 et 6 et fait un pont disulfure entre les Cys8 et Cys18 (Figure 31).

De plus, deux autres séries de peptides ont été synthétisées par la suite. La troisième série avec les peptides **C1**, **C2** et **C3** a été conçus pour conserver la séquence primaire de la MccJ25 tout en formant une seule boucle, contrairement au peptide lasso (Figure 31). Les peptides cycliques **C1**, **C2** et **C3** possèdent des ponts entre les positions 1-8, 1-18 et 8-18, respectivement. Finalement, la quatrième série avec les peptides **NC1**, **NC2** et **NC3** a été synthétisée pour conserver la partie N-terminale, la Tyr9 responsable de l'activité sur la consommation d'oxygène, pour conserver la boucle, mais aussi pour introduire des lysines et tryptophanes comme dans le cas de l'analogue **WK_7-21**.

3.2 Synthèse des peptides sur support solide

Pour obtenir les analogues de la MccJ25 en grande quantité, l'approche synthétique sur support solide a été utilisée. La synthèse par voie chimique permet notamment d'obtenir de grandes quantités de produits, voire plusieurs dizaines de milligrammes, avec des puretés avoisinant les 99% et des rendements de plus de 80% avant purification. En effet, l'utilisation d'un support solide permet de travailler en excès de monomères pour que les réactions soient complètes et de laver facilement le produit supporté entre chaque étape pour éviter la contamination.

Parmi les supports solides disponibles comme les résines à base de polystyrène, polyéthylène glycol, polyamines, hybrides, etc., nous avons choisi pour cette étude, la résine polystyrène en raison de son faible coût, de son utilisation courante dans le laboratoire et de sa versatilité permettant de travailler en stratégie Fmoc/tBu.¹⁰³ Cette chimie permet d'allonger la chaîne peptidique en déprotégeant l'amine de l'acide aminé en bout de chaîne à l'aide d'un milieu basique, tandis que les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par des groupements protecteurs labiles en milieu acide tel que les groupements communs Pbf, Trt, tBu et Boc.

Pour accrocher une chaîne peptidique et en faire son élongation sur une résine, il est absolument nécessaire d'avoir un ancrage permettant de relarguer le peptide dans un milieu orthogonal à celui de la synthèse. Il existe des ancrages labiles en milieu basique, acide, sensible à la lumière et même à certains gaz. Un des ancrages les plus communs pour la stratégie Fmoc/tBu est l'ancrage Rink. Ce dernier est labile en milieu acide et permet de relarguer le peptide et de déprotéger les chaînes latérales des acides aminés simultanément à l'aide d'une solution de 95% d'acide trifluoroacétique (TFA), 2,5% d'eau et 2,5% de triisopropylsilane (TIPS). Le type d'ancrage détermine non seulement le milieu pour décrocher le peptide, mais aussi le type de C-terminal, car l'élongation de la chaîne peptidique se fait du C-terminal vers le N-terminal. L'ancrage Rink permet d'obtenir un C-terminal sous forme amide, tandis qu'un ancrage trityl permet d'obtenir un C-terminal sous forme d'acide carboxylique. Dans cette étude, nous avons utilisé ces deux ancrages selon le type de C-terminal désiré. En plus d'obtenir un acide carboxylique en C-terminal, l'ancrage trityl est plus sensible que le Rink et permet de relarguer le peptide avec les chaînes latérales protégées à l'aide d'un acide plus faible comme l'hexafluoroisopropanol (HFIP). L'élongation de la chaîne a été réalisée en couplant les acides aminés à l'aide d'une

solution contenant 3 équivalents d'acides aminés protégés Fmoc sur l'amine, 3 équivalents de l'agent de couplage HCTU et 6 équivalents de la base *N*-méthylmorpholine dans le DMF pendant 20 minutes (Figure 32). Le nombre d'équivalents est calculé par rapport aux sites d'ancrage disponibles sur la résine (mmol/g). Suite au couplage, le groupement Fmoc a été clivé à l'aide d'une solution de pipéridine pour générer une l'amine libre prête pour le couplage de l'acide aminé suivant.

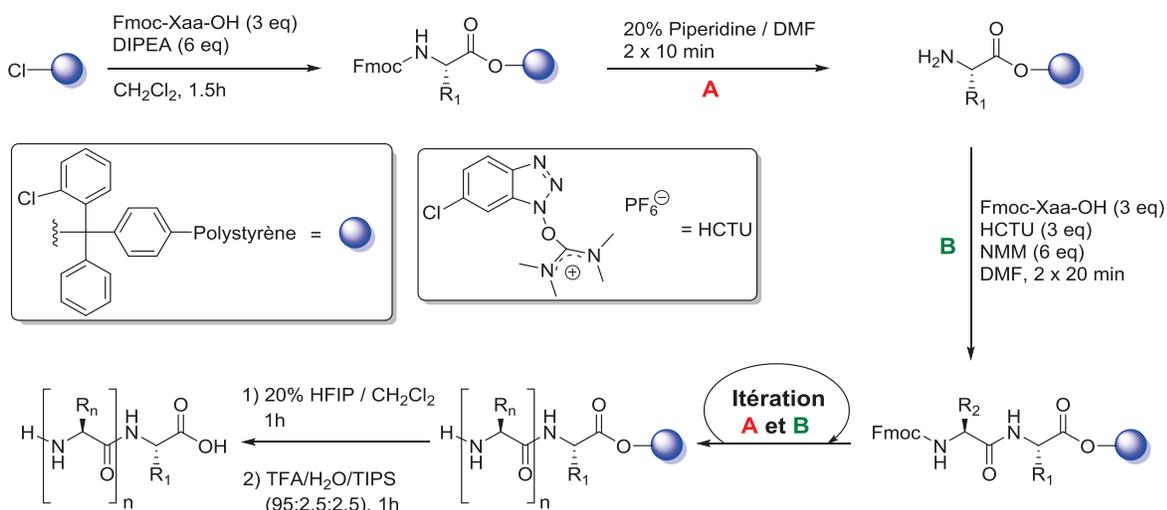


Figure 32. Schéma de synthèse peptidique par stratégie Fmoc/tBu sur la résine 2-chloro-trityl-polystyrène.

Suite à la déprotection du peptide et au relargage de ce dernier, une précipitation du peptide dans l'éther permet de retirer les groupements protecteurs du mélange pour ainsi obtenir un produit presque pur. Si aucune modification n'est nécessaire, l'étape suivante est la purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Ces méthodes de synthèse, ainsi que le design des analogues de la MccJ25, qui sera abordé dans les prochains chapitres, nous ont permis de faire la synthèse de plusieurs peptides pour les tests d'activité antimicrobienne dans le but de cette étude.

3.2.1 Cyclisations des peptides

Dans cette étude, deux types de cyclisation ont été utilisés pour les peptides. La cyclisation par lien amide qui est covalent et plus rigide, ainsi que la cyclisation par pont disulfure par oxydation qui est plus souple.

3.2.1.1 Cyclisation par lien amide

Cette cyclisation se fait généralement sur support solide, car il est plus facile de déprotéger sélectivement un acide carboxylique et une amine pour faire un lien peptidique covalent par condensation en amide. Dans cette étude, le groupement protecteur orthogonal est un ester allylique sur l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique. La déprotection de l'acide s'effectue avec du palladium en quantité catalytique en présence d'une source d'hydrure telle le phénylsilane à 20 équivalents (Figure 33). Par la suite, il suffit de faire un couplage standard pour former le cycle (lien amide) ou encore d'utiliser un agent de couplage plus puissant, le HATU.

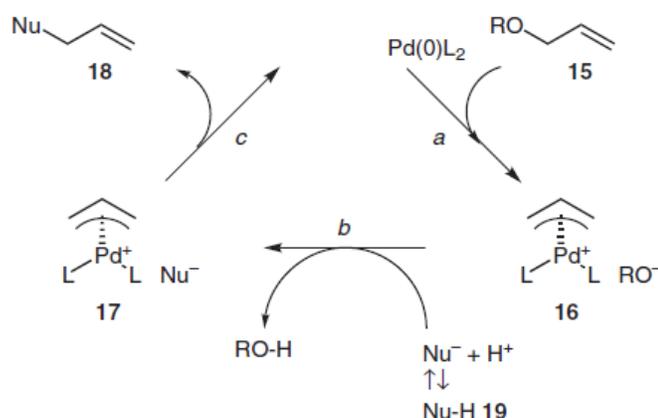


Figure 33. Mécanisme général pour la réaction Tsuji-Trost servant au clivage des esters allyliques. (a) addition oxydative; (b) échange d'un contre anion; (c) élimination réductrice.¹⁰⁴

3.2.1.2 Cyclisation par pont disulfure

Une fois le peptide déprotégé et relargué du support solide, il existe plusieurs méthodes pour lier les chaînes latérales de deux cystéines via un pont disulfure. Pour cette étude, nous avons opté pour la cyclisation sélective en solution à l'aide d'un agent oxydant faible, le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Figure 34). À l'aide du DMSO pour faire l'oxydation des sulfures sur les cystéines, un pH faiblement acide, ajusté avec de l'acide acétique, est nécessaire à la formation du pont. Nous avons choisi l'acide acétique, car il est volatil et peut donc être lyophilisé tout comme l'eau et le DMSO. Cependant, la concentration de DMSO par rapport à l'eau va changer les propriétés du mélange et empêcher la lyophilisation. Un mélange à 20% DMSO/eau peut être difficilement lyophilisé, mais un mélange 80% DMSO/eau se lyophilise beaucoup plus facilement même si la réaction est un peu plus lente.



Figure 34. Schéma réactionnel de la cyclisation des ponts disulfures à l'aide du DMSO.

3.2.2 Purifications et caractérisations des peptides

Les peptides ont été purifiés par HPLC sur une colonne C18 avec un gradient d'acétonitrile dans l'eau. Les fractions contenant les peptides ont été récoltées à l'aide d'un collecteur de fraction et lyophilisées. Les peptides purifiés ont été analysés par LC-MS ElectroSpray Ionisation (ESI) pour les caractériser et s'assurer de la pureté de chacun (Tableau 5).

Le système HPLC Shimadzu a été complètement optimisé pour la purification automatique à l'aide de l'échantillonneur automatique et du collecteur de fractions automatique. Les échantillons bruts se faisaient injecter, purifier et collecter de façon totalement automatique. La méthode HPLC utilise un gradient linéaire de 10% acétonitrile/eau (0,1% TFA) à 90% en 20 minutes avec un débit de 14 mL/min sur une colonne C18 préparative avec le détecteur UV aux longueurs d'ondes 220 et 254 nm. Les détails de la colonne Vydac sont présentés dans le chapitre de synthèse et purification dans le chapitre suivant. Les échantillons ont été préparés avec une concentration d'environ 30-60 mg par mL dans 1 à 2 mL de solvant qui pouvaient être de l'eau, acétonitrile, du DMSO ou un mélange selon leur solubilité. Le collecteur automatique a été réglé pour collecter tout ce dont l'intensité relative au détecteur UV dépassait les 25 μ V, mais aussi par la légère variation de la courbure de la pente pour séparer les pics de plus de 25 μ V. Finalement, les fractions ont été congelées à l'aide d'azote liquide, puis lyophilisées par centrifugation par une centrifugeuse de type « Speedvac » reliée à un condensateur de vapeurs à -110 °C jusqu'à ce que la pression de vapeur atteigne 0 mTor à l'aide d'une pompe à huile puissante.

Chaque fraction a ensuite été analysée par LC-MS en mode ESI pour permettre de déterminer la pureté HPLC en pourcentage à l'aide des aires sous les courbes, ainsi que par l'identification de la masse ionique (MH+), c'est-à-dire que les produits deviennent ioniser par un proton sous l'effet de la sonde ESI en passant par le spectromètre de masse. Les masses théoriques, c'est-à-dire monoisotopiques (mono) et moyennes (av), ont été utilisées pour comparer les masses observées (obs) et ainsi confirmer la présence des produits dans les fractions du collecteur de fractions automatique. Cependant, la synthèse peptidique sur support solide de court fragment peptidique génère souvent des produits très purs soit plus de 80% de pureté brute. Il est tout de même nécessaire de les purifiés pour retirer les sels et autres impuretés liés au relargage de la résine.

Tableau 5. Caractérisations des analogues de la MccJ25.

Peptide	Séquence	MH+(mono)	MH+(av)	MH+ (obs)	HPLC (%)
NC1	GGAGHVPC(CYF-GKG---C)FYG	1717,74	1718,85	1718.80	>99
NC2	GGAGHVPC(CYF-KKK---C)FYG	1859,89	1861,09	1861.00	>99
NC3	GGAGHVPC(CYF-WKW---C)FYG	1975,85	1977,17	1976.85	85.0
1-8L	GGAGHVPE	723.34	723.77	723.45	90.8
1-10C	c(GGAGHVPE)YF	1031.47	1032.12	1032.10	87.1
8-21C	-----c(CYFVGIGTPIC)FYG	1537,70	1538,82	1538.70	90.1
9-21L	YFVGIGTPISFYG-NH2	1420.71	1421.65	1420.75	88.1
9-21C	c(CFVGIGTPIC)FYG-NH2	1373.65	1374.69	1373.85	96.7
7-21C	-----Kc(CYFVGIGTPIC)FYG	1665,79	1666,99	1666.85	88.8
WK_7-21	GWKGGKWKc(CYFVGIGTPIC)FYG	2408,19	2409,88	1205.70 (z=2)	>99
C1	c(CGAGHVPC)YFVGIGTPISFYG	2142,99	2144,48	1073.60 (z=2)	79.4
C2	c(CGAGHVPEYFVGIGTPIC)FYG	2185.00	2186,52	1093.55 (z=2)	83.3
C3	GGAGHVPC(CYFVGIGTPIC)FYG	2112,98	2114,45	1058.10 (z=2)	81.8
MccJ25*	c(GGAGHVPE)YFVGIGTPISFYG	2107.04	2108.39	2107.29	

*La MccJ25 native a été produite naturellement par E. coli et la masse déterminée par MALDI-TOF
Les fragments cycliques sont indiqués par : c(...)

CHAPITRE 4 :

**LASSO-INSPIRED PEPTIDES WITH DISTINCT
ANTIBACTERIAL MECHANISMS**

Résumé

La Microcine J25 (MccJ25) est un peptide antibactérien avec une structure moléculaire particulière qui consiste en 21 acides aminés et une topologie unique en lasso qui rend cette dernière très stable. Nous avons synthétisé différents peptides dérivés de la MccJ25 qui ont montré une activité inhibitrice telle que la molécule native contre *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Dans les peptides synthétiques qui ont été testés, les C1, 7-21C et WK-21 sont les meilleurs peptides inhibiteurs (CMI = 1-250 μ M), mais tous moins efficaces que la MccJ25. Alors que la MccJ25 n'a pas montré d'activité contre les bactéries à Gram positif, les trois peptides ont été légèrement actifs contre ces dernières (CMI \geq 250 μ M) À 5 μ M, C1, 7-21C et WK_7-21 ont réduit l'activité de l'ARN polymérase par 23,4 %, 37,4 % et 65% respectivement. La MccJ25 et ses dérivés ont tous affecté la consommation d'oxygène de *S. enterica*. Basés sur le dichroïsme circulaire et la spectroscopie FTIR, les peptides interagissent aussi avec les phospholipides. Les résultats suggèrent la possibilité de produire des dérivés peptidiques bioactifs de la MccJ25 démunis de la structure en lasso.

