



HAL
open science

Dipeptides cycliques et dérivés des cyclodextrines : évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne

Jean-Maxime Devaux

► **To cite this version:**

Jean-Maxime Devaux. Dipeptides cycliques et dérivés des cyclodextrines : évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02893519

HAL Id: dumas-02893519

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02893519>

Submitted on 6 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de

**MÉMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
EN BIOLOGIE MÉDICALE**

présentée par

Jean-Maxime Devaux

né le 26 mai 1989, à Hennebont (56)

**Dipeptides cycliques et
dérivés des
cyclodextrines :
évaluation *in vitro* de
l'activité
antibactérienne.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 28 octobre 2019**

devant le jury composé de :

Anne GOUGEON

Professeure des Universités à l'Université de Rennes 1
Praticien Hospitalier au CHU de Rennes /
Président

Vincent CATTOIR

Professeur des Universités à l'Université de Rennes 1
Praticien Hospitalier au CHU de Rennes /
Directeur de thèse

Philippe GUEGAN

Professeur des Universités à l'Université Panthéon-
Sorbonne, Paris 1 /
Examineur

Florian LEMAITRE

Maître de Conférences des Universités à l'Université de
Rennes 1
Praticien Hospitalier au CHU de Rennes /
Examineur

Liste des enseignants 2019-2020

U.F.R Pharmacie Rennes 1

| PROFESSEURS | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|--------------------|-----------------------------------|------------|-----|-------------|
| 1 | BOUSTIE Joël | X | HDR | |
| 2 | DONNIO Pierre Yves | X | HDR | X |
| 3 | FAILI Ahmad | | HDR | |
| 4 | FARDEL Olivier | X | HDR | X |
| 5 | FELDEN Brice | X | HDR | |
| 6 | GAMBAROTA Giulio | | HDR | |
| 7 | GOUGEON Anne | X | HDR | |
| 8 | LAGENTE Vincent | X | HDR | |
| 9 | LE CORRE Pascal | X | HDR | X |
| 10 | LORANT (BOICHOT) Elisabeth | | HDR | |
| 11 | MOREL Isabelle | X | HDR | X |
| 12 | SERGENT Odile | X | HDR | |
| 13 | SPARFEL-BERLIVET Lydie | X | HDR | |
| 14 | TOMASI Sophie | X | HDR | |
| 15 | URIAC Philippe | X | HDR | |
| 16 | VAN DE WEGHE Pierre | | HDR | |
| 17 | VERNHET Laurent | X | HDR | |

| PROFESSEURS ASSOCIES | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|-----------------------------|-----------------------|------------|-----|-------------|
| 1 | BUREAU Loïc | X | | |
| 2 | DAVOUST Noëlle | X | | |

| PROFESSEURS EMERITES | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|-----------------------------|------------------------|------------|-----|-------------|
| 1 | CILLARD Josiane | X | HDR | |
| 2 | GUILLOUZO André | | HDR | |

MAITRES DE CONFERENCES

| | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|----|---------------------|----------------|-----|-------------|
| 1 | ABASQ-PAOFAI | Marie-Laurence | | |
| 2 | ANINAT | Caroline | X | HDR |
| 3 | AUGAGNEUR | Yoann | | |
| 4 | BEGRICHE | Karima | | |
| 5 | BOUSARGHIN | Latifa | | HDR |
| 6 | BRANDHONNEUR | Nolwenn | | |
| 7 | BRUYERE | Arnaud | X | |
| 8 | BUNETEL | Laurence | X | |
| 9 | CHOLLET-KRUGLER | Marylène | X | |
| 10 | COLLIN | Xavier | X | |
| 11 | CORBEL | Jean-Charles | X | HDR |
| 12 | DELALANDE | Olivier | | |
| 13 | DELMAIL | David | | HDR |
| 14 | DION | Sarah | X | |
| 15 | DOLLO | Gilles | X | HDR X |
| 16 | GICQUEL | Thomas | X | X |
| 17 | GILOT | David | | HDR |
| 18 | GOUAULT | Nicolas | | HDR |
| 19 | HITTI | Eric | | |
| 20 | JEAN | Mickaël | X | |
| 21 | JOANNES | Audrey | | |
| 22 | LEUREUR | Valérie | | HDR |
| 23 | LE FERREC | Eric | X | |
| 24 | LE GALL-DAVID | Sandrine | | |
| 25 | LE PABIC | Hélène | | |
| 26 | LEGOUIN-GARGADENNEC | Béatrice | | |
| 27 | LOHEZIC-LE DEVEHAT | Françoise | X | |
| 28 | MARTIN-CHOULY | Corinne | | HDR |
| 29 | NOURY | Fanny | | |
| 30 | PINEL-MARIE | Marie-Laure | | |
| 31 | PODECHARD | Normand | | |
| 32 | POTIN | Sophie | X | X |
| 33 | RENAULT | Jacques | X | HDR |
| 34 | ROUILLON | Astrid | | |

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

| | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|---|---------------|-------------------|-----|-------------|
| 1 | BACLE | Astrid | X | |
| 2 | BOUVRY | Christelle | X | |

ATER

| | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|---|---------------|-------------|-----|-------------|
| 1 | CHEDIK | Lisa | X | |

LRU

| | | Pharmacien | HDR | Hospitalo-U |
|---|----------------|----------------|-----|-------------|
| 1 | AFONSO | Damien | | |
| 2 | VICTONI | Tatiana | X | |

Remerciements :

Madame la Professeure Anne Gougeon :

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse ; veuillez trouver en ces lignes l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Vincent Cattoir :

Je te remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse et d'en avoir accepté l'encadrement. C'est un vrai plaisir de t'avoir côtoyé. Merci pour la confiance que tu m'as accordé.

Monsieur le Professeur Philippe Guégan :

Je vous remercie pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse; ainsi que pour les conseils que vous m'avez apporté. Veuillez trouver en ces lignes l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Docteur Florian Lemaître :

Je vous remercie pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse; veuillez trouver en ces lignes l'expression de ma sincère gratitude.

Remerciements personnels :

A mes parents pour leur soutien constant depuis 30 ans. Je n'aurais jamais réussi sans eux (je ne serais même jamais né). Tanguy prend son envol.

A mes sœurs, Charlotte et Hélène, pour me faire autant rire. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

A ma grand-mère pour sa gentillesse et son énergie épuisante.

Aux potes/amis/copains/peu importe Charles, Cousin, Eléonore, Papache et Piam's. Déjà 15 ans de vie commune, des voyages, des soirées et toujours pas de routine. Je vous aime.

Toutou

A PM parce qu'au premier regard on a tout de suite su que ce serait plus qu'une relation charnelle.

A Gwen, poussin, Gariguettes, Mario, Sophie, Lucie et Julien pour ces années apéros dinatoires et pour la suite des aventures. Piou

Aux amis de la fac (Amalia, Pauline, mon ninja srab, Camille, Faisan, Brendan, Coco, Benjamin, Quentin, Moussy, Océane, Julien, Korben, Panpan...), des RPE (Lulu, Sophie, Lise, FX, PK, Nico, Clémence, Dada et Thomas) et à toutes les belles personnes que j'ai rencontrées pendant mes études (FE, Louis-Marie, Pauline, PE, Q, Victor, Tigrou et beaucoup d'autres)

A mes cointernes, avec qui j'ai énormément apprécié mon internat (petite mention pour Zahida, Anne et le trio de l'enfer en biochimie) et mes assistantes préférées ;)

A tout le personnel des laboratoires du CHU de Rennes et du CH de Vannes que j'ai eu la chance de côtoyer. Que ce soit les biologistes, les techniciens, les aides de laboratoire, les secrétaires ou le personnel d'entretien (sauf celle qui nous réveille à 5h du matin pendant la garde. Vraiment pas merci à elle). Mention spéciale aux Vannetais pour leur gentillesse, leur pédagogie et au zoub d'Arnaud.

A Alysée, pour ton aide pendant cette année et pour tout d'une façon générale. Si je finis par toi c'est pour signifier que j'aimerais finir ma vie avec toi. Berl1 D3 patate

« Vannes, pendant la guerre d'Algérie il ne valait mieux pas y mettre les pieds. Un vrai champ de mines ».

André Charpentier (1937-2019)

Serment de Galien :

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté et de mes condisciples : D'honorer ceux qui m'ont instruit dans Les préceptes de mon art et de leur Témoigner ma reconnaissance en Restant fidèle à leur enseignement. D'exercer, dans l'intérêt de la santé Publique, ma profession avec Conscience et de respecter non Seulement la législation en Vigueur, mais aussi les règles de L'honneur, de la probité et du Désintéressement. De ne jamais oublier ma responsabilité Et mes devoirs envers le malade Et sa dignité humaine ; en aucun Cas, je ne consentirai à utiliser Mes connaissances et mon état pour Corrompre les mœurs et favoriser Des actes criminels. Que les hommes m'accordent leur Estime si je suis fidèle à mes Promesses. Que je sois couvert d'opprobre et Méprisé de mes confrères si j'y Manque.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Liste des enseignants 2019-2020 | 2 |
| Remerciements : | 5 |
| Serment de Gallien : | 8 |
| Sommaire : | 9 |
| Liste des documents annexes..... | 11 |
| Liste des illustrations..... | 12 |
| Liste des abréviations..... | 13 |
| 1. Introduction..... | 14 |
| 1.1. Les antibiotiques..... | 14 |
| 1.2. La résistance aux antibiotiques..... | 14 |
| 1.3. La recherche en matière d'antibiotiques..... | 16 |
| 1.3.1. Etat des lieux de la recherche..... | 16 |
| 1.3.2. Association d'antibiotiques..... | 17 |
| 1.3.3. Antibiotiques altérant les membranes bactériennes..... | 17 |
| 1.4. La membrane cytoplasmique..... | 17 |
| 1.4.1. Différences procaryotes/eucaryotes..... | 19 |
| 1.4.2. Différences Gram positif/Gram négatif..... | 19 |
| 1.5. Molécules à l'étude..... | 22 |
| 1.5.1. Les dipeptides cycliques et leurs dérivés..... | 22 |
| 1.5.2. Les cyclodextrines et leurs dérivés..... | 23 |
| 1.6. Techniques d'évaluation d'une activité antibiotique..... | 25 |
| 1.6.1. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice..... | 25 |
| 1.6.2. Evaluation des associations d'antibiotiques..... | 25 |
| 1.7. Objectif de l'étude..... | 26 |
| 2. Matériels & Méthode..... | 27 |
| 2.1. Bactéries étudiées..... | 27 |
| 2.2. Molécules testées..... | 27 |
| 2.2.1. Cyclodextrines et dérivés..... | 27 |
| 2.2.1.1. Cyclodextrines..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1.2. Dérivés des cyclodextrines..... | 28 |
| 2.2.2. Dipeptides cycliques et dérivés..... | 29 |
| 2.2.2.1. Dipeptides cycliques..... | 29 |
| 2.2.2.2. Dérivés des dipeptides cycliques..... | 30 |
| 2.2.3. Antibiotiques..... | 32 |
| 2.3. Technique de détermination des concentrations minimales inhibitrices utilisée..... | 34 |
| 2.4 Technique de détermination d'une synergie ou d'un antagonisme..... | 36 |
| 3. Résultats..... | 37 |
| 4. Discussion :..... | 41 |
| 4.1. Les dipeptides cycliques et leurs dérivés :..... | 41 |
| 4.2. Les cyclodextrines et leurs dérivés :..... | 44 |
| 4.3. Rôle de l'opérateur :..... | 46 |
| 5. Conclusion | 48 |
| Bibliographie..... | 49 |
| Autorisation d'imprimer..... | 57 |
| Déclaration de non-plagiat | 58 |

Liste des documents annexés :

Annexe 1 : Tableau reprenant les différents dipeptides cycliques et dérivés ayant une action antibiotique.