Amino Acids

DOI: 10.1007/s00726-014-1877-x

Published online, 4 December 2014

Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms

Riadh Hammami^{1}, François Bédard², Ahmed Gomaa[§], Muriel Subirade¹, Eric Biron² and Ismail Fliss^{1*}*

¹STELA Dairy Research Centre, Institute of Nutrition and Functional Foods, Université Laval, G1V 0A6 Québec, QC, Canada

²Faculty of Pharmacy, Université Laval and Laboratory of Medicinal Chemistry, CHU de Québec Research Centre, G1V 4G2 Québec, QC, Canada

§Permanent address: Food Science and Nutrition Department, Food Technology and Nutrition Research Division, National Research Center, Egypt.

§ Corresponding author: Riadh.hammami@fsaa.ulaval.ca or Ismail.fliss@ulaval.ca

ABSTRACT

Microcin J25 (MccJ25) is an antibacterial peptide with a peculiar molecular structure consisting of 21 amino acids and a unique lasso topology that makes it highly stable. We synthesized various MccJ25-derived peptides that retained some of the inhibitory activity of the native molecule against *Salmonella enteric* and *Escherichia coli*. Of the tested peptides, **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** were the most inhibitory peptides (MIC = 1–250 μ M), but all three were less potent than MccJ25. While MccJ25 was not active against Gram-positive bacteria, the three derived peptides were slightly inhibitory to Gram-positive bacteria (MIC \geq 250 μ M). At 5 μ M, **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** reduced *E. Coli* RNA polymerase activity by respectively 23.4 %, 37.4 % and 65.0 %. The MccJ25 and its derived peptides all appeared to affect the respiratory apparatus of *S. enterica*. Based on circular dichroism (CD) and FTIR spectroscopy, the peptides also interact with bacterial membrane phospholipids. These results suggest the possibility of producing potent MccJ25-derived peptides lacking the lasso structure.

Keywords: antimicrobial peptides; microcin J25; solid phase peptide synthesis; antibacterial activity; mode of action

INTRODUCTION

Microcin J25 (MccJ25) is a 21-residue ribosomally synthesized bactericidal peptide with an unusual lariat protoknot structure (Bayro et al. 2003; Wilson et al. 2003; Rosengren et al. 2003). It is produced by *Escherichia coli* strains that harbor the plasmid-borne *mcjABCD* biosynthetic gene cluster (Solbiati et al. 1996). Mature MccJ25 is produced from a 58-amino-acid precursor called McjA following cleavage by ATP-dependent cysteine protease McjB and intramolecular cyclization catalyzed by amidotransferase McjC (Yan et al. 2012; Clarke and Campopiano 2007). It is then transported and exported into the extracellular milieu by ATP-binding cassette (ABC) transporter McjD encoded by the *mcjD* gene (Choudhury et al. 2014).

MccJ25 exhibits bactericidal activity toward several Gram-negative food-borne pathogens, including *Salmonella*, *Shigella* and *E. coli* (Sable et al. 2000; Vincent et al. 2004). The particular lasso topology of MccJ25 makes the peptide highly resistant to denaturation by high temperatures or proteolysis. These are attractive properties to both the food and pharmaceutical industries. MccJ25 structure consists of an 8-residue cycle (lariat ring) formed by a lactam (isopeptide) bond between the N-terminal amide and the carboxyl group of a glutamic acid side chain, which is followed by a 13-residue tail that loops back to thread through the ring (Figure 1). The C-terminal tail (residues 9-21) of the peptide is tightly (irreversibly for all practical purposes) trapped in the lariat ring due to the presence of two aromatic side chains at positions 19 and 20. The overall folding includes a β -hairpin involving two β -strands (10-11 and 15-16) connected by a β -turn pattern (11-14). MccJ25 bears only two charged groups: histidine at position 5 (positive charge) and the C-terminal carboxyl group of Gly21 (negative charge). These are reportedly important for the activity of the peptide (Bellomio et al. 2003).

Uptake of MccJ25 by target bacterial cells involves the iron transporter FhuA located in the outer membrane (Salomón and Farías 1993), the energy transduction complex TonB-ExbB-ExbD (Braun 1995), and the inner membrane protein SbmA (Salomón and Farías 1995). RNA polymerase appears to be the principal intracellular target of MccJ25 (Delgado et al. 2001; Yuzenkova et al. 2002), which binds within and obstructs the secondary channel, thus interfering with diffusion of nucleoside triphosphate substrate to the enzyme catalytic site (Mukhopadhyay et al. 2004). MccJ25 also possesses multiple independent mechanisms

of action that appear to affect different intracellular targets including the respiratory chain (Bellomio et al. 2007; Niklison Chirou et al. 2008).

A cleaved MccJ25 obtained by thermolysin cleavage in the β -hairpin loop retained bioactivity against *Salmonella enteric* serovar Newport but not against *E. coli* MC4100, suggesting that the mechanism of action might be different depending on the target strain (Blond et al. 2002). The β -hairpin loop region appears important for peptide uptake by FhuA, but not for binding to RNAP (Bellomio et al. 2004; Semenova et al. 2005; Destoumieux-Garzón et al. 2005). In contrast, the C-terminal region appears to be essential for RNAP inhibition. Amidation of the C-terminal glycine inhibits MccJ25 binding to RNAP but not its uptake by cells or its effect on respiration (Vincent et al. 2005). The histidine residue of the lariat ring (His5) has been shown important for recognition of the peptide by the inner membrane receptor SbmA (de Cristóbal et al. 2006). In addition, mutations in largest subunit of RNAP leading resistance to MccJ25 have provided a more detailed information on MccJ25 binding to RNAP secondary channel (Yuzenkova et al. 2002). More recently, structure-activity relationships were examined using multiple MccJ25 variants constructed by site-directed mutagenesis and screened for antibacterial activity and ability to inhibit RNAP (Pan and Link 2011; Pavlova et al. 2008; Pan et al. 2011; Ducasse et al. 2012). These studies revealed that the inhibitory activity of MccJ25 tolerates a number of residue substitutions.

Recent attempts to produce the lasso structure of MccJ25 through chemical synthesis (yielding a loop-tail rather than a lasso topology) have not yielded successful microbial inhibitors (Ferguson et al. 2010). Nevertheless, two of six synthetic peptides derived from MccJ25 without lasso folding were found to be bactericidal (Soudy et al. 2012). We hypothesized that lasso formation is important but not a prerequisite for the activity of MccJ25 and that it may be possible to obtain derivatives that are active without the lasso structure. In this study, we report synthetic peptides based on the MccJ25 sequence but devoid of lasso folding yet retaining activity against bacteria (*S. Enteric* and *E. coli*) and specific intracellular targets (RNA polymerase and the respiration chain). The antimicrobial activity, mode of action, toxicity and conformation of the synthesized peptides were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used without additional purification. Amino acid derivatives and coupling reagents 2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) and benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrilidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) were purchased from Matrix Innovation Inc. (Quebec, QC, Canada). Rink Amide AM resin (0.65 mmol/g) and 2'-chlorotrityl chloride resin (2-Cl-Trt) (1.6 mmol/g) were purchased from ChemImpex (Wood Dale, IL, USA). Reactions on solid support were performed in polypropylene-fritted syringes from Roland Vetter Labordedarf OHG (Ammerbuch, Germany).

Bacteria, media and growth conditions

The reference strains used in this study (Table 1) were maintained in 20 % glycerol at -80 °C. All were grown in tryptic soy broth (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD) supplemented with 0.6 % (w/v) yeast extract and were incubated aerobically at 30 °C. Before the experiments, strains were sub-cultured at least three times in their respective media at 24 h intervals. Minimal medium M63 supplemented with glucose (0.2 %, w/v) and thiamine (0.01 %, w/v) was used for MccJ25 production.

Microcin J25 production and purification

A clone of *Escherichia coli* MC4100 harboring the plasmid pTUC202 (courtesy of Dr. Sophie Sablé, Université La Rochelle, France) was used for production and purification of MccJ25 as described previously (Sable et al. 2000).

Peptide synthesis and purification

General procedure

Peptides were synthesized by standard Fmoc solid-phase synthesis using 2-Cl-Trt resin (Fields and Noble 1990). Briefly, the Fmoc protecting group was removed from the resin by two 10 min treatments with 20 % piperidine in DMF (v/v) and amino acid coupling was performed with Fmoc-Xaa-OH (3 eq.), HCTU (3 eq.) and *N*-methylmorpholine (12 eq.) in

DMF (2 × 30 min). The synthesized peptide was released by treating the resin with 20 % HFIP in DCM for 30 min (Bollhagen et al. 1994). The solvent was removed under reduced pressure and side chain de-protection was achieved by treating with TFA/TIPS/H₂O (95:2.5:2.5) for 3 h. The resulting peptides were precipitated with cold ether and purified by RP-HPLC with a Shimadzu Prominence instrument (Columbia, MD, USA) on a Vydac 218MS column (22.0 x 250 mm, 300 Å, 10 µm, C18) using 0.1 % TFA/H₂O (solvent A) and 0.1 % TFA/CH₃CN (solvent B) with a linear gradient of 10–100 % solvent B for 20 min at 10 ml min⁻¹ and UV detection at 220 nm and 254 nm. After freeze-drying, the purified peptides were characterized by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) on an AB SCIEX 4800 Plus MALDI-TOF/TOF instrument using alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix.

Cyclization on resin

Tail-to-side-chain cyclization was performed on peptides containing a Glu(OAll) residue. The resin-bound fully protected peptide was treated with Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq.) and PhSiH₃ (12 eq.) in DCM (2 × 40 min) to remove the allyl group, followed by washing with DCM (5×), 0.5 % (v/v) DIPEA/DMF (2×), 5 % (v/v) diethyl dithiocarbamate/DMF (2×) and DMF (5×) (Patel et al. 1999). After Fmoc group removal as described above, peptide cyclization was performed on solid support in the presence of PyBOP (3 eq.) and DIPEA (6 eq.) in DMF for 3 h. Cyclization was monitored using the chloranil test and after reaction completion, the resin was washed with DMF (5×) and DCM (5×). The cyclic peptides were cleaved, purified and characterized as described above.

Oxidative folding and disulfide bond formation

Fully de-protected crude peptide was dissolved in a mixture of 80 % DMSO/H₂O and the solution was adjusted to pH 6 with AcOH (Tam et al. 1991). The mixture was stirred for 3–5 days and disulfide bond formation was monitored by LC-MS. After complete disulfide bridge formation, the solvent was removed by freeze-drying. The oxidized peptide was purified and characterized as described above.

Minimal inhibitory concentration (MIC) evaluation

The minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined using polystyrene micro-assay plates (96-well Microtest, Becton Dickinson Labware, Sparks, MD, USA) as described by Hammami et al. (2009). Briefly, micro-plates loaded with two-fold serial dilutions of each

peptide (starting at 250 μM) in TSB were seeded with log-phase culture of target strain diluted in TSB to $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ cfu mL^{-1} (approximately 1×10^4 cfu per well). Micro-plates were then incubated at 37 °C for 24 h and absorbance at 595 nm was measured hourly using an Infinite® F200 PRO photometer (Tecan US inc., Durham, NC, USA). MIC values were expressed in μM and correspond to the lowest concentration that inhibited the growth of target organism after 16 to 20 h. The MIC values are reported as means of two independent experiments in duplicate.

RNAP inhibition assay

Inhibition of *Escherichia coli* RNAP *in vitro* by MccJ25 and its derivatives was assayed by amplifying transcripts of the Kool NC-45 universal RNA polymerase template (Epicentre, Madison, WI, USA). The assay was performed according to the manufacturer's protocol and amplification was quantified using qRT-PCR. Rifampicin (200 nM) was used to obtain total inhibition.

Oxygen consumption

An overnight culture of *S. Enteric* ($\text{OD}_{595} = 0.4\text{--}0.5$) in TSYB was diluted in medium to an OD_{595} of 0.2 and incubated for 30 min at 37 °C with MccJ25 or derivative. The average rate of respiration over the subsequent 5 min was measured using a Gilson Clark-type polarographic electrode oxygraph. A control sample in the absence of peptide was also measured.

Hemolysis assays

Peptide hemolytic activity was measured as hemoglobin release by lysis of horse red blood cells. Fresh erythrocytes were washed three times with sodium phosphate buffer saline (PBS) (100 mM, pH 7.4) and diluted to 5 % (v/v) in the buffer. Erythrocyte suspension (100 μl) was mixed with peptide at different concentrations (100 μL) in PBS, held at 37 °C for 1 h and then centrifuged for 5 min. Positive and negative controls were run using 100 μl of 1 % Triton X-100 solution or PBS. Intact erythrocytes were pelleted by centrifugation at $1000 \times g$ for 5 min at 4 °C and hemoglobin release was monitored by measuring absorbance at 450 nm. All samples were prepared in triplicate and run three separate times to ensure reproducibility. Percent hemolysis was defined as follows: $[(\text{sample absorbance} \times \text{phosphate buffer absorbance}) / \text{Triton X-100 absorbance}] \times 100$.

Preparation of liposomes

Lipids dissolved in methanol were dried under nitrogen stream and re-suspended in 100 mM phosphate buffer, either in water at pH 7.4 or in deuterium oxide at pD 6.0. In order to obtain small unilamellar vesicles, the formed multi-lamellar liposomes were subjected to sonication using a probe sonicator (6 watt, 60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific, USA) at intervals of 30 s for 20 min at 5°C followed by centrifugation at $12,000 \times g$.

Circular dichroism (CD) measurements

CD measurement of each peptide (2 mg mL⁻¹) in 100 mM phosphate buffer at pH 7.2 was performed with a Jasco J-815 spectrometer (Aviv Instruments, Lakewood, NJ, USA). The spectra were recorded at 25 °C in the 195–250 nm wavelength range at 0.1 nm intervals in a cuvette with a 0.5 mm path length. For each spectrum, five scans were averaged and smoothed by the J720/98 system program (Version 120C). CD data were expressed as mean residue ellipticity $[\Theta]$ given in deg cm² dmol⁻¹, plotted against wavelength (nm) and analyzed using the CONTIN algorithm included in the CDPro analysis software.