Liste des illustrations :

Figures :

| | |
|--|----|
| <i>Figure 1 : Nombre de décès estimés attribués à l'antibiorésistance par continents en 2050 (7)</i> | 15 |
| <i>Figure 2 : Nouveaux antibiotiques approuvés par la FDA</i> | 16 |
| <i>Figure 3 : Représentation d'un phospholipide</i> | 18 |
| <i>Figure 4 : Représentation d'une bicouche lipidique</i> | 18 |
| <i>Figure 5 : Représentation de la paroi d'une bactérie à Gram négatif</i> | 20 |
| <i>Figure 6 : Représentation de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif</i> | 21 |
| <i>Figure 7 : Représentation d'un lipopolysaccharide</i> | 21 |
| <i>Figure 8 : Représentation du peptidoglycane (18)</i> | 22 |
| <i>Figure 9 : Structure d'un dipeptide cyclique (20)</i> | 22 |
| <i>Figure 10 : Alpha, beta et gamma-cyclodextrines (40)</i> | 24 |
| <i>Figure 11 : Représentation des dérivés à 21 branches</i> | 28 |
| <i>Figure 12 : Représentation des dérivés à 14 branches</i> | 28 |
| <i>Figure 13 : Représentation de la Cyclo(Leucine-Proline)</i> | 29 |
| <i>Figure 14 : Représentation de la Cyclo(Phénylalanine-Proline)</i> | 29 |
| <i>Figure 15 : Synthèse d'un dérivé polyglycidolé à partir d'un dipeptide cyclique</i> | 30 |
| <i>Figure 16 : Représentation du VP 12-6D (cyclo(Phe-Pro) – poly(glycidol))</i> | 31 |
| <i>Figure 17 : Représentation du VP 12-9D (cyclo(Phe-Pro) - poly(glycidol))</i> | 31 |
| <i>Figure 18 : Représentation du VP 3-32D (cyclo(Leu-Pro) – poly(glycidol))</i> | 32 |
| <i>Figure 19 : Représentation du VP 3-35D (cyclo(Leu-Pro) – poly(glycidol))</i> | 32 |
| <i>Figure 20 : Représentation de l'amoxicilline</i> | 33 |
| <i>Figure 21 : Représentation de la ceftriaxone</i> | 33 |
| <i>Figure 22 : Représentation de la gentamicine</i> | 33 |
| <i>Figure 23 : Représentation de la vancomycine</i> | 34 |
| <i>Figure 24 : hypothèses de mécanisme d'action de peptides antimicrobiens</i> | 43 |
| <i>Figure 25 : Représentation de ponts hydrogène d'une molécule de cyclodextrine.</i> | 44 |
| <i>Figure 26 : Schéma d'insertion de molécules de cyclodextrine dans une bicouche lipidique</i> | 45 |

Tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Distinction des 4 dérivés des cyclodextrines RX047, RX094, RX099 et RX100 | 28 |
| Tableau 2 : plan de plaque CMI en milieu liquide | 35 |
| Tableau 3 : plan de plaque "checkerboard assay" | 36 |
| Tableau 4 : CMI des cyclodextrines et dérivés | 38 |
| Tableau 5 : CMI des dipeptides cycliques et dérivés | 39 |
| Tableau 6 : FIC des associations avec antibiotiques | 40 |

Liste des abréviations :

| | |
|--------|--|
| ATCC | American type culture collection |
| BMD | Broth microdilution |
| CD | Cyclodextrine |
| CDC | Center for Disease Control and prevention |
| CMI | Concentration Minimale Inhibitrice |
| ESKAPE | <i>Enterococcus faecium-Staphylococcus aureus-Klebsiella pneumoniae-Acinetobacter baumannii-Pseudomonas aeruginosa-Enterobacter spp.</i> |
| ERV | <i>Enterococcus faecium</i> résistant à la vancomycine |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| FIC | Fraction de concentration inhibitrice |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MDR | Multi-Drug Resistant |
| NCTC | National collection of type cultures |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PEG | Polyéthylèneglycol |
| PSM | Poste de sécurité microbiologique |
| SARM | <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline |
| TSA | Trypticase soy agar |
| XDR | eXtensively Drug Resistant |

1. Introduction :

1.1. Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont une famille de médicaments d'origine naturelle ou synthétique qui agissent sur la multiplication des bactéries en inhibant des fonctions physiologiques majeures telle que la synthèse de la paroi (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), la réplication/transcription de l'ADN (quinolones, rifampicine, sulfamides, triméthoprim), la synthèse protéique (aminosides, tétracyclines, macrolides et apparentés, chloramphénicol, oxazolidinones) ou encore l'altération des membranes bactériennes (colistine, daptomycine). Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques.

Les bactéries peuvent accroître leur résistance aux antibiotiques par une multitude de mécanismes dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les antibiotiques considérés.

1.2. La résistance aux antibiotiques :

La résistance des bactéries d'intérêt médicale aux antibiotiques est une problématique mondiale depuis des décennies. Pour exemple, la résistance à la pénicilline G chez *Staphylococcus aureus* fut décrite pour la première fois en 1940, avant même la commercialisation de cette dernière (1). Les bactéries les plus inquiétantes sur le plan médical sont les bactéries regroupées sous l'acronyme ESKAPE (2) que l'on rencontre principalement en milieu hospitalier. Elles comprennent les entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter* spp. résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération, que l'on retrouve dans le tube digestif, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (ERV), ou encore *Pseudomonas aeruginosa* qui est notamment responsable d'infections nosocomiales. Par l'acquisition de gènes de résistance, ces bactéries sont dites multi-résistantes (MDR) ou extra-résistantes (XDR) et sont les causes d'infections difficiles à traiter, voire impossible à l'aide d'antibiotiques conventionnels. Elles réduisent ainsi les chances de guérison et sont responsables d'une mortalité élevée (3).

L'émergence croissante de ces résistances a plusieurs explications.

Parmi elles, la surpopulation, l'augmentation des flux migratoires, l'augmentation de l'usage des antibiotiques en milieu hospitalier et dans le secteur agro-alimentaire, le défaut d'hygiène dans certaines zones géographiques du globe, la pression de sélection, ainsi que l'émergence de nouvelles résistances (4).

Selon le CDC (Centers for Disease Control and prevention), aux Etats-Unis plus de 2 millions de personnes contractent une infection à bactérie MDR chaque année et ces infections sont responsables de plus de 23 000 décès (5).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère la résistance aux antibiotiques comme un problème majeur de santé publique et craint le développement d'une ère « pré-antibiotique » (6). Ceci aurait pour conséquence une augmentation du nombre de décès due aux bactéries MDR (7) (figure 1).

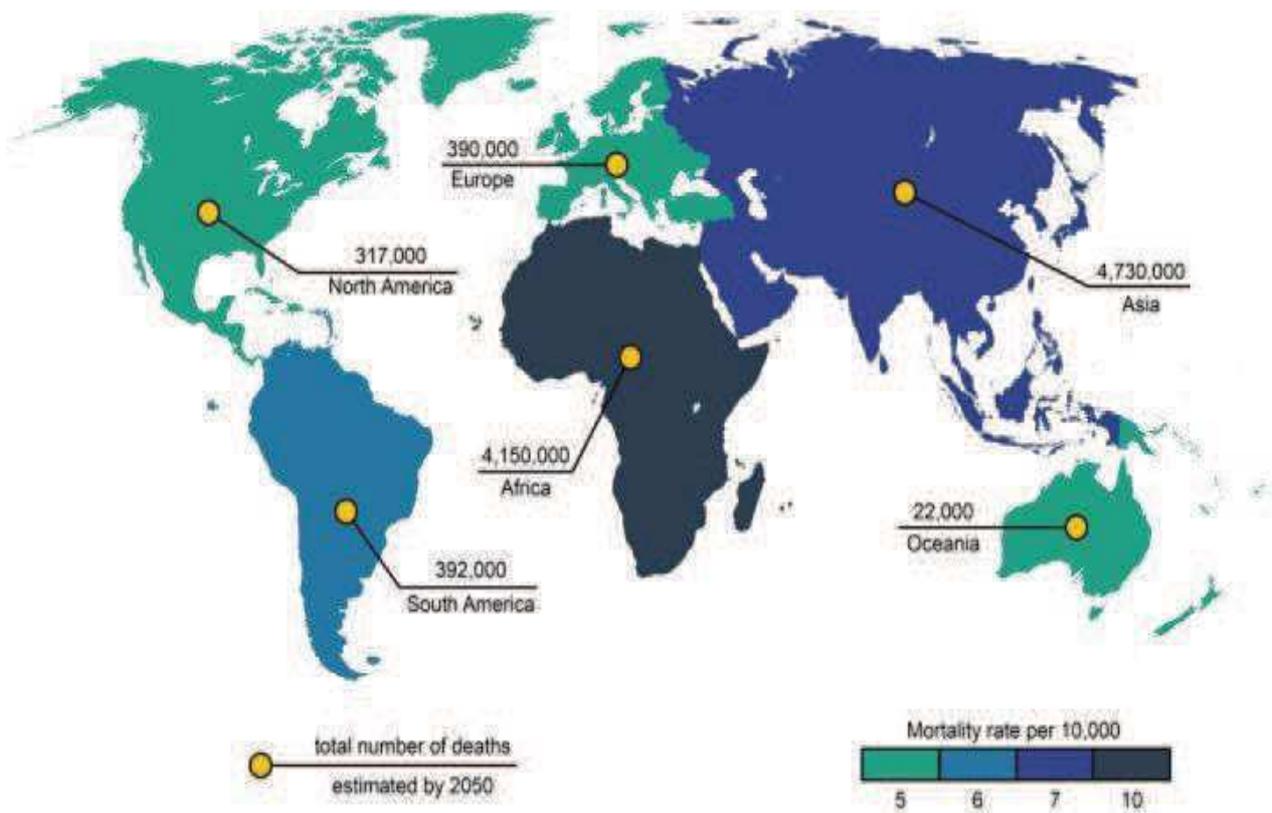


Figure 1 : Nombre de décès estimés attribués à l'antibiorésistance par continents en 2050 (7)

1.3. La recherche en matière d'antibiotiques :

1.3.1. Etats des lieux de la recherche :

Le coût de développement d'un antibiotique, associé à son faible retour sur investissement a provoqué le ralentissement de la recherche sur les antibiotiques (8).