FTIR analysis

Infrared spectra at a resolution of 2 cm⁻¹ were recorded with a Magna Nicolet 560 spectrometer (Madison, WI, USA) equipped with an MCT (mercury-cadmium-telluride) detector and continuously purged with dried air. Pure phospholipids in addition to the mixtures (10:1 w/w) of each phospholipid with individual tested peptides were prepared in D₂O and mixed for 1 hour prior to the analyses. The samples were placed between CaF₂ windows separated by spacer 23 μm thick. The samples were first cooled to 5 °C and spectra were collected over the range of 5–80 °C in 5 °C increments except for the 15–45 °C range in which data were collected at each 2 °C increment in order to monitor the chain-melting phase transition in greater detail. Each spectrum represented an average of 128 scans apodized with a Happ-Ganzel function. The wavenumber of the symmetric C-H stretching mode $[v_s(\text{CH}_2)]$ for the acyl chain methylene groups of the lipids was determined after subtracting a linear baseline from the 3050–2750 cm⁻¹ region.

Statistical analysis

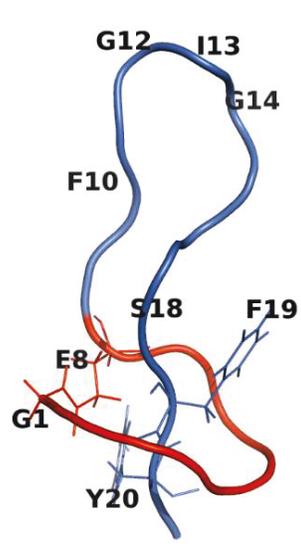
Data are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. Data were subjected to ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Inc., Cary,

NC). A multiple comparison test (LSD) was used to reveal significant differences between the treatment means ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Peptide design

In this study, we designed *in silico* and then synthesized various peptides based on the primary structure of MccJ25 (Fig. 1).



Peptide	Sequence	Bonds	Mass	Net
			MH ⁺	charge
MccJ25	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	1-8	2 107.04	0
1-8L	GGAGHVPE-----	-	723.34	-1
1-10C	GGAGHVPEYF-----	1-8	1 031.47	-1
NC1	GGAGHVPCYF-GKG---CFYG	8-18	1 717.74	+1
NC2	GGAGHVPCYF-KKK---CFYG	8-18	1 859.89	+3
NC3	GGAGHVPCYF-WKW---CFYG	8-18	1 975.85	+1
9-21L	-----YFVGIGTPISFYG-NH ₂	-	1 420.71	+1
9-21C	-----H ₂ N-CYFVGIGTPICFYG-NH ₂	9-18	1 373.65	+1
8-21C	-----CYFVGIGTPICFYG	8-18	1 537.70	0
7-21C	-----KCYFVGIGTPICFYG	8-18	1 665.79	+1
WK_7-21	GWKWKWCYFVGIGTPICFYG	8-18	2 408.19	+3
C1	CGAGHVPCYFVGIGTPISFYG	1-8	2 142.99	0
C2	CGAGHVPEYFVGIGTPICFYG	1-18	2 185.00	-1
C3	GGAGHVPCYFVGIGTPICFYG	8-18	2 112.98	0

Figure 1. Amino acid sequence, molecular weight and net charge of **MccJ25** and derived-peptides thereof. Amide and disulfide bonds are colored in blue and yellow respectively.

The peptide code is based on MccJ25 numbering. We evaluated the antibacterial activity of shortened N-terminal and C-terminal sequences since cleaved MccJ25 has been shown previously to be antibacterial (Blond et al. 2002). The lariat ring was synthesized in linear **1-8L** and cyclised **1-10C** forms. The tail (C-terminal) portion was synthesized as linear peptide **9-21L**. A disulfide bond was introduced between C9 and C18 to form the head-to-tail circular peptide **9-21C**. Peptides **8-21C**, **7-21C** and **WK_7-21** are designed from a tail that was scaffold-stabilized using a disulfide bond between cysteine residues substituted at positions 8 and 18. While a single lysine residue was inserted at the N-terminus of **7-21C**, peptide **WK_7-21** was obtained by substituting the N-terminal portion of MccJ25 with multiple hydrophobic (tryptophan) and basic (lysine) and residues (NH₂-GWKGGKWK) to increase solubility and possibly induce β -hairpin structure. In addition, peptides **C1**, **C2** and **C3** containing a single disulfide bond (1-8, 1-18 or 8-18) were designed to retain the core structure of the native MccJ25 peptide regardless of the lariat protoknot structure. **NC1**, **NC2** and **NC3** were synthesized with deletions in the loop and tail regions of the lasso.

Evaluation of antimicrobial activity and toxicity

Table 1 summarizes the minimum inhibitory activities (MICs) of the synthesized peptides in comparison to bacteria produced microcin. Synthetic peptides that had no activity on the strains tested at and below 250 μ M are not listed in Table 1. The MccJ25 peptide was active at micromolar and nanomolar concentrations (0.1 – 6.5) against Gram-negative bacteria, with *S. enterica* ATCC 8387 being the most sensitive strain (MIC = 0.1 μ M). While peptide **C2** was not inhibitory, **C1** inhibited several strains of *S. enterica* and *E. coli*. Against *S. enterica* ATCC 8387, the MICs of peptides **C1**, **C3**, **8-21C**, **7-21C** and **WK_7-21** were respectively 1.0 μ M, 15.6–31.3 μ M, 1.0 μ M, 7.8–15.6 μ M and 7.8 μ M. Inhibition of *S. enterica* ATCC 8387 by MccJ25 and its derived peptides at 0.5 and 7.8 μ M is summarized in Figure 2. At 0.5 μ M, the derived peptides were moderately inhibitory (25–50 %). Similarly to MccJ25, inhibition by **C1**, **8-21C** and **WK_7-21** was total at 7.8 μ M (above the MIC). Although MccJ25 was not active against Gram-positive bacteria, peptides **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** were weakly inhibitory to *Listeria ivanovii* HPB28, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC 27275 (MIC \geq 250 μ M).

Table 1. Minimal inhibitory concentrations of **MccJ25** and its derivatives for bacteria

Bacterial strain	Minimal inhibitory concentration (µM)							
	MccJ25*	NC2	NC3	C1	C3	8-21C	7-21C	WK_7_21
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 14028	6.5	-	-	125-250	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 8387	0.1	-	31.3	1.0	15.6-31.3	1.0	7.8-15.6	7.8
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 29628	6.5	250	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 8400	0.8	-	-	62.5-125	-	-	125-250	62.5
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 9607	1.6	-	-	250	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 9700	0.4	-	-	250	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	0.2	-	-	62.5	-	125-250	-	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3.3	-	-	250.0	-	-	250	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15144	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> MC4100 ATCC 35695	6.5	-	-	31.3-62.5	-	-	125	-
<i>Escherichia coli</i> DH5a	6.5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> LR 05	-	-	-	>250	-	-	>250	>250
<i>Listeria ivanovii</i> HPB28	-	-	-	>250	-	-	>250	250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	>250	-	-	ND	>250
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27275	-	-	-	>250	-	-	ND	>250

*Produced by bacteria; “-” = no activity detected at concentrations up to 250 µM; ND = not determined; >250 = partial inhibition at 250 µM and MIC value is higher than 250 µM; Peptides 1-8L, 1-10C, NC1, 9-21L, 9-21C and C2 were not inhibitory at concentrations up to 250 µM

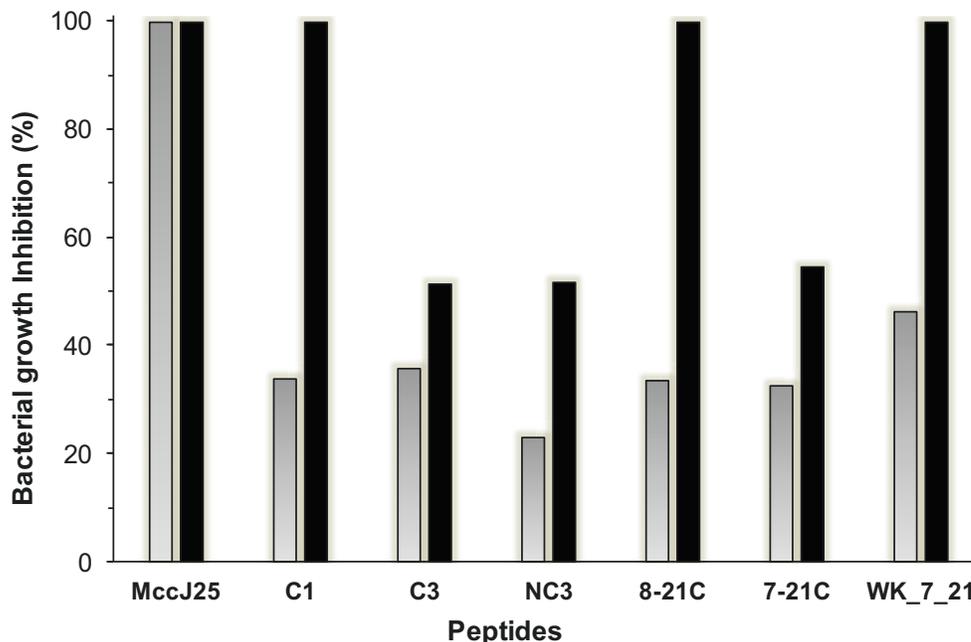


Figure 2. Inhibition of growth of *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC 8387 by **MccJ25** and its derived peptides (**C1**, **C3**, **NC3**, **8-21C**, **7-21C** and **WK_7-21**) at 0.5 μM (gray) and 7.8 μM (black). Data are means of triplicate measurements.

Of the synthetic MccJ25-derived peptides described previously, two in particular, namely GGACHVPEYFVGIGTPISFC (“peptide 1” bonded 1-8, 4-20) and CGAGFHVPCYFVGRGTPISFYG (“peptide 6” bonded 1-9), were inhibitory to *Salmonella newport* at MICs of 25 and 30 μM respectively (Soudy et al. 2012). While peptide **C1** of this study was designed with the replacement of the amide bond between G1 and E8 by a disulfide bond, peptide **6** contained besides a phenylalanine insertion at position 5 and an arginine substitution for isoleucine at position 13. Although these mutations increased the solubility of peptide **6**, they decreased its inhibitory action. While peptide **C1** was inhibitory to Gram-negative pathogens, peptide **6** was 60 times less potent than MccJ25 against *S. enterica* Newport and **C1** against *S. enterica* ATCC 8387 was 10 times less potent than MccJ25. Further, **C1** showed a weak activity against Gram-positive bacteria (MIC > 250 μM). Soudy et al. (2012) also reported absence of activity for a peptide **6** variant with a 8-residue lariat ring. Based on our results, the glycine substitution by phenylalanine at position 4 could explain the decrease of activity observed for peptide **6** and its variant compared to **C1**. The arginine substitution at position 13 has been reported previously to increase the antimicrobial activity of MccJ25 (Pavlova et al. 2008). In this study, different synthetic

derivatives of MccJ25 containing substitutions and/or truncations exhibited antibacterial activity against Gram-negative bacteria. Although the reduced activity of these designed synthetic derivatives compared to the native MccJ25, the lasso fold does not seem to be a prerequisite for the antimicrobial activity.

The hemolytic activity of MccJ25, **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** towards horse erythrocytes is shown in Figure 3. All four peptides were weakly hemolytic (< 6%) up to the highest tested concentration (50 μ M), which is consistent with the low toxicity reported in the literature (Lopez et al. 2007; Soudy et al. 2012). Overall, hemolysis did not differ significantly at 50 μ M ($P > 0.05$). MccJ25 and its derivatives are thus good candidates for therapeutic application, although it is to point that concentration range for hemolysis and antibacterial activity is about the same for the synthetic peptides (maximum 5 times higher), while the concentration inducing hemolysis (depending on the target bacteria) is 10 to 100 times higher than that for antibacterial activity in the case of MccJ25.

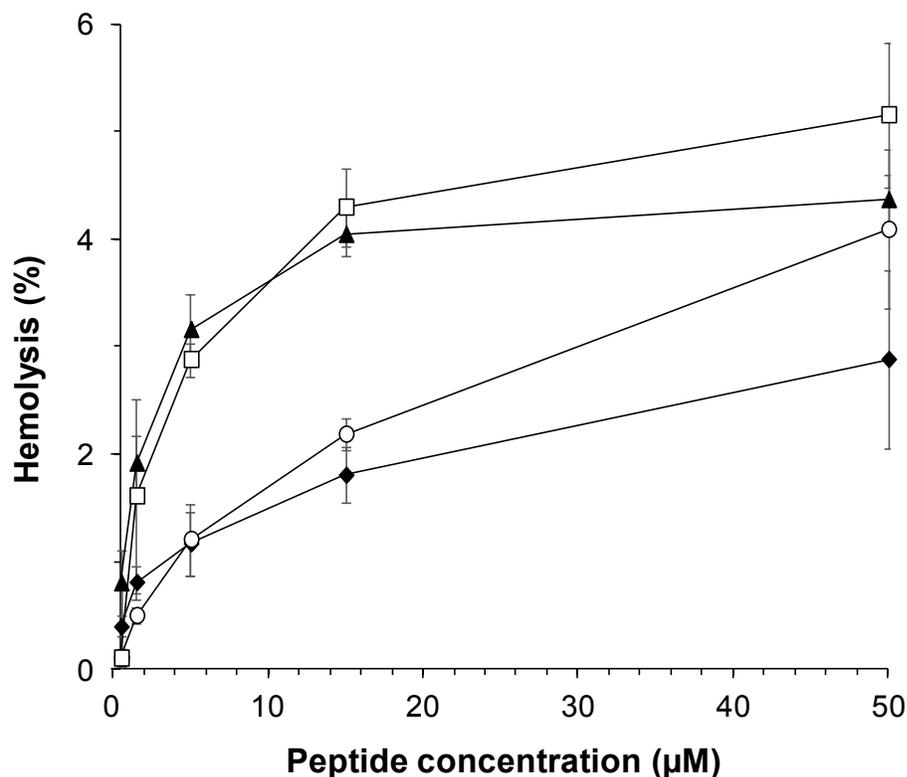


Figure 3. Hemolysis of horse red blood cells by **MccJ25** (triangle), **C1** (circle), **7-21C** (diamond) and **WK-7-21** (square). A 1 % (w/v) solution of Triton X-100 was the positive control. The values are means \pm SD of triplicate analyses.

Structural characterization of peptides using circular dichroism (CD)

CD spectroscopy in the far-UV region (195-250 nm) is frequently used to characterize molecular secondary structure. The peaks of the CD spectrum of MccJ25 (Figure 4) are due to the lasso structure and the transition modes of phenylalanine and tyrosine residues near the loop. The minimal ellipticity at 195 nm is assigned to β -strands forming the β -hairpin structure (Liu et al. 2008; Soudy et al. 2012). In addition, a positive peak at 218 nm and two shoulders at 206 nm and 202 nm are attributable to side chain transitions of Tyr and Phe, respectively (Sreerama and Woody 2004). The broad spectrum with a minimum ellipticity at 200 nm (e.g. peptide **7-21C**) typifies the random coil structure (Kelly and Price 2000). Furthermore, peptides **C1** and **WK_7-21** showed broadened spectra suggesting the existence of a folded secondary structure differing from that of MccJ25 (Figure 4). The MccJ25 spectrum is largely in agreement with a previous report of a trough at 200 nm and a peak at 215 nm with a shoulder at 210 nm (Soudy et al. 2012), although the CD measurements were made under conditions (e.g., protein concentration, polarity of the buffer) differing from those used in the present study.

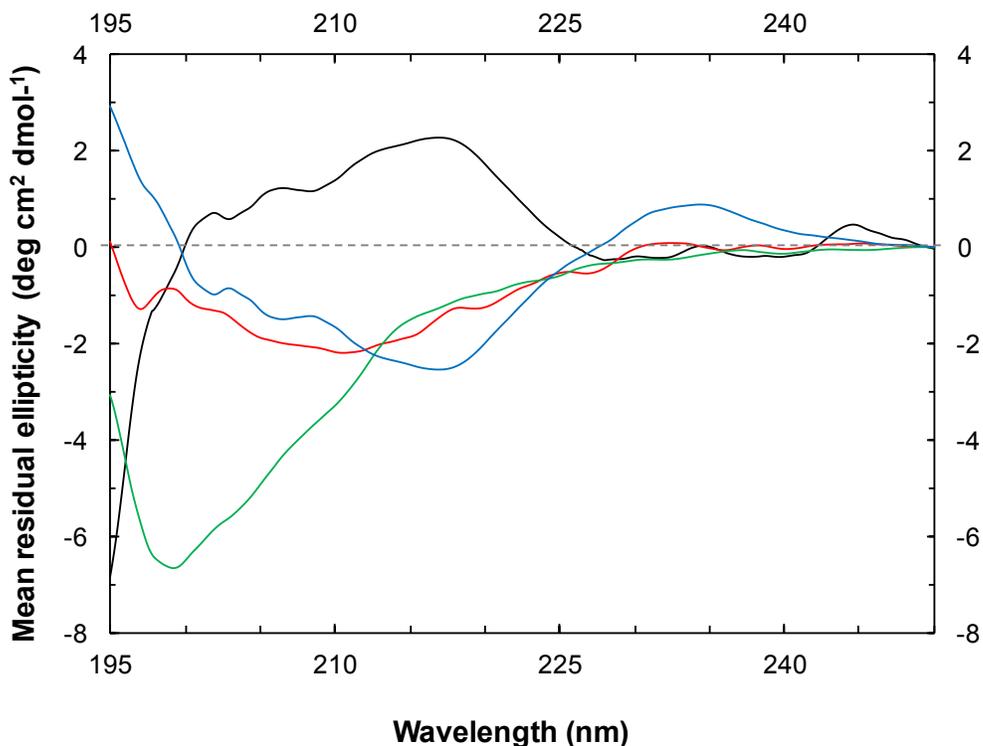


Figure 4. Circular dichroism spectra for **MccJ25** (black), **C1** (Blue), **7-21C** (green) and **WK_7-21** (red).

Mode of action

RNAP inhibition

The inhibition of RNAP by MccJ25, **9-21L**, **C1**, **C3**, **7-21C** and **WK_7-21** was examined *in vitro* (Figure 5). Rifampicin, an antibiotic that targets bacterial RNAP was used as a control. MccJ25 was the best inhibitor, reducing *E. coli* RNAP activity by 86.3 % and 97.9% respectively at 5 and 50 μ M. Peptides **C1**, **7-21C** or **WK_7-21** at a concentration of 5 μ M reduced activity by 23.4 %, 37.4 % and 65.0 % respectively. Linear peptide **9-21L**, which is inactive, was not inhibitory. At 50 μ M, reductions by MccJ25, **C1** and **WK_7-21** were 97.9 %, 95.7 % and 94.7 %, respectively, while **C3** (not inhibitory at 5 μ M) reduced RNAP activity by 70.6 %. These results suggest that the MccJ25-derived peptides could inhibit *E. coli* by interacting with RNAP and thereby interfering with transcription.

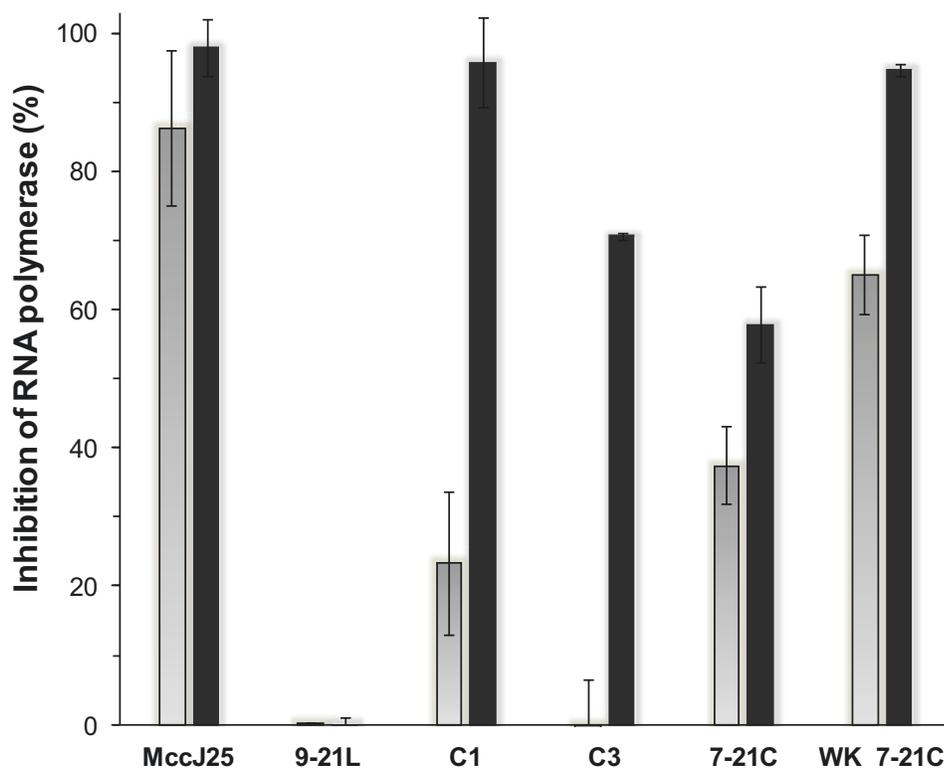


Figure 5. Inhibition of *E. coli* RNA polymerase in vitro by **MccJ25** and peptides **C1**, **C3**, **7-21C** and **WK-7-21** at 5 μ M (gray) and 50 μ M (black). Rifampicin (200 nM) was the positive control. The values are means \pm SD of triplicate analyses.

Inhibition of cell respiration

The ability of MccJ25, **C1**, **C3**, **7-21C** and **WK_7-21** to inhibit respiration of *S. enterica* ATTC 8387 is shown in terms of MIC in Figure 6. The decrease in oxygen consumption by *S. enterica* after incubation with MccJ25 was 57.2 %. **WK_7-21** was the strongest inhibitor among the synthetic peptides, decreasing oxygen consumption by 36.9 %, followed by **C1** and **7-21C** at 32.1 % and 24.2 % and finally **C3** at only 6.1 %. The antibacterial action of this peptide is therefore likely due to some other mechanism. Inhibition of respiration by peptides **WK_7-21**, **C1** and **7-21C** suggests that they share at least one mechanism of action with MccJ25.

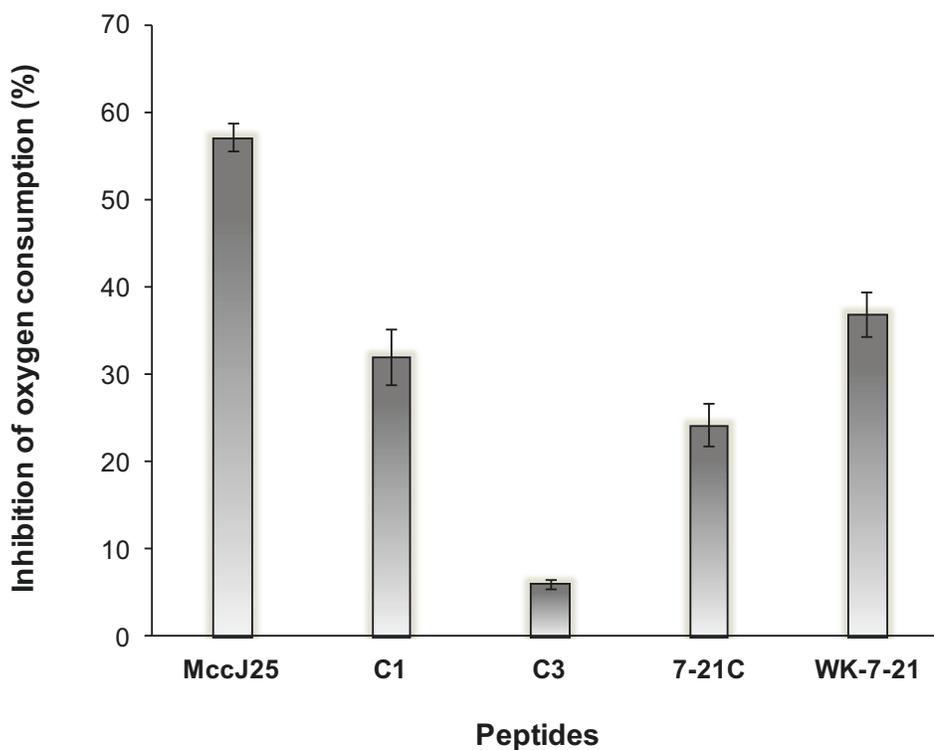


Figure 6. Inhibition of oxygen consumption by MccJ25 and peptides **C1**, **C3**, **7-21C** and **WK-7-21** at their respective MICs. The values are means \pm SD of triplicate analyses.

Interaction of peptides with membrane lipids using circular dichroism (CD)

In order to investigate the conformational behavior of MccJ25 and its synthetic derivatives **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** both outside and within membranes, studies of the average secondary structure adopted by these peptides in the absence or presence of phospholipid vesicles were conducted using CD spectroscopy. Eukaryotic cell membranes

are composed primarily of zwitterionic lipids, in particular phosphatidylcholine (PC), while the outer envelope of bacterial cells contains a variable mixture of anionic (phosphatidylglycerol, PG) and zwitterionic (phosphatidylethanolamine, PE) lipids. We used palmitoyl-oleoyl (PO) PG anionic vesicles and either POPC or POPE zwitterionic vesicles. Predicted secondary structures based on data deconvolution are presented in supplementary Table S1. MccJ25 alone adopted a secondary structure composed mainly of β -sheets and unordered segments, similar to that described previously (Blond et al. 2002; Soufy et al. 2012). In the presence of POPC, its structure remained relatively unchanged, although some regions appeared to shift from unordered to β -turn in the presence of POPG or POPE. Spectra de-convoluted in order to fit conventional protein structure archetypes did not vary significantly among peptides **C1**, **7-21C**, **WK_7-21** and MccJ25. The unordered structure of peptide **C1** decreased from 44 % to 33 %, 34 % and 32 %, in the presence of POPC, POPG or POPE respectively. We observed that the peptide sheet conformation increased by 6 % and 8 % respectively in the presence of POPG and POPE vesicles. The β -sheet content of peptide **7-21C** increased from 36 % to 43 % after contact with POPC. In contrast, β -sheet conformation decreased to 25 % and 20 % in the presence of POPG or POPE vesicles, while turn structure increased by 7 %. The overall secondary structure of **WK_7-21** remained stable in the presence of each phospholipid except for a 5–7 % decrease in unordered segments in the presence of POPG or POPE vesicles.

Interaction of peptides with membrane lipids using FTIR

Phase transitions (methylene group stretching vibration) and membrane interfacial conformation (ester group stretching vibration) of DPPG and DMPC vesicles were monitored in the absence or presence of MccJ25, **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** using FTIR spectroscopy.

Lipid phase transition. Two main lipid-chain C-H stretching vibration bands appear around 2918 and 2850 cm^{-1} , assigned respectively to the anti-symmetric $V_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ and symmetric $V_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ methylene stretching modes. Thermotropism is a lipid-state transition obtained in response to changes in temperature. FTIR spectra are characterized by a shift in C-H stretching vibration bands due to lipid thermotropism. These bands have been used extensively as a probe for monitoring lipid-phase transition (Gaussier et al. 2003). Figure 7 presents the FTIR spectra of CH_2 stretching vibration of DPPG as a function of temperature in the absence and presence of the different peptides.

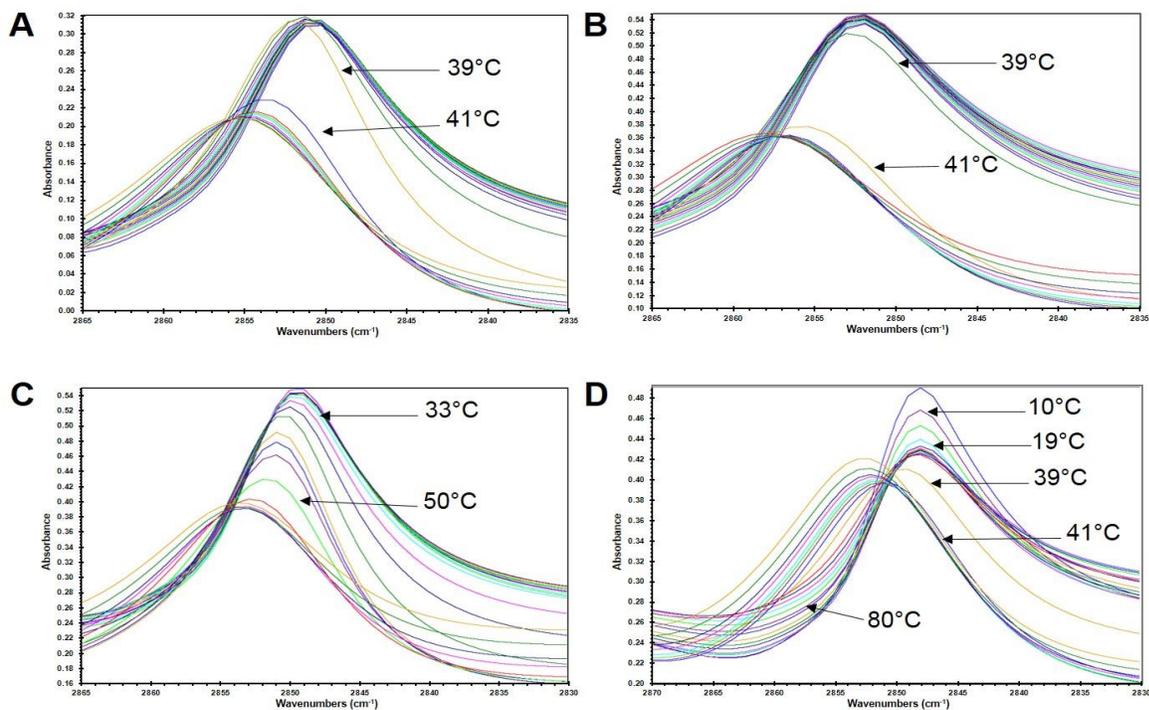


Figure 7. FTIR spectra showing the band corresponding to symmetric methylene stretching vibration $V_s(\text{CH}_2)$ of pure DPPG at pD 6 (A) and mixtures of DPPG and peptides **C1** (B), **7-21C** (C) or **WK_7-21** (D).