De plus, un nouveau médicament met en moyenne 15 à 20 ans à être développé et l'évolution des résistances aux antibiotiques rend imprédictible l'efficacité d'un antibiotique en phase de recherche et dissuade davantage les industries pharmaceutiques.

Enfin, le recyclage de vieux antibiotiques (ex. témocilline, colistine) ne va pas non plus dans le sens du développement de nouveaux antibiotiques (9).

Le nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché a donc dramatiquement diminué depuis les années 80 (figure 2).

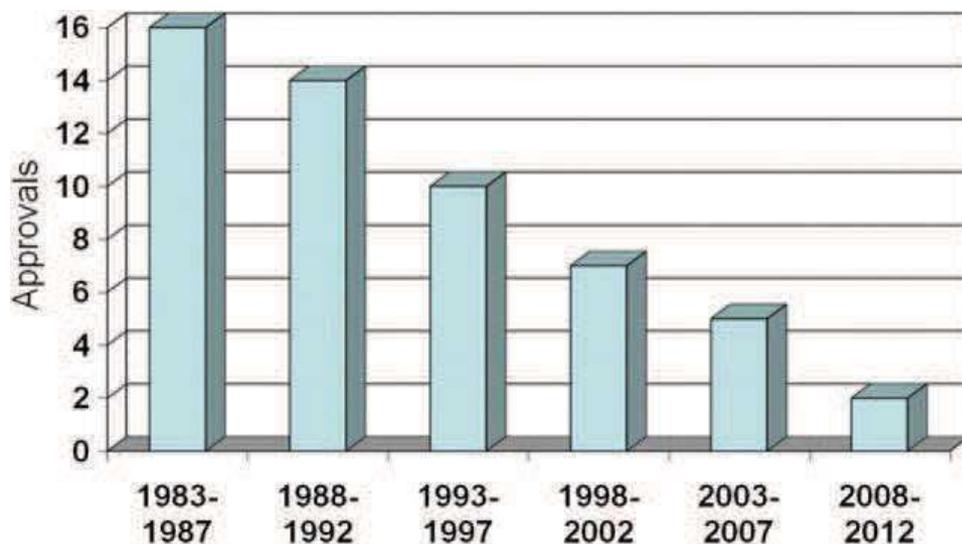


Figure 2 : Nouveaux antibiotiques approuvés par la FDA par période de 5 ans de 1983 à 2012 (10)

1.3.2. Association d'antibiotiques :

Dans ce contexte de carence en nouveaux antibiotiques disponibles sur le marché et afin de lutter contre l'émergence de bactéries MDR ou XDR, des alternatives ont été proposées. Parmi elles, l'association de différents antibiotiques est une option afin d'apprécier une synergie d'action (11). Il s'agit d'un phénomène déjà connu depuis plusieurs années et largement utilisé pour associer, par exemple, un aminoside à une β -lactamine (12).

Plusieurs études ont montré que des associations entre des antibiotiques et des molécules d'origine naturelle issues de plantes apportaient une stratégie dans le traitement des infections bactériennes de par l'action synergique de ces molécules en association (13).

1.3.3. Antibiotiques altérant les membranes bactériennes :

Des cibles intéressantes sont les membranes bactériennes, quelques antibiotiques les ciblant sont déjà sur le marché et possèdent un large spectre d'action (ex. daptomycine, colistine). Les peptides antimicrobiens sont des candidats pour devenir les antibiotiques du futur et de nombreux travaux de recherche font état de leur efficacité.

Depuis quelques années, deux familles de molécules font l'objet de recherche dans le but de caractériser leur action antibiotique. Il s'agit des dipeptides cycliques et des cyclodextrines (voir ci-après).

1.4. La membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique est une membrane biologique qui délimite le cytoplasme d'une cellule et la sépare du milieu extérieur. Elle est composée de protéines, de sucres et de lipides. Les lipides sont composés d'une « tête » hydrophile et d'une « queue » hydrophobe (figure 3) et s'associent deux par deux pour former une bicouche lipidique (figure 4).

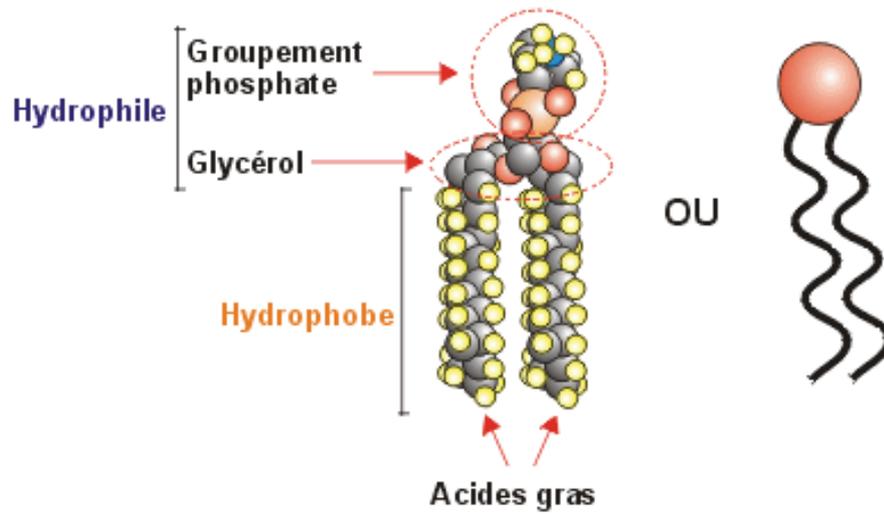


Figure 3 : Représentation d'un phospholipide

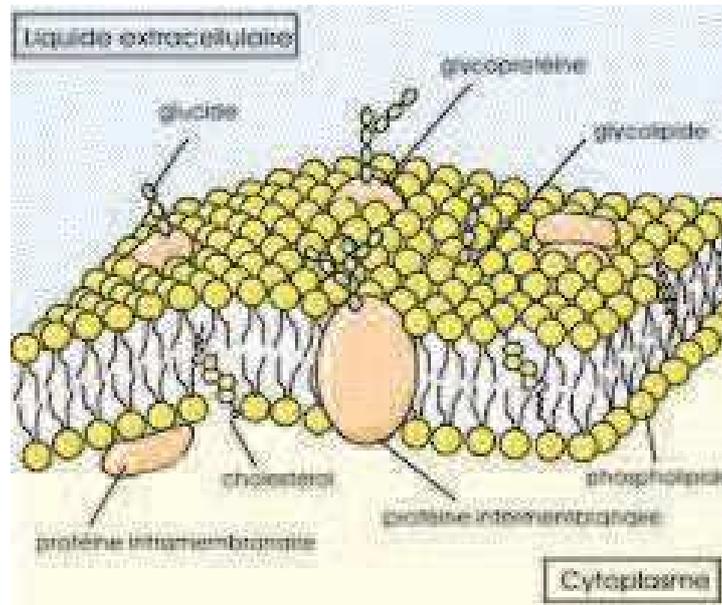


Figure 4 : Représentation d'une bicouche lipidique

1.4.1. Différences procaryotes/eucaryotes :

Il existe quelques différences entre la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes et celle des cellules procaryotes.

Une des différences principales est que les lipides anioniques qui composent la membrane bactérienne sont exposés à la surface, tandis que chez les cellules eucaryotes les lipides anioniques sont séquestrés à l'intérieur de la bicouche lipidique. De plus, la membrane plasmique des cellules eucaryotes est constituée d'un lipide, le cholestérol, absent chez les cellules procaryotes (14).

1.4.2. Différences Gram positif/Gram négatif :

La composition moléculaire et morphologique de la paroi des bactéries à Gram négatif (figure 5) est fondamentalement différente de celle des bactéries à Gram positif (figure 6).

Les bactéries à Gram négatif sont entourées par deux membranes : la membrane externe et la membrane cytoplasmique. La membrane externe agit comme barrière à perméabilité sélective et protège la cellule des agressions extérieures. Il s'agit également d'une membrane composée d'une bicouche lipidique et se compose de phospholipides sur le feuillet intérieur et de lipopolysaccharide (LPS) sur le feuillet extérieur. Le LPS est une endotoxine qui agit en activant l'immunité innée de l'hôte et peut être responsable de choc septique en cas d'infections invasives (15). Il est composé de 3 éléments (figure 7) :

- le lipide A, un lipide chargé négativement qui empêche la pénétration de solutés polaires.
- une chaîne saccharidique, l'antigène O, qui empêche la pénétration de composés hydrophobes.
- le core, qui lie les 2 éléments. Il est notamment constitué de groupements phosphorylés chargés négativement et qui donneront une structure cohérente à la membrane externe en interagissant avec des cations divalents (16).

Les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de membrane externe mais seulement une membrane plasmique, entourée par la paroi.

Un composant majeur de la paroi bactérienne est le peptidoglycane ou muréine. Il s'agit d'un polysaccharide formant un réseau qui assure à la bactérie sa forme et lui assure une résistance au milieu extérieur (17). Le peptidoglycane est formé d'unités répétées de N-acétylglucosamine-acide-N-acétylmuramique. Chaque branche ainsi formée est reliée à une autre via un pentapeptide, permettant ainsi d'obtenir un réseau de mailles (figure 8).

Chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane se situe dans l'espace périplasmique et forme une fine couche, entourée des membranes externe et cytoplasmique. Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane forme une couche plus épaisse et directement attachée à la membrane plasmique. Les acides téichoïques et lipotéichoïques sont des polymères qui font le lien entre la membrane plasmique et la paroi des bactéries à Gram positif. Ils jouent un rôle dans la forme de la cellule, sa division et sa pathogénicité.

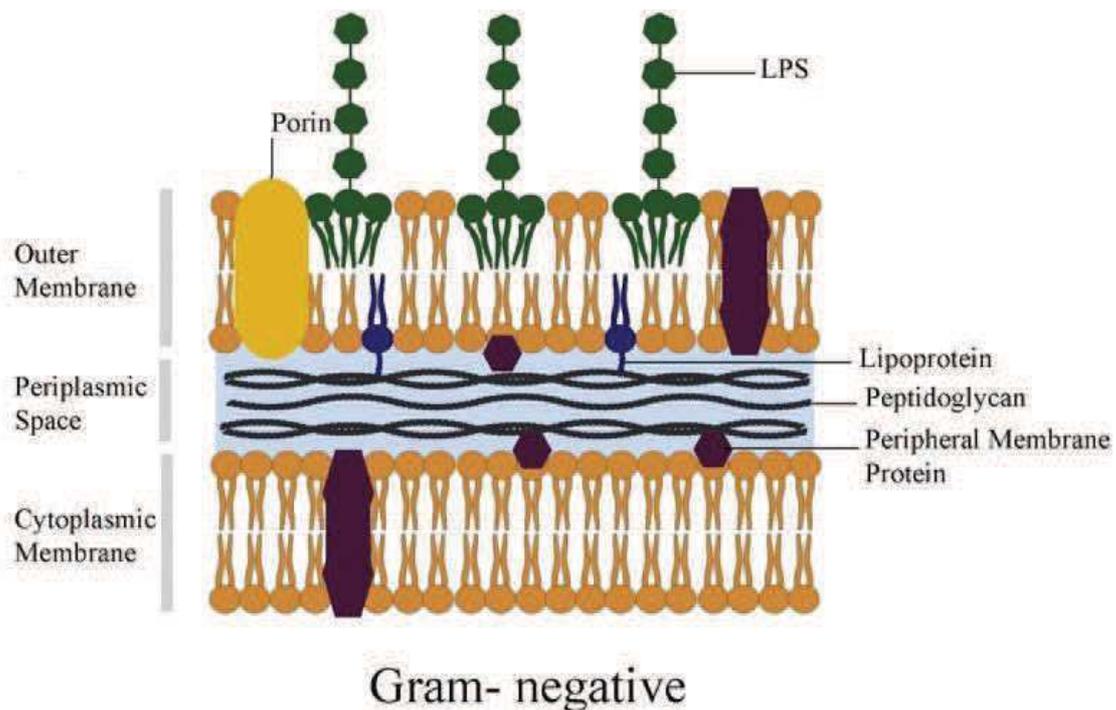
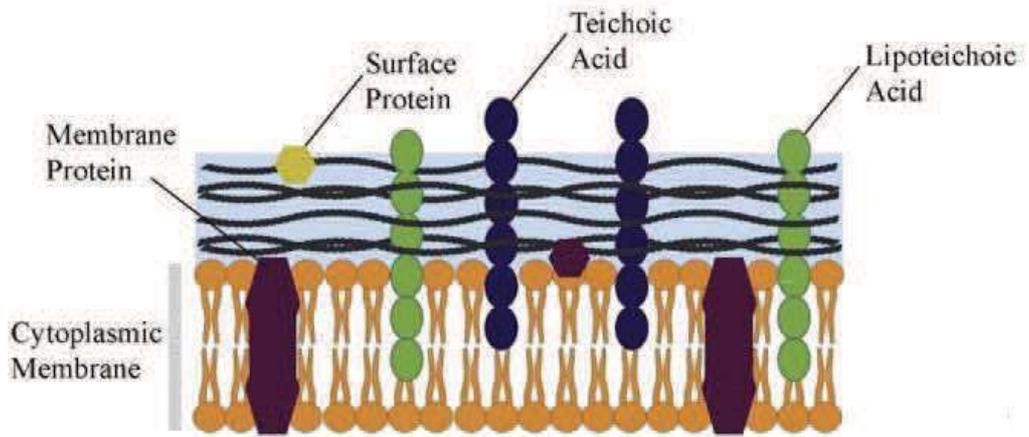


Figure 5 : Représentation de la paroi d'une bactérie à Gram négatif



Gram- positive

Figure 6 : Représentation de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif

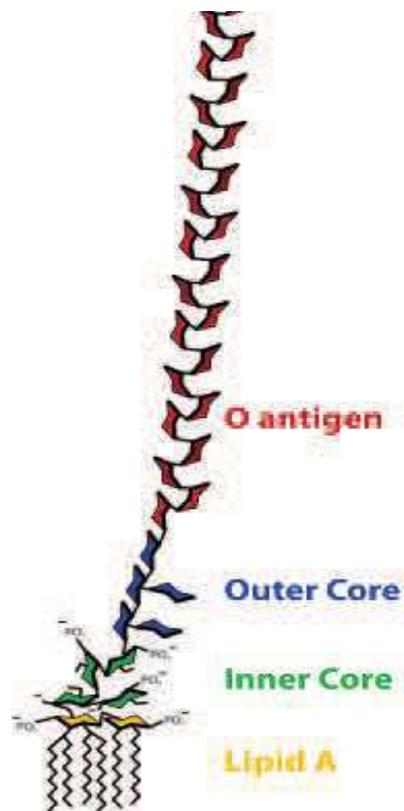


Figure 7 : Représentation d'un lipopolysaccharide

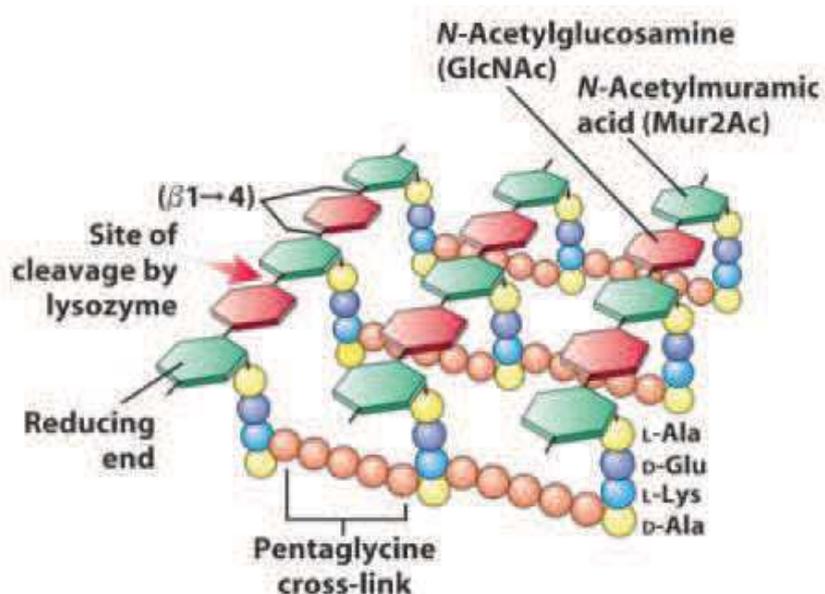


Figure 8 : Représentation du peptidoglycane (18)

1.5. Molécules à l'étude :

1.5.1. Les dipeptides cycliques et leurs dérivés :

Les cyclodipeptides (ou dipeptides cycliques) sont usuellement appelés 2,5-dikétopipérazines ou dioxopipérazines et sont le résultat de la condensation de deux acides aminés (19) (figure 9 où R1 et R2 représentent les résidus des acides aminés correspondants).

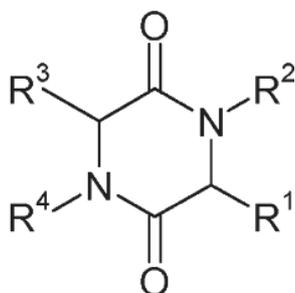


Figure 9 : Structure d'un dipeptide cyclique (20)

Il s'agit des plus petits cyclopeptides et sont naturellement produits par de nombreux organismes vivants comme les plantes, les animaux, les champignons et les bactéries.

La capacité des microorganismes à produire des dikétopipérazines est très répandue et il a été montré dans la littérature que 90% des bactéries à Gram négatif en produisaient (21).

Les dikétopipérazines ont également été isolées chez les bactéries à Gram positif (22), (23), les champignons (24) et les microorganismes marins (25).

Une des premières publications faisant état de la formation de dikétopipérazines vient d'un article de Fischer en 1906 (26). En 1995, Prasad résume dans un article l'activité biologique des dikétopipérazines (27) et en 2007 Martins reprend l'activité biologique et la synthèse des dikétopipérazines (28).

De nombreuses activités biologiques des dikétopipérazines sont mentionnées dans la littérature, comme des activités cytostatiques (29) mais également des activités sur plusieurs microorganismes : champignons, bactéries, et virus (30) ainsi qu'une activité anti-prions (31). D'autres activités sont décrites sur les canaux calcium, opioïdes (32) et GABAergiques (33). Une étude récente a montré que les dikétopipérazines pouvaient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire avec une action sur le système de *quorum sensing* des bactéries. (34), (35).

A partir de 2 espèces de *Streptomyces*, Rhee a identifié le cyclo(L-Leu-L-Pro) comme ayant une action antibactérienne sur *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine (36), (37). Dans d'autres travaux de recherche, Rhee a aussi montré que la combinaison de cyclo(L-Leu-L-Pro) et de cyclo(L-Phe-L-Pro) avait une action synergique antibactérienne sur *Escherichia coli*, *S. aureus* et *Micrococcus luteus* ainsi qu'une action antifongique sur *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (38).

1.5.2. Les cyclodextrines et leurs dérivés :

Les cyclodextrines furent isolées pour la première fois en 1891, comme produit de dégradation de l'amidon. Ce sont des oligosaccharides constitués de 6 à 8 unités de dextrose

(alpha, beta et gamma respectivement) reliées entre elles par des liaisons alpha-1,4 glycosidiques pour former un macrocycle polysaccharidique (39) (Figure 10).

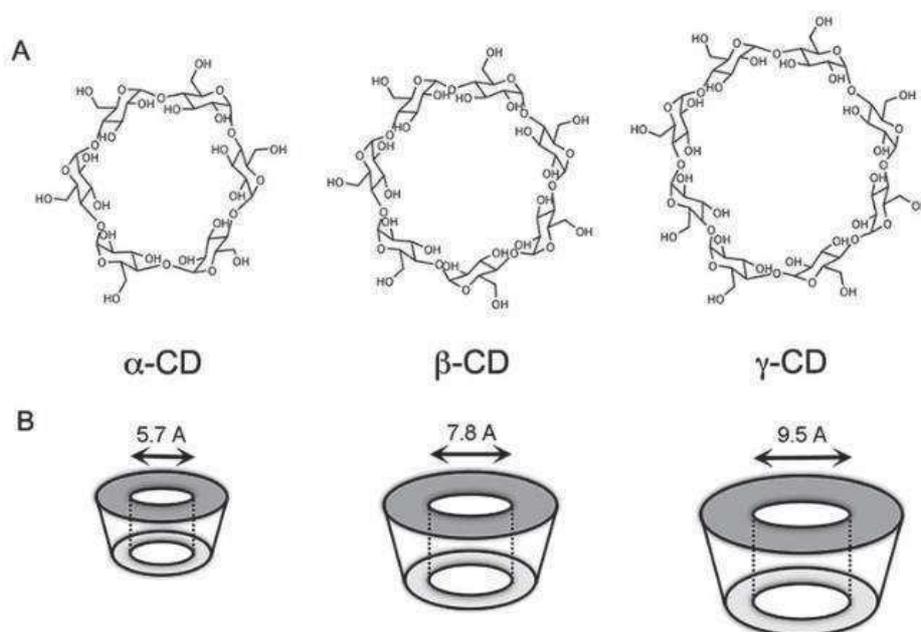


Figure 10 : Alpha, beta et gamma-cyclodextrines (40)

Elles ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche, ce qui a permis d'en faire l'usage dans différents domaines comme la cosmétique, l'agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique.