Figure 8 shows the $V_s(\text{CH}_2)$ thermal transition curves. The midpoint of the curves represents the transition temperatures (T_m), which were 40 °C and 23 °C respectively for pure DPPG and DMPC. These values are in agreement with those in the literature (Gaussier et al. 2003; Severcan and Dorohoi 2008). The mixtures of DMPC with each individual peptide all had the same T_m profile, indicating that none of the tested peptides interacted with or altered the conformation of the acyl chains. In contrast, the T_m profile obtained in the case of DPPG was different for each peptide. **C1** did not alter acyl chain conformation, since neither the T_m nor the wavelength of the $V_s(\text{CH}_2)$ mode in the gel and liquid-crystalline phases were changed, while **7-21C** caused T_m shifts over the 33–50 °C range, indicating that it interacts with the DPPG and promotes gel phase stabilization. In the case of **WK_7-21**, two transition stages were clearly distinguished. The first was in the 10–19 °C range, well below the transition temperature of pure DPPG, followed by a gradual transition in the 39–80 °C range. These results indicate that peptide **WK_7-21** is able to interact with and penetrate the hydrophobic core of DPPG bilayers regardless of temperature, while peptide **7-21C** interacts with DPPG only around the transition temperature.

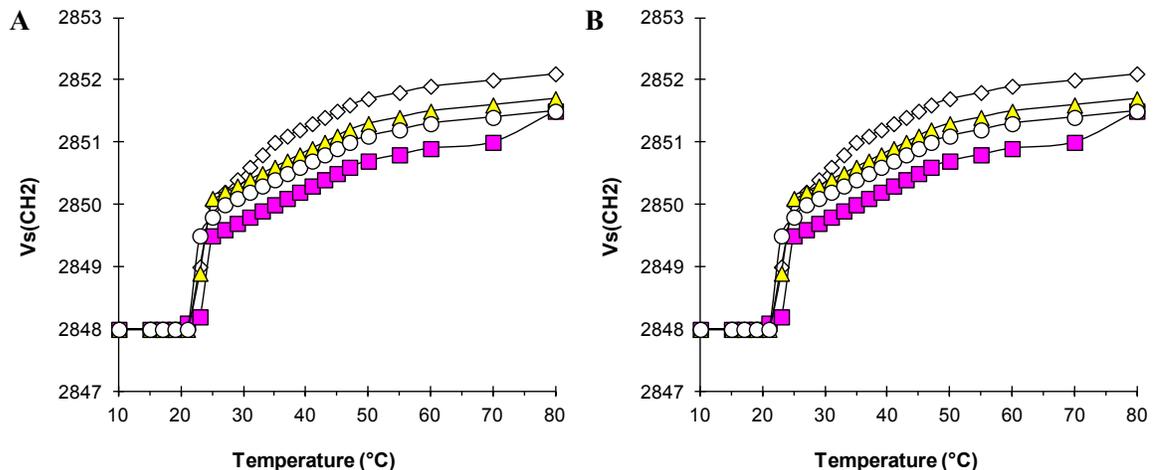


Figure 8. Acyl chain transition temperature for DPPG (A) and DMPC (B) in the absence or presence of the different peptides, as revealed by the shift in the $V_s(\text{CH}_2)$ band of the FTIR spectra. DPPG (black diamond); DMPC (white diamond); **C1** (square); **7-21** (triangle).

Effect on membrane interfacial regions. Phospholipid-ester-group ($\text{C}=\text{O}$) stretching vibration appears as a band at 1740 cm^{-1} , which can provide information on the degree of hydration and conformation of the membrane interfacial region. Figure 9A shows the FTIR spectra of pure DPPG and mixtures of DPPG with each individual peptide. Like pure DPPG, the mixture of DPPG and peptide **C1** spectra showed modification at $41\text{ }^\circ\text{C}$. Around the T_m , the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration band at 1740 cm^{-1} undergoes a sharp drop accompanied by a shift towards a longer wavenumber and a dramatic narrowing as the gel phase is converted into the liquid-crystalline phase. In the mixture of DPPG and peptide **7-21C**, this change occurred at a lower temperature range ($31\text{--}37\text{ }^\circ\text{C}$), while in the DPPG/peptide **WK_7-21** mixture it occurred over a much wider range ($10\text{--}41\text{ }^\circ\text{C}$). No differences were observed between pure DMPC and DMPC/peptide mixtures. FTIR analysis of ester group stretching vibration confirmed the lipid phase transition results. Peptide **WK_7-21** is able to interact with and penetrate anionic membranes such as DPPG, while no interaction occurs in the case of zwitterionic membranes like DMPC.

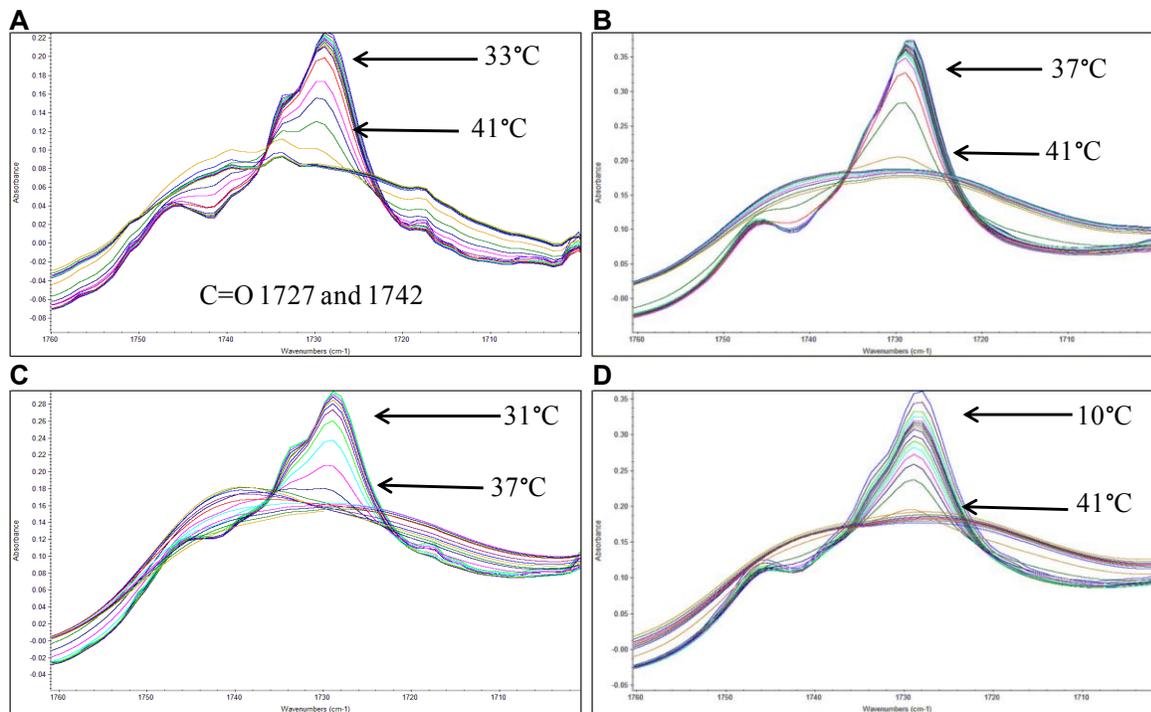


Figure 9. FTIR spectra showing the ester group (C=O) stretching vibration band at 1740 cm⁻¹ for DPPG alone (A) and in the presence of **C1** (B), **7-21C** (C) and **WK_7-21** (D)

DISCUSSION

MccJ25 exhibits bactericidal activity toward several gram-negative food-borne pathogens including disease-causing pathogens such as *Salmonella* and *E. coli* (Sable et al. 2000; Vincent et al. 2004; Destoumieux-Garzón et al. 2005; Soudy et al. 2012). The particular lasso conformation of MccJ25 makes it highly thermostable and resistant to denaturation and proteolysis, which are attractive properties for both food and pharmaceutical applications. The structure-activity relationships of MccJ25 were previously assessed by mutational analyses and site-directed mutagenesis which provided a more detailed information about its antibacterial activity and targets (Yuzenkova et al. 2002; Pan and Link 2011; Pavlova et al. 2008; Pan et al. 2011; Ducasse et al. 2012). These studies highlighted tolerance of MccJ25 to a number of residue substitutions.

Attempts at chemical synthesis of the lasso structure of MccJ25 so far have been unsuccessful, yielding a loop-tail topology rather than a lasso (Ferguson et al. 2010), and no synthesized derivative peptide as potent as natural MccJ25 has been reported. Based on results obtained by Soudy et al. (2012), we hypothesized that the lasso contributes to MccJ25 activity but is not essential, and that potent derived peptides without this structure may be obtained. In this study, we synthesized various MccJ25-derived peptides, modified by substitutions and/or truncation, some of which were inhibitory to *S. enterica* and *E. coli*. Since **C1**, **7-21C** and **WK_7-21** were all at least ten times less potent than MccJ25, the constrained lasso structure might be more than somewhat important for antibacterial action.

Soudy et al. (2012) reported antibacterial activity for similar sequences lacking lasso-folding with reduced activity compared to native microcin. Additionally, at higher concentrations, these peptides inhibited Gram-positive bacteria (MIC \geq 250 μ M). Peptide **WK_7-21** contains positive charges and a hydrophobic patch, which could explain its greater interaction with membrane phospholipids. While MccJ25 uptake into bacterial cells is dependent on the FhuA receptor, **WK_7-21** could reach the cytoplasm via non-specific interactions with membrane phospholipids. A number of reports point to the potential of MccJ25 for interacting with bacterial membranes (Rintoul et al. 2001; Dupuy and Morero 2011; Dupuy et al. 2009). Dupuy et al. (2009) observed co-sedimentation of fluorescein-labeled MccJ25 with bacterial membranes, suggesting microcin-membrane interaction. In the present study, we observed based on lipid-phase transition of phospholipids that **WK_7-21** was able to interact with and penetrate anionic membranes like DPPG while no

interactions occurred in the case of zwitterionic membranes such as DMPC. Increasing the number of basic and hydrophobic residues could facilitate peptide electrostatic interaction with and subsequent penetration of lipid bilayers, as has been observed for several cationic antibacterial peptides (Chan et al. 2006). This likely had an impact on the mode of action of **WK_7-21** by making it structurally similar to cationic antimicrobial peptides. Although these too interact strongly with cell membranes, they might also act on other molecular targets or cell processes by binding to a variety of anionic and hydrophobic molecules such as DNA, proteins and cell membranes (Hale and Hancock 2007).

MccJ25 inhibits transcription by binding in the secondary channel of RNAP and thereby blocking substrate access to the catalytic site (Semenova et al. 2005). The tyrosine residue at position 9 of the MccJ25 peptide has been shown essential for RNAP inhibition with no compatible substitutions (Pavlova et al. 2008). Noteworthy, all the active peptides synthesized in this study lack the lasso structure but keep tyrosine 9, which has been shown to be essential to RNAP inhibition. Other residues, namely at positions 4 (glycine), 7 (proline), 10 (phenylalanine) and 19 (phenylalanine) are reportedly important but not strictly essential for MccJ25 binding to RNAP (Pavlova et al. 2008). In the present study, we observed that MccJ25-derived peptides lacking the lasso structure were able to inhibit *in vitro* RNAP at high concentrations (5 and 50 μ M). Although these peptides presumably bound to RNAP, it is not possible to deduce that they share a common binding site with MccJ25. Pavlova et al. (2008) reported that the RNAP/MccJ25 interaction involves primarily hydrophobic interaction. Since the active MccJ25-derived peptides had phenylalanine residues at positions 10 and 19 and tyrosine at position 9, these might be involved in the inhibition of RNAP. On the other hand, in the case of **WK_7-21**, the KWK pattern at the N-terminus could be involved. This pattern is known to bind to DNA (Johnson et al. 1996). The respiratory apparatus of *S. enterica* could be a target for **WK_7-21**, **C1** and **7-21C**, as it is for MccJ25. Uptake of these peptides inside cells leads to increased superoxide production, oxidative damage of biologically important molecules, and ultimately cell death. Although Soudy et al. (2012) did not report RNAP binding of the two inhibitory peptides (**1** and **6**), such activity is possible and should be investigated. Further studies are required in order to decipher the precise molecular mechanism of these and other MccJ25-derived peptides.

These findings put forward the possibility of producing MccJ25-derived peptides lacking the lasso structure but nevertheless conserving antibacterial activity. The presence of the lasso constrains the structure of MccJ25 while conferring to it potent antibacterial activity.

MccJ25-derived peptides lacking the lasso but otherwise constrained in a rigid overall structure, for example by disulfide bonds, could be strongly antibacterial. A rigid topology close to that of MccJ25 appears to make the molecule a more potent antibacterial agent. For the moment, it cannot be ruled out that the mechanisms of action of the natural MccJ25 and its synthetic derived-peptides are different.

Acknowledgments

The authors express their gratefulness to Sophie Sablé for providing the *E. coli* strain harboring the plasmid pTUC202. François Bédard thanks the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds d'enseignement et de recherche de la Faculté de pharmacie de l'Université Laval for scholarships. The financial support of the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FQRNT) is gratefully acknowledged.

Conflict of interest

The authors declare that no personal relationship or interest had any influence on the design, execution, analysis or interpretation of the experiments reported herein.