En effet, elles peuvent interagir avec d'autres molécules afin de former des complexes d'inclusion (41). Ces complexes possèdent plusieurs propriétés physico-chimiques dont la solubilité et la stabilité en milieu aqueux. Ces propriétés sont déjà mis à profit pour plusieurs spécialités pharmaceutiques, comme c'est le cas pour les formulations de préparation injectables de voriconazole (complexe formé avec sulfobutyle éther betaCD) ou d'itraconazole (complexe formé avec de l'hydroxypropyl-betaCD) (42), (43) ou bien pour différents composés dans le cadre de la recherche (alphaCD/moringin (44)).

Au-delà de leur capacité à transporter les molécules, que ce soit pour en diminuer la toxicité ou pour en modifier les propriétés pharmacocinétiques, les cyclodextrines et leur dérivés ont fait l'objet de plusieurs publications récentes pour des propriétés anti-toxiques (38) ou bien antibactériennes (45) par augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne (46).

1.6. Technique d'évaluation d'une activité antibiotique :

1.6.1. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice :

Le résultat d'un test de sensibilité *in vitro* à un antibiotique permet de prédire la réponse au traitement et ainsi d'orienter le choix d'un antibiotique pour le traitement d'une infection bactérienne (47).

Une façon de déterminer *in vitro* l'activité bactériostatique d'un antibiotique sur une souche bactérienne est d'en déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il s'agit de la plus faible concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance d'une souche bactérienne *in vitro* (48). En pratique, il existe deux façons de déterminer la CMI : la méthode sur milieu gélosé et la méthode en milieu liquide. Selon l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), la méthode en milieu liquide ou BMD (broth microdilution) est la technique de référence pour déterminer la CMI d'un antibiotique.

1.6.2. Evaluation des associations d'antibiotiques :

Les effets antibactériens des associations d'antibiotiques sont généralement définis en 4 possibilités d'interactions (49) :

- indifférence : l'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre.
- addition : l'effet de l'association est égale à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration que dans l'association.
- synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration.
- antagonisme : l'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des antibiotiques. Son activité est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique pris indépendamment.

La technique principalement utilisée pour déterminer une action synergique de 2 antibiotiques est la technique de l'échiquier ou *checkerboard assay*. Elle permet de quantifier

l'interaction des deux antibiotiques A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentration A et B.

La valeur de l'association est quantifiée par l'index FIC (fraction de concentration inhibitrice) :

$$FIC = FICA + FICB = \frac{\text{CMI de A avec B}}{\text{CMI de A seul}} + \frac{\text{CMI de A avec B}}{\text{CMI de B seul}}$$

La synergie est habituellement définie par un index FIC < ou égal à 0,75, l'antagonisme à un index FIC > 2 et l'indifférence pour toutes les valeurs de FIC comprises entre 1 et 2.

1.7. Objectif de l'étude :

L'objectif principal de ce travail a été de rechercher une action antibactérienne potentielle de différents dérivés des cyclodextrines et de dipeptides cycliques, ainsi qu'une éventuelle action synergique avec certains antibiotiques.

2. Matériels & Méthodes :

2.1. Bactéries étudiées :

Huit souches de bactéries d'intérêt médical ont été utilisées pour ce travail. Elles provenaient de collections ATCC (American type culture collection) ou NCTC (National collection of type cultures) et présentaient un phénotype sauvage ou des mécanismes de résistance acquise (entre parenthèse) :

- *E. coli* ATCC 25922 (phénotype sauvage)
- *E. coli* ATCC 35218 (production d'une pénicillinase TEM-1)
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 (phénotype sauvage)
- *S. aureus* ATCC 29213 (production d'une pénicillinase BlaZ)
- *S. aureus* NCTC 12493 (SARM *mecA*+))
- *E. faecalis* ATCC 29212 (phénotype sauvage)
- *K. pneumoniae* ATCC 700603 (production d'une BLSE SHV-18)
- *E. faecalis* ATCC 51299 (ERV *vanB*+))

Toutes les souches ont été cultivées sur milieu gélosé TSA (bioMérieux) et mises à incuber à 37°C entre 18 et 24h pour travailler sur des bactéries en phase exponentielle de croissance.

2.2. Molécules testées :

2.2.1. Cyclodextrines et dérivés :

2.2.1.1. Cyclodextrines :

Les poudres de cyclodextrines et leurs dérivés ont été dissoutes dans de l'eau stérilisée afin d'obtenir une solution mère de concentration $C = 5,12 \text{ g/L}$.

2.2.1.2. Dérivés des cyclodextrines :

Les dérivés possédaient 14 branches ou 21 branches de polyéthylèneglycol (PEG) de masse molaire 200 ou 550 g/mol (figures 11 et 12 et tableau 1) fixées aux cyclodextrines. Les dérivés des cyclodextrines ont été fournis par le Professeur Philippe Guégan (Institut Parisien de Chimie moléculaire, Sorbonne Université, Paris).

Tableau 1 : Distinction des 4 dérivés des cyclodextrines RX047, RX094, RX099 et RX100

| | 14 branches | 21 branches |
|---------|-------------|-------------|
| PEG 200 | RX 099 | RX 094 |
| PEG 550 | RX 100 | RX 047 |

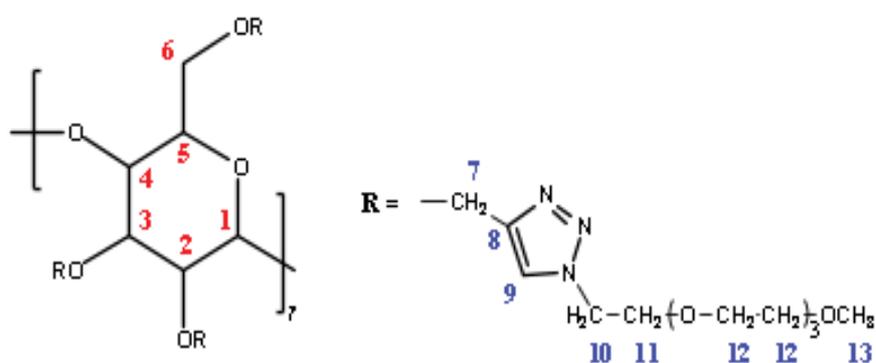


Figure 11 : Représentation des dérivés à 21 branches

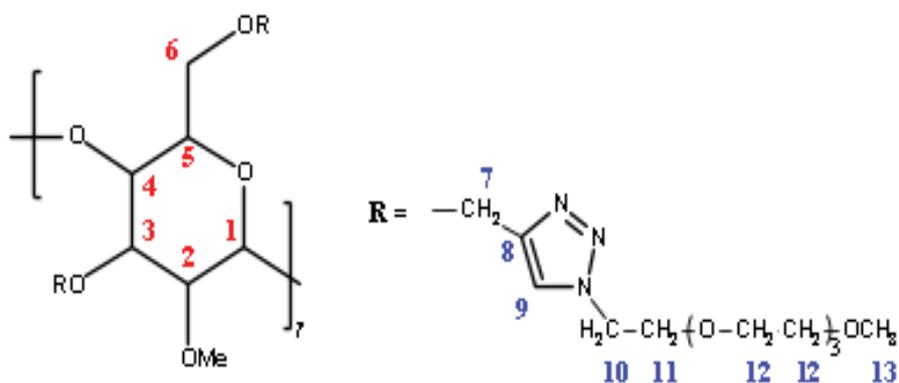
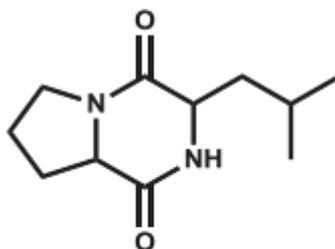


Figure 12 : Représentation des dérivés à 14 branches

2.2.2. Dipeptides cycliques et dérivés :

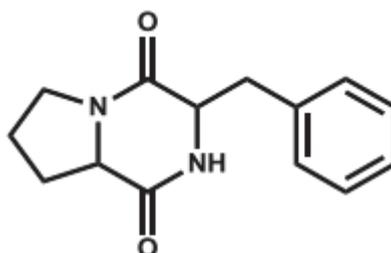
2.2.2.1. Dipeptides cycliques :

Les dipeptides cycliques utilisés pour ce travail étaient la cyclo (Leucine-Proline) et la cyclo (Phénylalanine-Proline) (figures 13 et 14).



Cyclo(Leucine-Proline)
Cyclo(LP) 46.5mg
M = 210.28 g/mol

Figure 13 : Représentation de la Cyclo(Leucine-Proline)



Cyclo(Phénylalanine-Proline)
Cyclo(FP) 46.3mg
M = 244.29 g/mol

Figure 14 : Représentation de la Cyclo(Phénylalanine-Proline)

Les poudres des deux composés ont été dissoutes dans un mélange eau stérilisée/méthanol (8%) (VWR BDH Chemicals) de façon à reproduire les mêmes conditions que lors du travail de Rhee. Les solutions mères étaient à une concentration $C = 5,12 \text{ g/L}$.

2.2.2.2. Dérivés des dipeptides cycliques :

La fixation d'un radical polyglycidol (figure 15) a permis une meilleure solubilité dans l'eau (50).

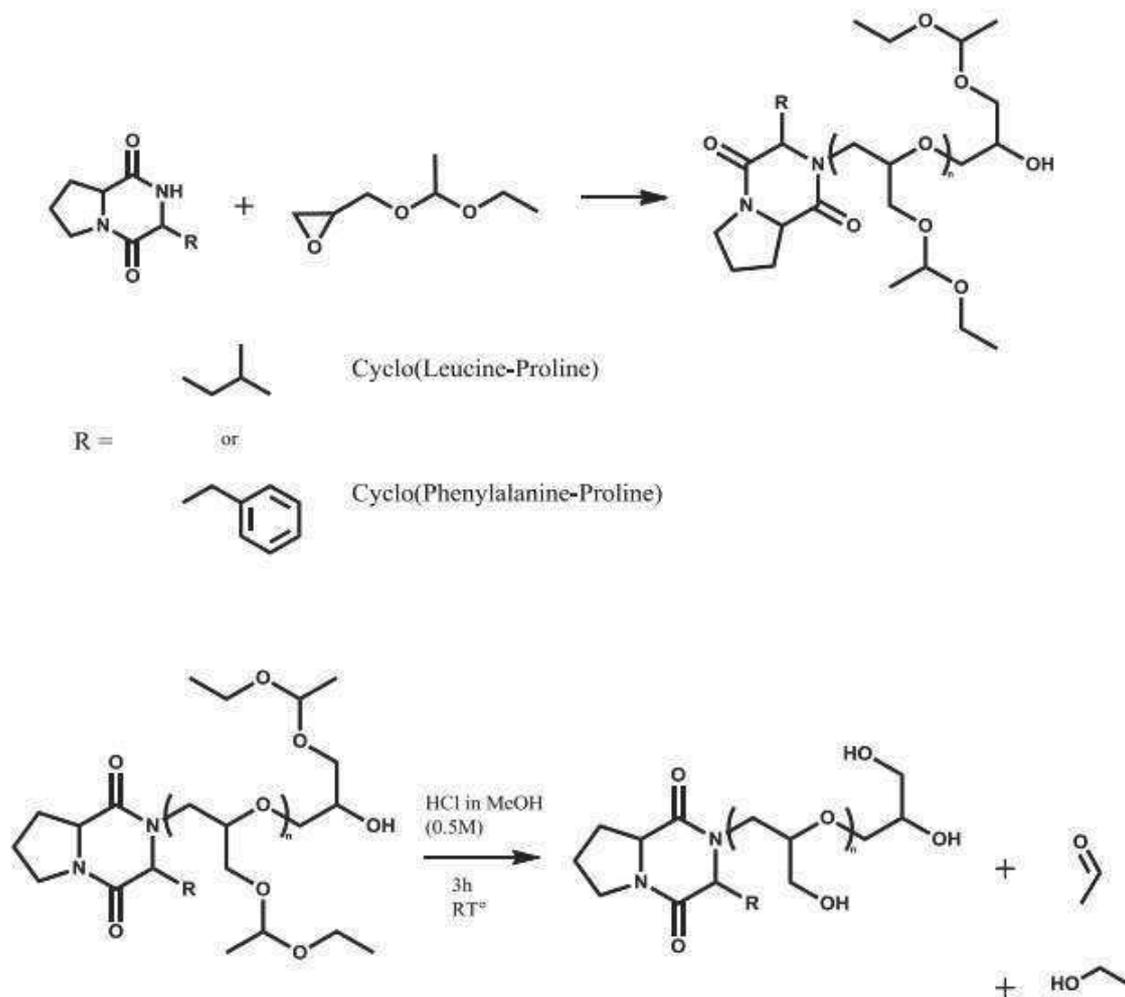


Figure 15 : Synthèse d'un dérivé polyglycidolé à partir d'un dipeptide cyclique

Les dipeptides cycliques polyglycidolés portent la dénomination VP (figures 16, 17, 18 et 19). Ils ont tous été fournis par le Professeur Philippe Guégan (Institut Parisien de Chimie moléculaire, Sorbonne Université, Paris).

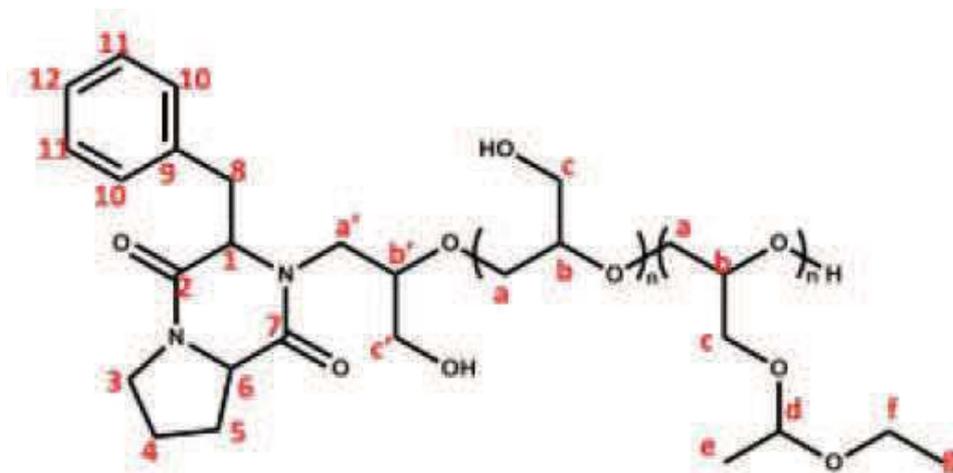


Figure 16 : Représentation du VP 12-6D (cyclo(Phe-Pro) – poly(glycidol))

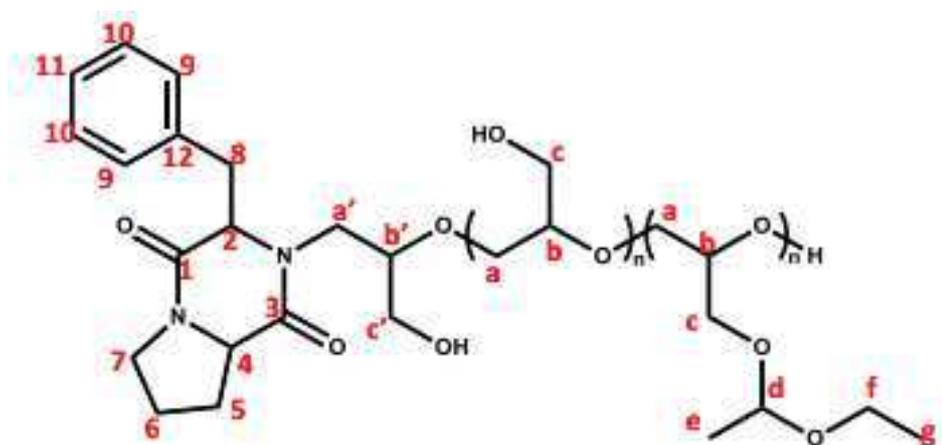


Figure 17 : Représentation du VP 12-9D (cyclo(Phe-Pro) - poly(glycidol))

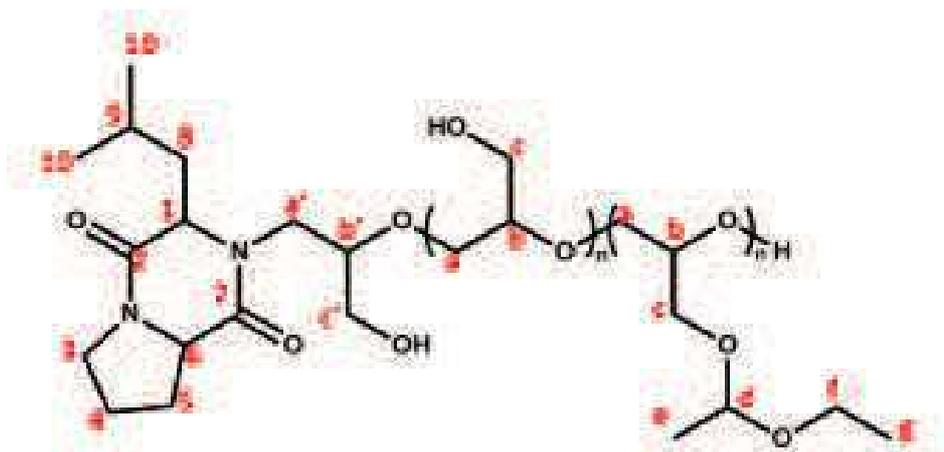


Figure 18 : Représentation du VP 3-32D (cyclo(Leu-Pro) – poly(glycidol))



Figure 19 : Représentation du VP 3-35D (cyclo(Leu-Pro) – poly(glycidol))

2.2.3. Antibiotiques :

Les antibiotiques utilisés pour les tests de synergie ont été dissous dans de l'eau stérilisée pour réaliser des solutions mères de concentration $C = 5,12$ g/L chacun. Ils provenaient de chez Panpharma (amoxicilline (figure 20), ceftriaxone (figure 21), gentamicine (figure 22)) et Sandoz (vancomycine (figure 23)).