REFERENCES

Bayro MJ, Mukhopadhyay J, Swapna GVT, Huang JY, Ma L-C, Sineva E, Dawson PE, Montelione GT, Ebright RH (2003) Structure of Antibacterial Peptide Microcin J25: A 21-Residue Lariat Protoknot. *J Am Chem Soc* 125 (41):12382-12383. doi:10.1021/ja036677e

Bellomio A, Rintoul MR, Morero RD (2003) Chemical modification of microcin J25 with diethylpyrocarbonate and carbodiimide: evidence for essential histidyl and carboxyl residues. *Biochem Biophys Res Commun* 303 (2):458-462

Bellomio A, Vincent PA, de Arcuri BF, Farías RN, Morero RD (2007) Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J Bacteriol* 189 (11):4180-4186. doi:10.1128/jb.00206-07

Bellomio A, Vincent PA, de Arcuri BF, Salomón RA, Morero RD, Farías RN (2004) The microcin J25 beta-hairpin region is important for antibiotic uptake but not for RNA polymerase and respiration inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 325 (4):1454-1458. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.186

Blond A, Cheminant M, Destoumieux-Garzón D, Ségalas-Milazzo I, Peduzzi J, Goulard C, Rebuffat S (2002) Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur J Biochem* 269 (24):6212-6222

Bollhagen R, Schmiedberger M, Barlos K, Grell E (1994) A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotriyl chloride resin. *J Chem Soc, Chem Commun* 0 (22):2559-2560. doi:10.1039/C39940002559

Braun V (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* 16 (4):295-307

Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ (2006) Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (9):1184-1202. doi:10.1016/j.bbamem.2006.04.006

Choudhury HG, Tong Z, Mathavan I, Li Y, Iwata S, Zirah S, Rebuffat S, van Veen HW, Beis K (2014) Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (25):9145-9150. doi:10.1073/pnas.1320506111

Clarke DJ, Campopiano DJ (2007) Maturation of MccJ25 precursor peptide into active microcin MccJ25. *Org Biomol Chem* 5 (16):2564-2566

de Cristóbal RE, Solbiati JO, Zenoff AM, Vincent PA, Salomón RA, Yuzenkova J, Severinov K, Farías RN (2006) Microcin J25 uptake: His5 of the MccJ25 lariat ring is involved in interaction with the inner membrane MccJ25 transporter protein SbmA. *J Bacteriol* 188 (9):3324-3328. doi:10.1128/jb.188.9.3324-3328.2006

Delgado MA, Rintoul MR, Farías RN, Salomón RA (2001) Escherichia coli RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol* 183 (15):4543-4550. doi:10.1128/jb.183.15.4543-4550.2001

Destoumieux-Garzón D, Duquesne S, Peduzzi J, Goulard C, Desmadril M, Letellier L, Rebuffat S, Boulanger P (2005) The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem J* 389 (Pt 3):869-876. doi:10.1042/bj20042107

Ducasse R, Yan K-P, Goulard C, Blond A, Li Y, Lescop E, Guittet E, Rebuffat S, Zirah S (2012) Sequence determinants governing the topology and biological activity of a lasso peptide, microcin J25. *Chembiochem* 13 (3):371-380. doi:10.1002/cbic.201100702

Dupuy F, Morero R (2011) Microcin J25 membrane interaction: Selectivity toward gel phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (6):1764-1771. doi:10.1016/j.bbamem.2011.02.018

Dupuy FG, Chirou MV, de Arcuri BF, Minahk CJ, Morero RD (2009) Proton motive force dissipation precludes interaction of microcin J25 with RNA polymerase, but enhances reactive oxygen species overproduction. *Biochimica et biophysica acta* 1790 (10):1307-1313. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.006

Ferguson AL, Zhang S, Dikiy I, Panagiotopoulos AZ, Debenedetti PG, James Link A (2010) An experimental and computational investigation of spontaneous lasso formation in microcin J25. *Biophys J* 99 (9):3056-3065. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.073

Fields GB, Noble RL (1990) Solid-Phase Peptide-Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Acids. *Int J Pept Prot Res* 35 (3):161-214

Gaussier H, Lefèvre T, Subirade M (2003) Binding of Pediocin PA-1 with Anionic Lipid Induces Model Membrane Destabilization. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11):6777-6784. doi:10.1128/AEM.69.11.6777-6784.2003

Hale JD, Hancock RE (2007) Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 5 (6):951-959. doi:doi:10.1586/14787210.5.6.951

Hammami R, Zouhir A, Hamida JB, Neffati M, Vergoten G, Naghmouchi K, Fliss I (2009) Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia. *Pharm Biol* 47 (5):452-457. doi:10.1080/13880200902822604

Johnson NP, Mazarguil H, Lopez A (1996) Strandedness Discrimination in Peptide-Polynucleotide Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 271 (33):19675-19679. doi:10.1074/jbc.271.33.19675

Kelly SM, Price NC (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1 (4):349-384

Liu S, Zhou L, Li J, Suresh A, Verma C, Foo YH, Yap EPH, Tan DTH, Beuerman RW (2008) Linear Analogues of Human β -Defensin 3: Concepts for Design of Antimicrobial Peptides with Reduced Cytotoxicity to Mammalian Cells. *ChemBioChem* 9 (6):964-973. doi:10.1002/cbic.200700560

Lopez FE, Vincent PA, Zenoff AM, Salomón RA, Farías RN (2007) Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of Salmonella infection. *J Antimicrob Chemother* 59 (4):676-680. doi:10.1093/jac/dkm009

Mukhopadhyay J, Sineva E, Knight J, Levy RM, Ebright RH (2004) Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol Cell* 14 (6):739-751. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.010

Niklison Chirou M, Bellomio A, Dupuy F, Arcuri B, Minahk C, Morero R (2008) Microcin J25 induces the opening of the mitochondrial transition pore and cytochrome c release through superoxide generation. *FEBS J* 275 (16):4088-4096. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06550.x

Pan SJ, Cheung WL, Fung HK, Floudas CA, Link AJ (2011) Computational design of the lasso peptide antibiotic microcin J25. *Protein Eng Des Sel* 24 (3):275-282. doi:10.1093/protein/gzq108

Pan SJ, Link AJ (2011) Sequence diversity in the lasso peptide framework: discovery of functional microcin J25 variants with multiple amino acid substitutions. *J Am Chem Soc* 133 (13):5016-5023. doi:10.1021/ja1109634

Patel G, Husman W, Jehanli AM, Deadman JJ, Green D, Kakkar VV, Brennand DM (1999) A cyclic peptide analogue of the loop III region of platelet-derived growth factor-BB is a synthetic antigen for the native protein. *J Pept Res* 53 (1):68-74. doi:DOI 10.1111/j.1399-3011.1999.tb01618.x

Pavlova O, Mukhopadhyay J, Sineva E, Ebright RH, Severinov K (2008) Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J Biol Chem* 283 (37):25589-25595. doi:10.1074/jbc.M803995200

Rintoul MaR, de Arcuri BF, Salomón RA, Fariás RN, Morero RD (2001) The antibacterial action of microcin J25: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella newport*. *FEMS Microbiology Letters* 204 (2):265-270. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10895.x

Rosengren KJ, Clark RJ, Daly NL, Göransson U, Jones A, Craik DJ (2003) Microcin J25 Has a Threaded Sidechain-to-Backbone Ring Structure and Not a Head-to-Tail Cyclized Backbone. *J Am Chem Soc* 125 (41):12464-12474. doi:10.1021/ja0367703

Sable S, Pons AM, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G (2000) Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66 (10):4595-4597

Salomón RA, Farías RN (1993) The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J Bacteriol* 175 (23):7741-7742

Salomón RA, Farías RN (1995) The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J Bacteriol* 177 (11):3323-3325

Semenova E, Yuzenkova Y, Peduzzi J, Rebuffat S, Severinov K (2005) Structure-Activity Analysis of Microcin J25: Distinct Parts of the Threaded Lasso Molecule Are Responsible for Interaction with Bacterial RNA Polymerase. *J Bacteriol* 187 (11):3859-3863. doi:10.1128/jb.187.11.3859-3863.2005

Severcan F, Dorohoi DO (2008) FTIR studies of temperature influence on the DPPG model membrane. *Journal of Molecular Structure* 887 (1-3):117-121. doi:10.1016/j.molstruc.2008.02.039

Solbiati JO, Ciaccio M, Farías RN, Salomón RA (1996) Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J Bacteriol* 178 (12):3661-3663

Soudy R, Wang L, Kaur K (2012) Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. *Bioorg Med Chem* 20 (5):1794-1800. doi:10.1016/j.bmc.2011.12.061

Sreerama N, Woody RW (2004) Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. In: Ludwig B, Michael LJ (eds) *Methods in Enzymology*, vol Volume 383. Academic Press, pp 318-351. doi:10.1016/S0076-6879(04)83013-1

Tam JP, Wu CR, Liu W, Zhang JW (1991) Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl-Sulfoxide - Scope and Applications. *J Am Chem Soc* 113 (17):6657-6662. doi:10.1021/Ja00017a044

Vincent PA, Bellomio A, de Arcuri BF, Farías RN, Morero RD (2005) MccJ25 C-terminal is involved in RNA-polymerase inhibition but not in respiration inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 331 (2):549-551. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.220

Vincent PA, Delgado MA, Farías RN, Salomón RA (2004) Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiol Lett* 236 (1):103-107. doi:10.1016/j.femsle.2004.05.027

Wilson K-A, Kalkum M, Ottesen J, Yuzenkova J, Chait BT, Landick R, Muir T, Severinov K, Darst SA (2003) Structure of Microcin J25, a Peptide Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase, is a Lassoed Tail. *J Am Chem Soc* 125 (41):12475-12483. doi:10.1021/ja036756q

Yan K-P, Li Y, Zirah S, Goulard C, Knappe TA, Marahiel MA, Rebuffat S (2012) Dissecting the Maturation Steps of the Lasso Peptide Microcin J25 in vitro. *ChemBioChem* 13 (7):1046-1052. doi:10.1002/cbic.201200016

Yuzenkova J, Delgado M, Nechaev S, Savalia D, Epshtein V, Artsimovitch I, Mooney RA, Landick R, Farias RN, Salomon R, Severinov K (2002) Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J Biol Chem* 277 (52):50867-50875. doi:10.1074/jbc.M209425200

Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms

Riadh Hammami, François Bédard, Ahmed Gomaa, Muriel Subirade, Eric Biron and Ismail Fliss

Amino acids 2014.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Secondary structures of MccJ25 derivatives alone or in POPC, POPE and POPG vesicles based on CD spectroscopy.

Secondary structure	MccJ25				C1				7-21				WK_7-21			
	alone	POPC	POPG	POPE	alone	POPC	POPG	POPE	alone	POPC	POPG	POPE	alone	POPC	POPG	POPE
Helix	0.06	0.05	0.03	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04
Sheet	0.38	0.39	0.40	0.42	0.34	0.37	0.4	0.42	0.36	0.43	0.25	0.20	0.38	0.39	0.40	0.42
Turn	0.15	0.13	0.23	0.22	0.20	0.26	0.23	0.22	0.21	0.19	0.28	0.28	0.21	0.23	0.23	0.22
Unordered	0.42	0.38	0.34	0.32	0.44	0.33	0.34	0.32	0.40	0.35	0.46	0.52	0.39	0.38	0.34	0.32

CHAPITRE 5
DISCUSSION ET CONCLUSION

5.1 Discussion générale

Tel que vu dans les chapitres précédents, le design des analogues c'est fait *in silico* en se basant sur la séquence primaire en acides aminés de la MccJ25, mais aussi en plusieurs étapes. De plus, la modélisation par homologie a des avantages et des inconvénients. Elle permet d'obtenir une structure rapidement avec un bon taux de certitude. Cependant, le logiciel fait en sorte que le plus souvent pour que les séquences homologues se placent aux mêmes endroits que la structure sur laquelle est basée l'homologie, ce qui peut fausser les données dans certains cas, par exemple l'ajout ou le retrait de prolines. Il existe d'autres méthodes qui sont plus gourmandes en puissance de calcul et qui prennent beaucoup plus de temps à réaliser les structures tridimensionnelles *in silico*. Par exemple, la dynamique moléculaire qui doit faire le calcul des interactions entre chaque atome du système incluant le solvant sur une trajectoire donnée, c'est-à-dire quelques nanosecondes pour équilibrer le système. Cette dernière méthode est plus représentative des vraies structures et pourrait être utilisée lors de travaux futurs.

La synthèse de tous les analogues s'est bien déroulée. La longueur de la chaîne peptidique, ainsi que la séquence sont très déterminantes dans la pureté des produits obtenus. En effet, la limite d'acides aminés sur le support solide tel que le polystyrène est d'environ 30 acides aminés selon les séquences. Les groupements protecteurs tels que les trityls favorisent le repliement de la chaîne peptidique vers le support par interactions hydrophobes et empilements aromatiques, donc plus la chaîne peptidique est lourdement protégée, plus la séquence sera difficile à obtenir avec un haut degré de pureté. D'autres résines telles que celles à base de polyéthylènes glycols (PEGs) peuvent faire des peptides beaucoup plus longs, car les interactions avec la chaîne peptidique sont beaucoup plus faibles. Cependant, la séquence de la MccJ25 est relativement courte, 21 acides aminés, et contient peu de groupements fonctionnels qui ont besoin d'être protégés durant la synthèse. Les seuls qui ont besoin de ses groupements sont l'histidine, la tyrosine, la sérine, la thréonine et les cystéines/acide glutamique s'il y a lieu. De plus, seules l'histidine et les cystéines ont des groupements protecteurs aromatiques comme le trityl. La résine polystyrène est reconnue pour être mécaniquement et chimiquement très stable et a donc été un support de choix pour cette étude.

Les liens amides sont très efficaces pour créer une structure rigide de manière permanente et c'est probablement une des raisons pourquoi la MccJ25 native utilise ce type

de lien. Tel que mentionné au chapitre 3.2.1, nous avons opté pour la protection de la chaîne latérale de l'acide glutamique. Un autre côté pratique de cette cyclisation est la possibilité de former le cycle sur support solide, ce qui augmente les rendements en empêchant la formation de polymères du peptide. De plus, la purification est très simplifiée, car l'excédent de base et d'activateurs est lavé en laissant uniquement le peptide cyclisé sur le support.

Les ponts disulfures sont moins stables que les liens amides, car ils sont en équilibre et non liés de façon covalente. Toutefois, ils ont beaucoup moins de contraintes par rapport au nombre d'acides aminés entre les résidus pour la formation optimale du pont disulfure. En effet, on peut facilement faire un pont entre deux cystéines distantes de six résidus aussi bien que douze résidus. Comparativement, le lien possède certaine limite aussi bien au niveau de la tension de cycle pour les petits macrocycles de 3 à 4 résidus que pour les macrocycles de grandes tailles dont la cyclisation sera significativement plus lente et le rendement plus faible en plus d'être en compétition avec la dimérisation.¹⁰⁵

Il existe dans la littérature de nombreuses façons de former un pont disulfure avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Pour cette raison nous avons dû tester différentes procédures et optimiser une synthèse permettant de faire la cyclisation désirée. Il est possible de former les ponts disulfures sur support solide, par exemple via l'utilisation des groupements protecteurs Acm sur le soufre de la cystéine. La déprotection peut s'effectuer sélectivement à l'aide du trifluoroacétate de thallium (III) ((CF₃COO)₃Tl). La déprotection et l'oxydation pour former le pont sont très rapides et nécessitent environ deux fois 45 minutes. Cependant, le thallium est très toxique, mais aussi incompatible avec les fonctions alcools telles que les sérines et les thréonines.¹⁰⁶ Certaines méthodes de cyclisation plus lentes se font uniquement en présence d'air comme agent oxydant et d'autres réactifs comme l'iode (I₂). Ce dernier aussi est toxique et interfère avec les sulfures des cystéines. Lors des essais avec les groupements protecteurs Acm, nous avons été incapables d'obtenir des produits avec des puretés acceptables en utilisant l'iode ou le thallium.