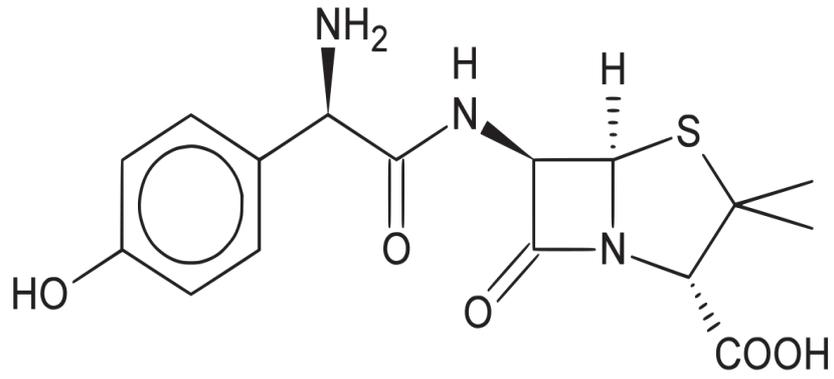


Figure 20 : Représentation de l'amoxicilline

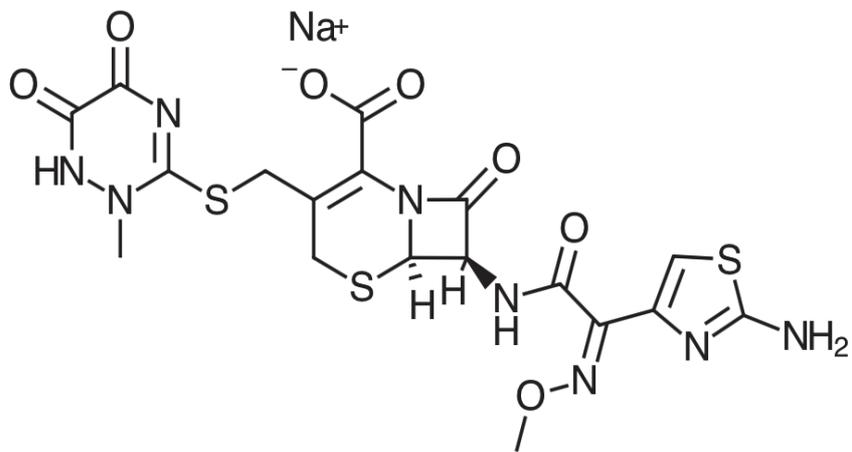


Figure 21 : Représentation de la ceftriaxone

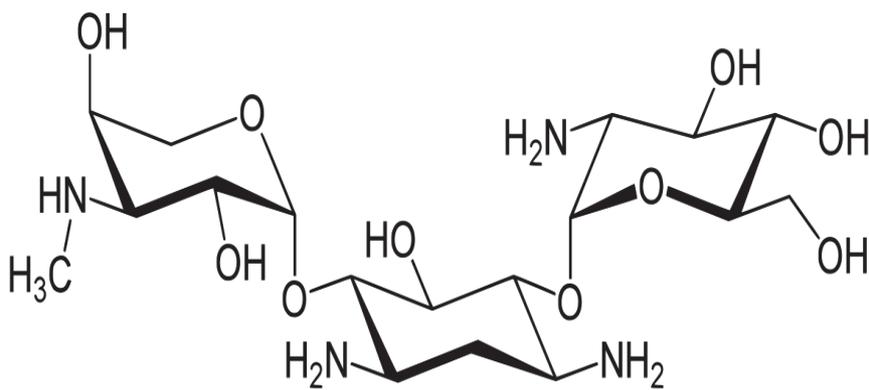


Figure 22 : Représentation de la gentamicine

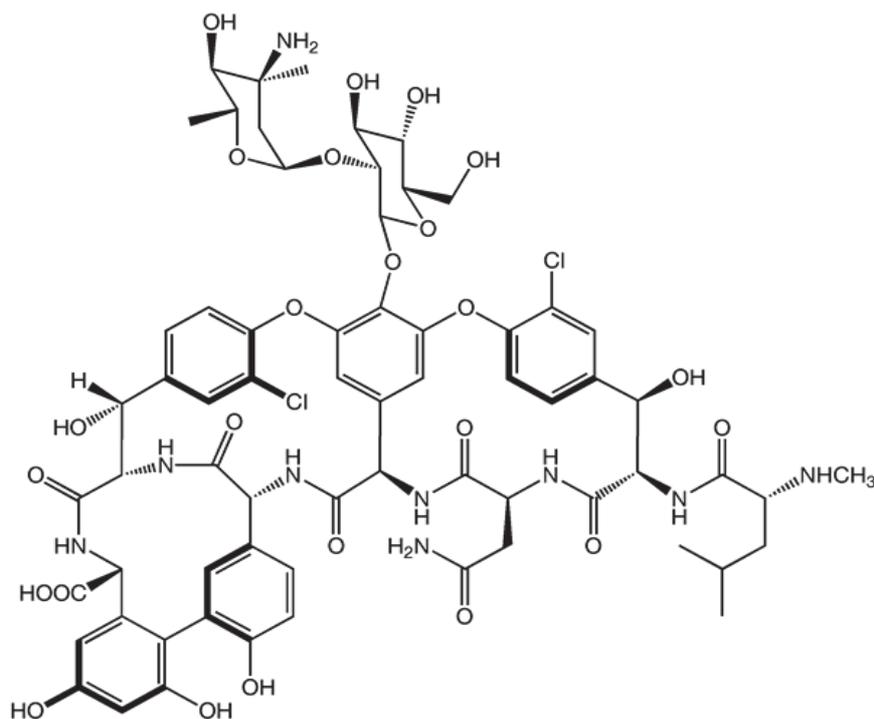


Figure 23 : Représentation de la vancomycine

2.3. Technique de détermination des concentrations minimales inhibitrices utilisée :

Afin d'évaluer l'action antibiotique des molécules testées, la méthode de CMI par microdilution en milieu liquide (BMD) a été utilisée (51).

Cette méthode est réalisée sur plaques de 96 micropuits.

L'inoculum bactérien a été réalisé à partir d'une suspension de 0,5 McFarland (McF) qui correspond à $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (52), laquelle a été diluée au $1/100^{\text{ème}}$ pour obtenir une concentration bactérienne d'environ 1×10^6 UFC/mL. Ensuite, 100 μ L étaient distribués dans chaque puit pour un volume final de 200 μ L (cf. infra), soit une concentration bactérienne de 5×10^5 UFC/mL par puit.

Pour déterminer les CMI, les solutions mères des molécules testées étaient à une concentration de 5,12 g/L. Une gamme de concentration de raison géométrique 2, allant de

512 mg/L à 0,5 mg/L, était ensuite réalisée à partir de ces solutions mères. Enfin, 100 µL étaient distribués dans chaque puit, diluant ainsi les concentrations au ½, soit une gamme de 256 mg/L à 0,25 mg/L (tableau 2).

Tableau 2 : plan de plaque CMI en milieu liquide

| | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | T- |
|------------|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|-----|------|----|
| bactérie 1 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 2 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 3 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 4 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 5 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 6 | | | | | | | | | | | | |
| bactérie 7 | T+ | | | | | | | | | | | |
| bactérie 8 | T+ | | | | | | | | | | | |

T+ : témoin positif. Cupule contenant uniquement l'inoculum bactérien.

T- : témoin négatif. Cupule ne contenant pas d'inoculum bactérien

Le résultat était lu visuellement et la valeur de CMI correspondait à la plus petite concentration pour laquelle il n'y avait pas eu de croissance bactérienne.

L'interprétation des CMI en catégories cliniques (sensible, intermédiaire, résistant) est habituellement effectué selon les recommandations 2019 du CA-SFM/EUCAST.

2.4. Technique de détermination d'une synergie ou d'un antagonisme :

Afin d'observer une action synergique ou antagoniste avec des antibiotiques commercialisés, la technique dite de l'échiquier (*checkerboard assay*) a été utilisée. Les volumes des solutions des molécules à tester étaient de 50 µL chacun et 100 µL d'inoculum bactérien étaient distribués dans chaque puit pour un volume final de 200 µL. Les concentrations des solutions distribuées étaient 4 fois plus importantes afin de prendre en compte la dilution finale par 4 dans chaque cupule (tableau 3).

La valeur de l'association est quantifiée par l'index FIC :

$$\text{FIC} = \text{FICA} + \text{FICB} = \frac{\text{CMI de A avec B}}{\text{CMI de A seul}} + \frac{\text{CMI de B avec A}}{\text{CMI de B seul}}$$

Tableau 3 : plan de plaque "checkerboard assay"

| | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | | |
|---------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|---------|----------|----|----|--|
| 128/32 | 64/32 | 32/32 | 16/32 | 8/32 | 4/32 | 2/32 | 1/32 | 0.5/32 | 0.25/32 | T+ | T- | |
| 128/16 | 64/16 | 32/16 | 16/16 | 8/16 | 4/16 | 2/16 | 1/16 | 0.5/16 | 0.25/16 | | | |
| 128/8 | 64/8 | 32/8 | 16/8 | 8/8 | 4/8 | 2/8 | 1/8 | 0.5/8 | 0.25/8 | | | |
| 128/4 | 64/4 | 32/4 | 16/4 | 8/4 | 4/4 | 2/4 | 1/4 | 0.5/4 | 0.25/4 | | | |
| 128/2 | 64/2 | 32/2 | 16/2 | 8/2 | 4/2 | 2/2 | 1/2 | 0.5/2 | 0.25/2 | | | |
| 128/1 | 64/1 | 32/1 | 16/1 | 8/1 | 4/1 | 2/1 | 1/1 | 0.5/1 | 0.25/1 | | | |
| 128/0.5 | 64/0.5 | 32/0.5 | 16/0.5 | 8/0.5 | 4/0.5 | 2/0.5 | 1/0.5 | 0.5/0.5 | 0.25/0.5 | | | |
| 128/0 | 64/0 | 32/0 | 16/0 | 8/0 | 4/0 | 2/0 | 1/0 | 0.5/0 | 0.25/0 | | | |

Molécule A (mg/L)

Molécule B (mg/L)

3. Résultats :

Les CMI obtenues avec les cyclodextrines alpha-CD et beta-CD seules et en association sont supérieures à 256 mg/L (tableau 4). De plus, Une modification des cyclodextrines par fixation de radicaux de PEG n'a pas montré davantage d'efficacité.

Les CMI obtenues avec les dipeptides cycliques cyclo-FP et cyclo-LP seuls et en association sont supérieures à 256 mg/L (tableau 5). La fixation de polyglycidol à ces molécules a montré une meilleure solubilisation en milieu aqueux mais n'a pas non plus montré d'activité antibactérienne.

La recherche d'une synergie d'action entre les cyclodextrines, les dipeptides cycliques et les antibiotiques ne s'est pas montrée concluante. Les résultats obtenus donnent un FIC entre 1 et 2, ce qui correspond à une indifférence entre les molécules associées. L'association de vancomycine avec les dipeptides cycliques polyglycidolés donne un FIC de 4 chez *S. aureus*, ce qui correspond à une action antagoniste. Un FIC de 0,5 est retrouvé chez *K. pneumoniae* pour les associations ceftriaxone et RX100, cyclo-LP et cyclo-FP (tableau 6).

4. Discussion :

Les résultats obtenus ne sont pas en faveur d'une activité antibactérienne des différentes molécules testées puisque les valeurs de CMI sont supérieures à 256 mg/L pour chacune des molécules testées.

De plus, il n'a pas été mis en évidence d'action synergique entre la majorité des dérivés des cyclodextrines et des dipeptides cycliques avec les antibiotiques testés. Certains résultats de FIC sont en faveur d'un antagonisme (vancomycine et dipeptides cycliques polyglycidolés chez *S. aureus*) ou d'une action synergique (*K. pneumoniae* et les composés RX100, cyclo-FP et cyclo-LP). Cependant, ces analyses n'ayant pas été réalisées en duplicate ou triplicate, il apparaît difficile d'y trouver une interprétation.

La nécessité de voir apparaître de nouveaux antibiotiques sur le marché a entraîné la communauté scientifique à étudier l'action antibiotique de différentes molécules. Deux hypothèses sont alors envisagées. La première est une interaction directe des cyclodextrines et dipeptides cycliques avec la membrane plasmique entraînant une altération de cette dernière et la mort de la bactérie. Dans la 2nde hypothèse, les cyclodextrines et les dipeptides cycliques n'ont pas d'action antibiotique directe mais agissent en synergie avec des antibiotiques déjà commercialisés. C'est ce que ce travail a tenté de démontrer.

4.1. Les dipeptides cycliques et leurs dérivés :

Dans sa publication de 2004 (38), Rhee mettait en évidence une action antibiotique de 2 dipeptides cycliques : la cyclo-FP et la cyclo-LP, ainsi qu'une action synergique antibactérienne de ces deux molécules. De nombreux travaux de recherche sur l'activité biologique des dipeptides cycliques et de leurs dérivés faisaient état de leur action antibiotique sur différentes bactéries (tableau annexe 1).

Les dipeptides cycliques n'existent pas sous forme de zwitterions et sont souvent de charge neutre. Cependant, ils auraient la capacité de former des ponts hydrogène avec le solvant dans lequel ils se trouvent (via les 2 groupements amide du cycle), ainsi que d'interagir dans un milieu hydrophobe (via les 2 radicaux aminés) (53). Néanmoins, ces

composés présentent une faible solubilité dans l'eau, ce qui nécessite l'usage d'autre solvant pour leur solubilisation (le méthanol par exemple dans l'étude de Rhee) ou bien la fixation de radicaux de PEG ou de polyglycidol qui augmente l'hydrosolubilité (50).

Le mécanisme d'action de ces dipeptides cycliques et de leur dérivés n'est cependant pas bien compris et leur activité antibactérienne est comparée à celle des peptides antimicrobiens (54). Ces molécules vont cibler différentes cibles présente sur la membrane plasmique de la bactérie et entrainer une altération de cette dernière, provoquant alors la mort de la bactérie consécutivement à la fuite de ces composants (55). Ces peptides antimicrobiens sont classiquement composés de 12 à 100 acides aminés et sont produits naturellement par un grand nombre d'organismes vivants (56) (57).

Plusieurs caractéristiques physico-chimiques sont requises pour que ces peptides antimicrobiens aient une action antibiotique. Ils possèdent une charge globale positive, ce qui leur permet d'interagir avec les lipides anioniques de la membrane comme le lipide A du LPS (comme c'est le cas pour les polymyxines et la gramicidine S (58)) pour les bactéries à Gram négatif ou bien l'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positif. De plus, ils sont amphiphiles et ont donc une partie hydrophobe qui leur permet de s'insérer dans la membrane plasmique (47).