Nous avons donc opté pour la méthode de cyclisation des ponts en solution à l'aide du DMSO, un agent oxydant faible qui peut être évaporé.¹⁰⁵ Cette méthode, qui fonctionne très bien avec un mélange de 20% DMSO dans l'eau, a été optimisée au cours de cette étude à des fins pratiques, car le DMSO peut faire des ponts hydrogènes avec l'eau qui sont encore plus favorables que l'eau ou le DMSO purs,¹⁰⁷ ce qui a pour effet d'abaisser le point

de congélation et de rendre la lyophilisation beaucoup plus difficile. C'est pourquoi un mélange 80% DMSO/eau a été adopté pour favoriser la lyophilisation. Cependant, la réaction prend environ deux fois plus de temps à se produire.

À la fin de ce projet nous avons pris connaissance d'un nouveau procédé pour former les ponts disulfure à l'aide d'un agent oxydant faible et sélectif pour les soufres, le *N*-chlorosuccinimide (NCS).¹⁰⁸ Il réduit le temps de formation d'un pont disulfure à 15 minutes et se fait dans un mélange H₂O/ACN (50/50) qui peut facilement être lyophilisé. Cette méthode est maintenant la procédure de formation des ponts disulfures qui est utilisée dans notre laboratoire. Elle aurait certainement permis de réduire significativement les temps de cyclisation lors de la synthèse des analogues et sera assurément exploitée pour la synthèse des prochaines séries d'analogues de la MccJ25.

5.2 Conclusion

Lors de cette étude, nous avons pu confirmer notre hypothèse de départ, c'est-à-dire qu'il était possible d'obtenir de l'activité antibactérienne avec des analogues de la MccJ25, sans passer par la structure en lasso de la MccJ25 native. Nous avons effectué le design par une approche computationnelle d'analogues de la MccJ25 en respectant le plus possible sa structure tridimensionnelle et réalisé leur synthèse par voie chimique sur support solide. Ensuite des tests d'activité antibactérienne avec les analogues générés ont permis d'observer une certaine modification du spectre d'activité et d'étudier des modes d'action exploités par les composés actifs. La détermination des structures tridimensionnelles des analogues les plus actifs comme la **C1**, **WK_7-21** et la **7-21C** par RMN ou cristallographie serait nécessaire pour conclure l'étude structure-activité, car bien que les séquences primaires des analogues soient très similaires à celle de la MccJ25 et que les analyses computationnelles démontrent des similitudes, la structure réelle pourrait être très différente même en conservant l'activité et la séquence primaire similaire. Un prochain défi de cette étude pourrait être de synthétiser la MccJ25 native. Bien que l'hypothèse de départ soit qu'il était difficile d'en faire la synthèse totale, des avancées dans d'autres domaines de la chimie organique telle que la possibilité de synthétiser la MccJ25 comme un rotaxane et non comme un peptide pourraient permettre la synthèse complète de la MccJ25 native.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. A. Arias, and B. E. Murray, 'Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge', *N Engl J Med*, 360 (2009), 439-43. doi: 10.1056/NEJMp0804651
- 2 C. f. D. C. a. Prevention, 'ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States'2013) <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>> [Accessed May 28, 2014 2014].
- 3 H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett, 'Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America', *Clinical Infectious Diseases*, 48 (2009), 1-12. doi: 10.1086/595011
- 4 P. G. Higgins, C. Dammhayn, M. Hackel, and H. Seifert, 'Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*', *J Antimicrob Chemother*, 65 (2010), 233-8. doi: 10.1093/jac/dkp428
- 5 V. M. D'Costa, C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar, and G. D. Wright, 'Antibiotic resistance is ancient', *Nature*, 477 (2011), 457-61. doi: 10.1038/nature10388
- 6 M. N. Alekshun, and S. B. Levy, 'Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance', *Cell*, 128 (2007), 1037-50. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004
- 7 D. I. Andersson, and D. Hughes, 'Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?', *Nat Rev Microbiol*, 8 (2010), 260-71. doi: 10.1038/nrmicro2319
- 8 K. Lewis, 'Platforms for antibiotic discovery', *Nat Rev Drug Discov*, 12 (2013), 371-87. doi: 10.1038/nrd3975
- 9 C. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance* (ASM Press, 2003).
- 10 PhRMA, '2013 Biopharmaceutical Research Industry Profile', (Washington, DC: Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2013).
- 11 Bayer-HealCare, 'Processes in Research and Development', Bayer Pharma AG, (<<http://www.bayerpharma.com/en/research-and-development/processes/index.php>> [Accessed August 20, 2014.
- 12 L. L. Silver, 'Challenges of antibacterial discovery', *Clin Microbiol Rev*, 24 (2011), 71-109. doi: 10.1128/CMR.00030-10
- 13 M. N. Alekshun, 'New advances in antibiotic development and discovery', *Expert Opin Investig Drugs*, 14 (2005), 117-34. doi: 10.1517/13543784.14.2.117
- 14 P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross, 'Bacteriocins: developing innate immunity for food', *Nat Rev Microbiol*, 3 (2005), 777-88. doi: 10.1038/nrmicro1273
- 15 M. A. Riley, 'Molecular mechanisms of bacteriocin evolution', *Annu Rev Genet*, 32 (1998), 255-78. doi: 10.1146/annurev.genet.32.1.255
- 16 I. F. Nes, and O. Johnsborg, 'Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics', *Curr Opin Biotechnol*, 15 (2004), 100-4. doi: 10.1016/j.copbio.2004.02.001
- 17 M. Bonini, A. C. Maringoni, and J. Rodrigues Neto, 'Characterization of *Xanthomonas* spp. strains by bacteriocins', *Summa Phytopathologica*, 33 (2007), 24-29.
- 18 A. Giuliani, G. Pirri, and S. Nicoletto, 'Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics', *Central European Journal of Biology*, 2 (2007), 1-33. doi: 10.2478/s11535-007-0010-5
- 19 H. Lee, and H. Y. Kim, 'Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*', *J Microbiol Biotechnol*, 21 (2011), 229-35.
- 20 D. J. Derksen, J. L. Stymiest, and J. C. Vederas, 'Antimicrobial leucocin analogues with a disulfide bridge replaced by a carbocycle or by noncovalent interactions of allyl glycine residues', *J Am Chem Soc*, 128 (2006), 14252-3. doi: 10.1021/ja066203q
- 21 K. Kaur, L. C. Andrew, D. S. Wishart, and J. C. Vederas, 'Dynamic Relationships among Type IIa Bacteriocins: Temperature Effects on Antimicrobial Activity and on Structure of the C-Terminal Amphipathic α Helix as a Receptor-Binding Region†', *Biochemistry*, 43 (2004), 9009-20. doi: 10.1021/bi036018e

- 22 J. Rihakova, V. W. Petit, K. Demnerova, H. Prevost, S. Rebuffat, and D. Drider, 'Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity', *Appl Environ Microbiol*, 75 (2009), 1811-9. doi: 10.1128/AEM.02266-08
- 23 H. S. Haugen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, 'Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1', *Appl Environ Microbiol*, 77 (2011), 1966-72. doi: 10.1128/AEM.02488-10
- 24 H. S. Haugen, P. E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, 'Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes', *Appl Environ Microbiol*, 74 (2008), 6766-73. doi: 10.1128/AEM.01068-08
- 25 G. Fimland, V. G. Eijsink, and J. Nissen-Meyer, 'Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide', *Biochemistry*, 41 (2002), 9508-15.
- 26 J. Nissen-Meyer, C. Oppgaard, P. Rogne, H. S. Haugen, and P. E. Kristiansen, 'Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins', *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2 (2010), 52-60. doi: 10.1007/s12602-009-9021-z
- 27 L. Martin-Visscher, M. Belkum, and J. Vederas, 'Class IIc or Circular Bacteriocins', in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, ed. by D. Drider and S. Rebuffat (Springer New York, 2011), pp. 213-36.
- 28 L. M. Cintas, P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez, and I. F. Nes, 'Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum', *Appl Environ Microbiol*, 63 (1997), 4321-30.
- 29 M. Sanchez-Hidalgo, M. Montalban-Lopez, R. Cebrian, E. Valdivia, M. Martinez-Bueno, and M. Maqueda, 'AS-48 bacteriocin: close to perfection', *Cell Mol Life Sci*, 68 (2011), 2845-57. doi: 10.1007/s00018-011-0724-4
- 30 N. Sawa, T. Zendo, J. Kiyofuji, K. Fujita, K. Himeno, J. Nakayama, and K. Sonomoto, 'Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12', *Appl Environ Microbiol*, 75 (2009), 1552-8. doi: 10.1128/AEM.02299-08
- 31 C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, and W. A. van der Donk, 'Biosynthesis and mode of action of lantibiotics', *Chem Rev*, 105 (2005), 633-84. doi: 10.1021/cr030105v
- 32 N. Schnell, K. D. Entian, U. Schneider, F. Gotz, H. Zahner, R. Kellner, and G. Jung, 'Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings', *Nature*, 333 (1988), 276-8. doi: 10.1038/333276a0
- 33 G. Bierbaum, and H. G. Sahl, 'Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering', *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (2009), 2-18.
- 34 J. M. Willey, and W. A. van der Donk, 'Lantibiotics: peptides of diverse structure and function', *Annu Rev Microbiol*, 61 (2007), 477-501. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093501
- 35 S. M. Asaduzzaman, A. Al-Mahin, T. Bashar, and R. Noor, 'Lantibiotics: A Candidate for Future Generation of Antibiotics', *Stamford Journal of Microbiology; Vol 1, No 1 (2011)*.
- 36 H.-G. Sahl, and G. Bierbaum, 'Multiple activities of natural agents such as defensins and bacteriocins suggest a change in strategy when developing new antimicrobials', *Microbe*, 3 (2008), 467-73.
- 37 D. Drider, G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, and H. Prevost, 'The continuing story of class IIa bacteriocins', *Microbiol Mol Biol Rev*, 70 (2006), 564-82. doi: 10.1128/MMBR.00016-05
- 38 Y. Fleury, M. A. Dayem, J. J. Montagne, E. Chaboisseau, J. P. Le Caer, P. Nicolas, and A. Delfour, 'Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*', *J Biol Chem*, 271 (1996), 14421-9.
- 39 N. L. Fregeau Gallagher, M. Sailer, W. P. Niemczura, T. T. Nakashima, M. E. Stiles, and J. C. Vederas, 'Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria', *Biochemistry*, 36 (1997), 15062-72. doi: 10.1021/bi971263h
- 40 M. Uteng, H. H. Hauge, P. R. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer, and C. Muhle-Goll, 'Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge', *Biochemistry*, 42 (2003), 11417-26. doi: 10.1021/bi034572i

- 41 T. Sprules, K. E. Kawulka, A. C. Gibbs, D. S. Wishart, and J. C. Vederas, 'NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*', *Eur J Biochem*, 271 (2004), 1748-56. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04085.x
- 42 H. S. Haugen, G. Fimland, J. Nissen-Meyer, and P. E. Kristiansen, 'Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A', *Biochemistry*, 44 (2005), 16149-57. doi: 10.1021/bi051215u
- 43 Y. Wang, M. E. Henz, N. L. Gallagher, S. Chai, A. C. Gibbs, L. Z. Yan, M. E. Stiles, D. S. Wishart, and J. C. Vederas, 'Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria', *Biochemistry*, 38 (1999), 15438-47.
- 44 K. Dalet, Y. Cenatiempo, P. Cossart, Y. Hechard, and C. European Listeria Genome, 'A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105', *Microbiology*, 147 (2001), 3263-9.
- 45 Y. Hechard, B. Derijard, F. Letellier, and Y. Cenatiempo, 'Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*', *J Gen Microbiol*, 138 (1992), 2725-31.
- 46 A. K. Bhunia, M. C. Johnson, B. Ray, and N. Kalchayanand, 'Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains', *Journal of Applied Bacteriology*, 70 (1991), 25-33. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb03782.x
- 47 M. L. Chikindas, M. J. Garcia-Garcera, A. J. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings, and G. Venema, 'Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells', *Appl Environ Microbiol*, 59 (1993), 3577-84.
- 48 J. Nissen-Meyer, and I. F. Nes, 'Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action', *Arch Microbiol*, 167 (1997), 67-77.
- 49 H. Helge, F. N. Ingolf, H. Havard Hildeng, F. Gunnar, and M. Jon Nissen, 'Unmodified Peptide-Bacteriocins (Class II) Produced by Lactic Acid Bacteria', in *Peptide Antibiotics* (CRC Press, 2001).
- 50 C. Oppedard, P. Rogne, L. Emanuelsen, P. E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, 'The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action', *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13 (2007), 210-9. doi: 10.1159/000104750
- 51 S. Gameau, N. I. Martin, and J. C. Vederas, 'Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria', *Biochimie*, 84 (2002), 577-92.
- 52 M. Maqueda, M. Sanchez-Hidalgo, M. Fernandez, M. Montalban-Lopez, E. Valdivia, and M. Martinez-Bueno, 'Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria', *FEMS Microbiol Rev*, 32 (2008), 2-22. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x
- 53 K. E. Kawulka, T. Sprules, C. M. Diaper, R. M. Whittal, R. T. McKay, P. Mercier, P. Zuber, and J. C. Vederas, 'Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives', *Biochemistry*, 43 (2004), 3385-95. doi: 10.1021/bi0359527
- 54 X. Gong, L. A. Martin-Visscher, D. Nahirney, J. C. Vederas, and M. Duszyk, 'The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers', *Biochim Biophys Acta*, 1788 (2009), 1797-803. doi: 10.1016/j.bbame.2009.05.008
- 55 M. J. Sanchez-Barrena, M. Martinez-Ripoll, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, V. Cruz, and A. Albert, 'Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state', *J Mol Biol*, 334 (2003), 541-9.
- 56 Y. Kawai, Y. Ishii, K. Arakawa, K. Uemura, B. Saitoh, J. Nishimura, H. Kitazawa, Y. Yamazaki, Y. Tateno, T. Itoh, and T. Saito, 'Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli', *Appl Environ Microbiol*, 70 (2004), 2906-11.
- 57 S. Thennarasu, D. K. Lee, A. Poon, K. E. Kawulka, J. C. Vederas, and A. Ramamoorthy, 'Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A', *Chem Phys Lipids*, 137 (2005), 38-51. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2005.06.003

- 58 I. F. Nes, D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo, 'Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 (1996), 113-28.
- 59 R. W. Worobo, M. J. Van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles, 'A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*', *J Bacteriol*, 177 (1995), 3143-9.
- 60 L. M. Cintas, P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes, and L. S. Havarstein, 'Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins', *J Bacteriol*, 180 (1998), 1988-94.
- 61 F. Yoneyama, Y. Imura, K. Ohno, T. Zendo, J. Nakayama, K. Matsuzaki, and K. Sonomoto, 'Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q', *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (2009), 3211-7. doi: 10.1128/AAC.00209-09
- 62 B. Martinez, A. Rodriguez, and J. E. Suarez, 'Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci', *Microbiology*, 146 (Pt 4) (2000), 949-55.
- 63 C. A. Schindler, and V. T. Schuhardt, 'Lysostaphin: A New Bacteriolytic Agent for the *Staphylococcus*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51 (1964), 414-21.
- 64 J. A. Wu, C. Kusuma, J. J. Mond, and J. F. Kokai-Kun, 'Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces', *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (2003), 3407-14.
- 65 M. C. Bastos, H. Ceotto, M. L. Coelho, and J. S. Nascimento, 'Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications', *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (2009), 38-61.
- 66 N. C. Heng, N. L. Ragland, P. M. Swe, H. J. Baird, M. A. Inglis, J. R. Tagg, and R. W. Jack, 'Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*', *Microbiology*, 152 (2006), 1991-2001. doi: 10.1099/mic.0.28823-0
- 67 J. Stepper, S. Shastri, T. S. Loo, J. C. Preston, P. Novak, P. Man, C. H. Moore, V. Havlicek, M. L. Patchett, and G. E. Norris, 'Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins', *FEBS Lett*, 585 (2011), 645-50. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.023
- 68 T. R. Kouwen, E. N. Trip, E. L. Denham, M. J. Sibbald, J. Y. Dubois, and J. M. van Dijk, 'The large mechanosensitive channel MscL determines bacterial susceptibility to the bacteriocin sublancin 168', *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (2009), 4702-11. doi: 10.1128/AAC.00439-09
- 69 C. Asensio, and J. C. Perez-Diaz, 'A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria', *Biochem Biophys Res Commun*, 69 (1976), 7-14.
- 70 H. Barreteau, A. Bouhss, F. Gerard, D. Duche, B. Boussaid, D. Blanot, R. Lloubes, D. Mengin-Lecreulx, and T. Touze, 'Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme', *J Biol Chem*, 285 (2010), 12378-89. doi: 10.1074/jbc.M109.093583
- 71 E. Cascales, S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard, 'Colicin biology', *Microbiol Mol Biol Rev*, 71 (2007), 158-229. doi: 10.1128/MMBR.00036-06
- 72 I. R. Vetter, M. W. Parker, A. D. Tucker, J. H. Lakey, F. Pattus, and D. Tsernoglou, 'Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity', *Structure*, 6 (1998), 863-74.
- 73 M. El Ghachi, A. Bouhss, H. Barreteau, T. Touze, G. Auger, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx, 'Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors', *J Biol Chem*, 281 (2006), 22761-72. doi: 10.1074/jbc.M602834200
- 74 A. Aguilar, J. C. Perez-Diaz, F. Baquero, and C. Asensio, 'Microcin 15m from *Escherichia coli*: mechanism of antibiotic action', *Antimicrob Agents Chemother*, 21 (1982), 381-6.
- 75 J. F. Garcia-Bustos, N. Pezzi, and E. Mendez, 'Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*', *Antimicrob Agents Chemother*, 27 (1985), 791-7.
- 76 F. Baquero, and F. Moreno, 'The microcins', *FEMS Microbiology Letters*, 23 (1984), 117-24. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb01046.x
- 77 A. Aguilar, F. Baquero, J. L. Martinez, and C. Asensio, 'Microcin 15n: a second antibiotic from *Escherichia coli* LP15', *J Antibiot (Tokyo)*, 36 (1983), 325-7.
- 78 G. Vassiliadis, J. Peduzzi, S. Zirah, X. Thomas, S. Rebuffat, and D. Destoumieux-Garzon, 'Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492

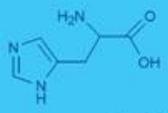
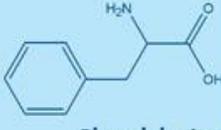
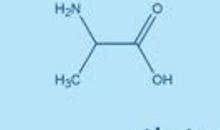
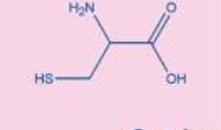
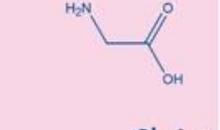
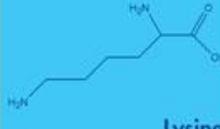
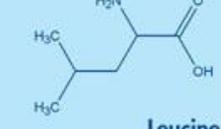
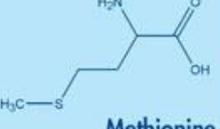
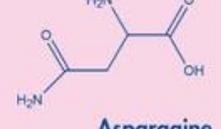
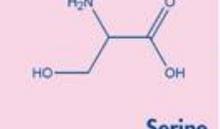
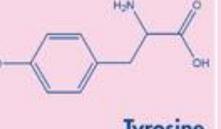
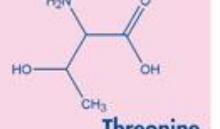
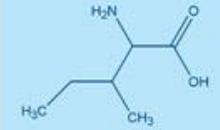
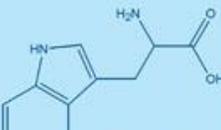
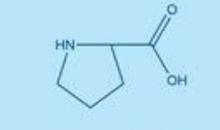
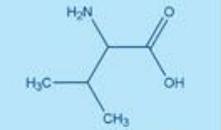
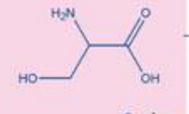
- posttranslational modification', *Antimicrob Agents Chemother*, 51 (2007), 3546-53. doi: 10.1128/AAC.00261-07
- 79 E. M. Nolan, M. A. Fischbach, A. Koglin, and C. T. Walsh, 'Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate', *J Am Chem Soc*, 129 (2007), 14336-47. doi: 10.1021/ja074650f
- 80 X. Thomas, D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, C. Afonso, A. Blond, N. Birlirakis, C. Goulard, L. Dubost, R. Thai, J. C. Tabet, and S. Rebuffat, 'Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity', *J Biol Chem*, 279 (2004), 28233-42. doi: 10.1074/jbc.M400228200
- 81 S. Rebuffat, 'Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria', *Biochem Soc Trans*, 40 (2012), 1456-62. doi: 10.1042/BST20120183
- 82 D. Drider, S. Rebuffat, and SpringerLink (Service en ligne), 'Prokaryotic antimicrobial peptides from genes to applications', (New York: Springer, 2011), pp. 1 texte électronique (xiii, 451 p.).
- 83 S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, and S. Rebuffat, 'Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria', *Nat Prod Rep*, 24 (2007), 708-34. doi: 10.1039/b516237h
- 84 M. F. Pomares, R. A. Salomon, O. Pavlova, K. Severinov, R. Farias, and P. A. Vincent, 'Potential applicability of chymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation', *Appl Environ Microbiol*, 75 (2009), 5734-8. doi: 10.1128/AEM.01070-09
- 85 K. J. Rosengren, A. Blond, C. Afonso, J. C. Tabet, S. Rebuffat, and D. J. Craik, 'Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links', *Biochemistry*, 43 (2004), 4696-702. doi: 10.1021/bi0361261
- 86 D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, and S. Rebuffat, 'Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action', *Biochimie*, 84 (2002), 511-9.
- 87 K. P. Yan, Y. Li, S. Zirah, C. Goulard, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, and S. Rebuffat, 'Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro', *ChemBiochem*, 13 (2012), 1046-52. doi: 10.1002/cbic.201200016
- 88 J. O. Solbiati, M. Ciaccio, R. N. Farias, J. E. González-Pastor, F. Moreno, and R. A. Salomón, 'Sequence Analysis of the Four Plasmid Genes Required To Produce the Circular Peptide Antibiotic Microcin J25', *Journal of Bacteriology*, 181 (1999), 2659-62.
- 89 H. G. Choudhury, Z. Tong, I. Mathavan, Y. Li, S. Iwata, S. Zirah, S. Rebuffat, H. W. van Veen, and K. Beis, 'Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (2014), 9145-50. doi: 10.1073/pnas.1320506111
- 90 K. A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov, and S. A. Darst, 'Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail', *J Am Chem Soc*, 125 (2003), 12475-83. doi: 10.1021/ja036756q
- 91 A. Bellomio, P. A. Vincent, B. F. de Arcuri, R. A. Salomon, R. D. Morero, and R. N. Farias, 'The microcin J25 beta-hairpin region is important for antibiotic uptake but not for RNA polymerase and respiration inhibition', *Biochem Biophys Res Commun*, 325 (2004), 1454-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.186
- 92 A. Blond, M. Cheminant, D. Destoumieux-Garzon, I. Segalas-Milazzo, J. Peduzzi, C. Goulard, and S. Rebuffat, 'Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity', *Eur J Biochem*, 269 (2002), 6212-22.
- 93 A. Blond, J. Peduzzi, C. Goulard, M. J. Chiuchiolo, M. Barthelemy, Y. Prigent, R. A. Salomon, R. N. Farias, F. Moreno, and S. Rebuffat, 'The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*', *Eur J Biochem*, 259 (1999), 747-55.
- 94 E. Semenova, Y. Yuzenkova, J. Peduzzi, S. Rebuffat, and K. Severinov, 'Structure-activity analysis of microcinJ25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase', *J Bacteriol*, 187 (2005), 3859-63. doi: 10.1128/JB.187.11.3859-3863.2005
- 95 R. A. Salomon, and R. N. Farias, 'The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake', *J Bacteriol*, 175 (1993), 7741-2.
- 96 R. A. Salomon, and R. N. Farias, 'The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein', *J Bacteriol*, 177 (1995), 3323-5.

- 97 I. Mathavan, S. Zirah, S. Mehmood, H. G. Choudhury, C. Goulard, Y. Li, C. V. Robinson, S. Rebuffat, and K. Beis, 'Structural basis for hijacking siderophore receptors by antimicrobial lasso peptides', *Nat Chem Biol*, 10 (2014), 340-2. doi: 10.1038/nchembio.1499
- 98 M. F. Pomares, N. S. Corbalan, C. Adler, R. de Cristobal, R. N. Farias, M. A. Delgado, and P. A. Vincent, 'Macrophage environment turns otherwise MccJ25-resistant Salmonella into sensitive', *BMC Microbiol*, 13 (2013), 95. doi: 10.1186/1471-2180-13-95
- 99 J. Mukhopadhyay, E. Sineva, J. Knight, R. M. Levy, and R. H. Ebright, 'Antibacterial Peptide Microcin J25 Inhibits Transcription by Binding within and Obstructing the RNA Polymerase Secondary Channel', *Molecular Cell*, 14 (2004), 739-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.010>
- 100 M. C. Chalon, N. Wilke, J. Pedersen, S. Rufini, R. D. Morero, L. Cortez, R. N. Chehin, R. N. Farias, and P. A. Vincent, 'Redox-active tyrosine residue in the microcin J25 molecule', *Biochem Biophys Res Commun*, 406 (2011), 366-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.047
- 101 R. Soudy, L. Wang, and K. Kaur, 'Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity', *Bioorg Med Chem*, 20 (2012), 1794-800. doi: 10.1016/j.bmc.2011.12.061
- 102 K. J. Rosengren, R. J. Clark, N. L. Daly, U. Göransson, A. Jones, and D. J. Craik, 'Microcin J25 Has a Threaded Sidechain-to-Backbone Ring Structure and Not a Head-to-Tail Cyclized Backbone', *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003), 12464-74. doi: 10.1021/ja0367703
- 103 G. B. Fields, and R. L. Noble, 'Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids', *Int J Pept Protein Res*, 35 (1990), 161-214.
- 104 H. Tsukamoto, T. Suzuki, and Y. Kondo, 'Remarkable Solvent Effect on Pd(0)-Catalyzed Deprotection of Allyl Ethers Using Barbituric Acid Derivatives: Application to Selective and Successive Removal of Allyl, Methallyl, and Prenyl Ethers', *Synlett*, 2007 (2007), 3131-36. doi: 10.1055/s-2007-992352
- 105 J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, and J. W. Zhang, 'Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications', *Journal of the American Chemical Society*, 113 (1991), 6657-62. doi: 10.1021/ja00017a044
- 106 H. Lamthanh, C. Roumestand, C. Deprun, and A. Menez, 'Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl)cysteine in a peptide with a high serine and threonine content', *Int J Pept Protein Res*, 41 (1993), 85-95.
- 107 A. Luzar, and D. Chandler, 'Structure and hydrogen bond dynamics of water-dimethyl sulfoxide mixtures by computer simulations', *The Journal of Chemical Physics*, 98 (1993), 8160-73. doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.464521>
- 108 T. M. Postma, and F. Albericio, 'N-chlorosuccinimide, an efficient peptide disulfide bond-forming reagent in aqueous solution', *RSC Advances*, 3 (2013), 14277. doi: 10.1039/c3ra43149e

ANNEXE I

Periodic Chart of Amino Acids

www.bachem.com

<p>H 155.16 137.14 C₉H₉N₃O₂</p> <p>His</p>  <p>Histidine</p>	<p>D 133.10 115.09 C₇H₉NO₄</p> <p>Asp</p>  <p>Aspartic Acid</p>					
<p>R 174.20 156.19 C₆H₁₄N₄O₂</p> <p>Arg</p>  <p>Arginine</p>	<p>F 165.19 147.18 C₉H₁₁NO₂</p> <p>Phe</p>  <p>Phenylalanine</p>	<p>A 89.09 71.08 C₃H₇NO₂</p> <p>Ala</p>  <p>Alanine</p>	<p>C 121.16 103.14 C₃H₇NO₂S</p> <p>Cys</p>  <p>Cysteine</p>	<p>G 75.07 57.05 C₂H₇NO₂</p> <p>Gly</p>  <p>Glycine</p>	<p>Q 146.15 128.13 C₅H₁₀N₂O₃</p> <p>Gln</p>  <p>Glutamine</p>	<p>E 147.13 129.11 C₆H₉NO₄</p> <p>Glu</p>  <p>Glutamic Acid</p>
<p>K 146.19 128.17 C₆H₁₃N₃O₂</p> <p>Lys</p>  <p>Lysine</p>	<p>L 131.17 113.16 C₆H₁₃NO₂</p> <p>Leu</p>  <p>Leucine</p>	<p>M 149.21 131.20 C₅H₁₁NO₂S</p> <p>Met</p>  <p>Methionine</p>	<p>N 132.12 114.10 C₄H₈N₂O₃</p> <p>Asn</p>  <p>Asparagine</p>	<p>S 105.09 87.08 C₃H₇NO₃</p> <p>Ser</p>  <p>Serine</p>	<p>Y 181.19 163.17 C₉H₉NO₃</p> <p>Tyr</p>  <p>Tyrosine</p>	<p>T 119.12 101.10 C₄H₉NO₃</p> <p>Thr</p>  <p>Threonine</p>
<p>I 131.18 113.16 C₆H₁₃NO₂</p> <p>Ile</p>  <p>Isoleucine</p>	<p>W 204.23 186.21 C₁₁H₁₂N₂O₂</p> <p>Trp</p>  <p>Tryptophan</p>	<p>P 115.13 97.12 C₅H₉NO₂</p> <p>Pro</p>  <p>Proline</p>	<p>V 117.15 99.13 C₅H₁₁NO₂</p> <p>Val</p>  <p>Valine</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Basic ■ Nonpolar (hydrophobic) ■ Polar, uncharged ■ Acidic 	<p>14-letter Amino Acid Code: S</p> <p>Molecular Weight: 105.09</p> <p>MW-H₂O: 87.08</p> <p>Molecular Formula: C₃H₇NO₃</p>  <p>Chemical Structure</p> <p>Chemical Name: Serine</p> <p>3-letter Amino Acid Code</p>	