Le comportement des peptides antimicrobiens une fois lié à la membrane fait l'objet de débat. Il est cependant proposé plusieurs hypothèses (figure 24) (60) :

- Formation d'un canal à travers la membrane (suite à une oligomérisation des peptides)
- Dissolution de la membrane
- Passage au travers de la membrane afin d'atteindre une autre cible

D'après Oren (61) à faible concentration les peptides sont inactifs sur la croissance bactérienne mais le deviennent dès lors qu'une certaine concentration est atteinte. Cela suggère que la forme active est un oligomère.

La discrimination entre cellules eucaryotes et procaryotes est probablement due à la composition en lipides de la membrane (fluidité, densité de charges négatives, absence/présence de cholestérol) (14).

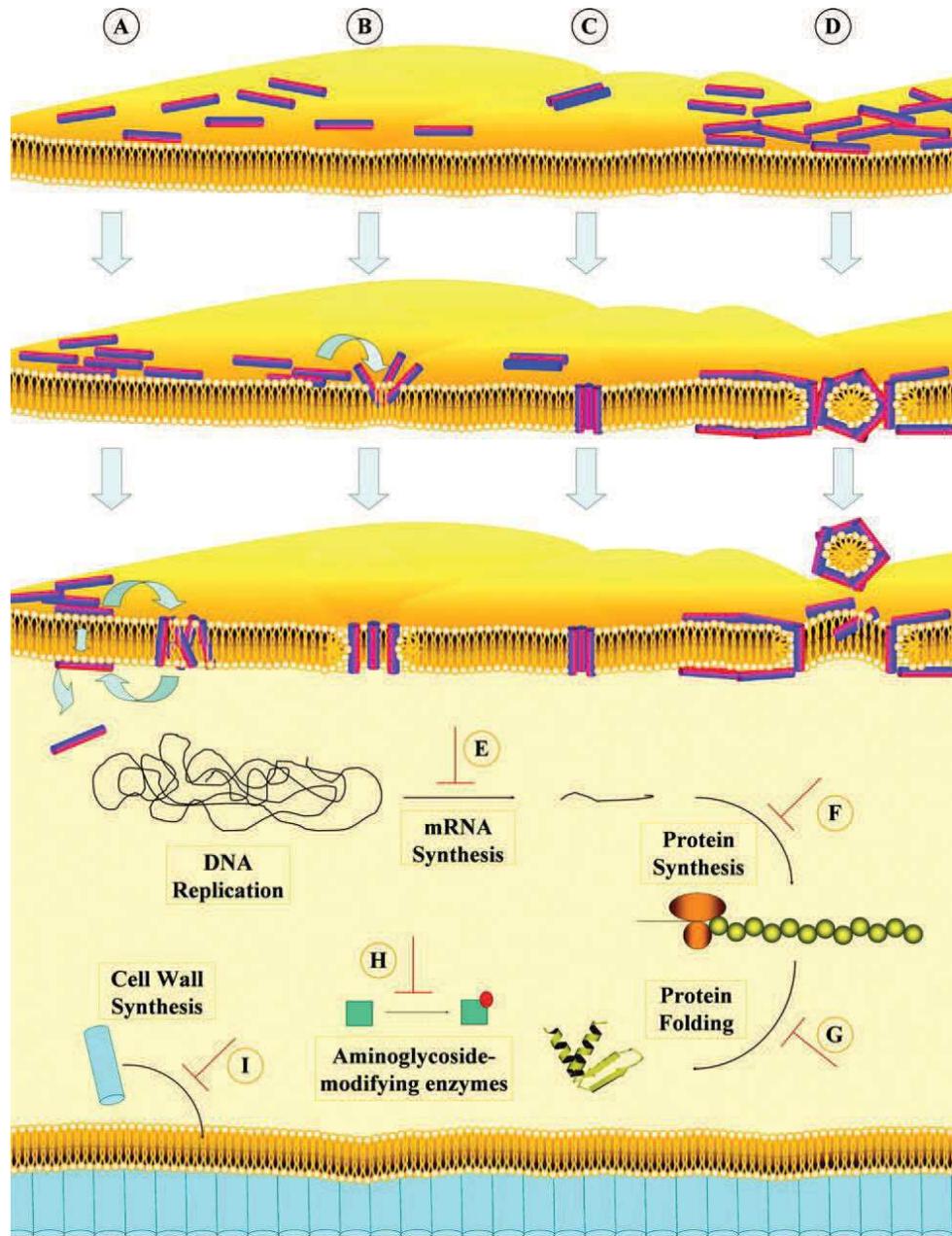


Figure 24 : hypothèses de mécanisme d'action de peptides antimicrobiens

4.2. Les cyclodextrines et leurs dérivés :

Le choix d'utiliser des dérivés des cyclodextrines pour ce travail s'inspire du travail de Yamamura (62). Dans cette étude, Yamamura explique que les cyclodextrines possèdent plusieurs propriétés qui leur permettent de se comporter comme des peptides antimicrobiens sur la membrane plasmique. Ils possèdent en effet une structure cyclique rigide due aux

liaisons hydrogènes liant les différents résidus (figure 25), ce qui leur permettrait de s'insérer plus facilement dans la membrane car chez les analogues peptidiques, la fixation d'acides aminés à la membrane entraîne souvent un changement de conformation du peptide et donc une diminution de l'activité antibactérienne. Yamamura a montré que la présence de groupements aminés serait responsable de la destruction de la membrane plasmique.

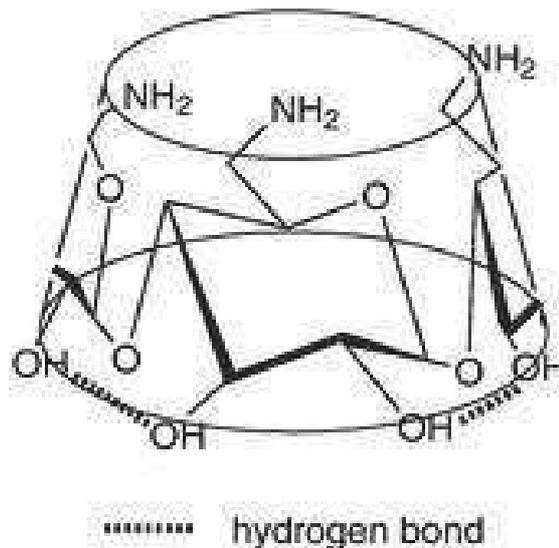


Figure 25 : Représentation de ponts hydrogène d'une molécule de cyclodextrine.

De plus, les propriétés de perméabilisation des cyclodextrines dépendent des radicaux substituants. Les dérivés avec un excès d'hydrophobicité n'entraîneraient pas d'altération de la membrane et, à l'inverse, ceux avec une faible hydrophobicité seraient toxiques pour la membrane cellulaire des procaryotes mais aussi des eucaryotes.

Dans une autre étude (46) Yamamura s'inspire de la colistine comme modèle pour la synthèse de molécules dérivées des cyclodextrines puisque la colistine a une partie cationique qui interagit avec les groupements phosphates anioniques de la membrane plasmique et une partie hydrophobe qui interagit avec les acides gras de la membrane.

Il évalue alors l'augmentation de la perméabilité membranaire par la concentration en K⁺ dans le milieu, témoin de l'efflux de K⁺ hors de la bactérie. Il s'avère que l'efflux de K⁺ était plus faible chez *E. coli*, une bactérie à Gram négatif, que chez *S. aureus*, une bactérie à

Gram positif. Cela peut s'expliquer par le fait que les cyclodextrines sont trop volumineuses et n'atteignent pas la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram négatif. Les cyclodextrines permettraient cependant d'altérer la membrane externe des bactéries à Gram négatif puisqu'une autre étude a montré que l'action de l'érythromycine seule n'empêche pas la croissance d'*E. coli* mais que l'ajout d'une cyclodextrine entraînait une inhibition de la croissance bactérienne. Il y aurait donc bien une action sur la membrane externe, permettant ainsi à l'érythromycine d'atteindre sa cible, la sous-unité 50S du ribosome bactérien, présent dans le cytoplasme de la bactérie.

Plusieurs hypothèses sont formulées quant à l'insertion des cyclodextrines et de leurs dérivés dans la membrane. Selon certains auteurs, les cyclodextrines reconnaîtraient des récepteurs à la surface de la membrane bactérienne, comme des lectines, et s'y lieraient (63). Dans son travail (64) Badi tente de reproduire le comportement des cyclodextrines sur une membrane plasmique *in vitro*. L'étude de ce comportement par électrophysiologie permet de démontrer que ces cyclodextrines sont bien responsables de formation de pores dans la membrane plasmique et l'hypothèse formulée est celle de l'assemblage de ces molécules en demi-canaux (figure 26) (65). Cependant, l'épaisseur de la membrane plasmique externe d'une bactérie à Gram négatif est d'environ 2,5-3 nm (66) et dans une étude similaire (67) Eskandani et al. démontrent que les cyclodextrines peuvent créer un canal à travers une bicouche lipidique de 5nm d'épaisseur. Il existe donc des différences entre l'épaisseur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et les membranes utilisées pour les expérimentations *in vitro*, ce qui amène à la prudence pour l'interprétation.

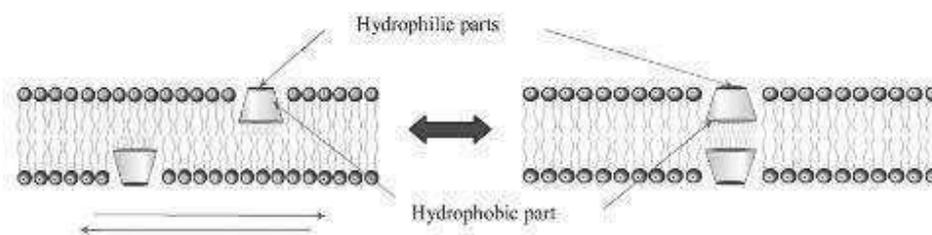


Figure 26 : Schéma d'insertion de molécules de cyclodextrine dans une bicouche lipidique.

Pour finir, les dérivés des cyclodextrines pourraient être trop gros par rapport à la réticulation du peptidoglycane pour diffuser jusqu'à la membrane plasmique. Le rayon des

mailles du peptidoglycane serait de 2,06 nm et laisserait alors passer des protéines d'une masse inférieure à 24 kDa mais pourrait laisser passer des protéines d'une masse de 100 kDa en cas de relâchement (68). Pour autant, le volume hydrodynamique des cyclodextrines n'est pas connu et pourrait très bien être trop important pour en permettre le passage dans un milieu aqueux.

4.3. Rôle de l'opérateur :

Au regard de ces résultats, plusieurs explications peuvent justifier une différence par rapport aux autres publications. Il convient dans un premier temps d'éliminer toutes causes opérateur-dépendant. C'est pourquoi la technique a été effectuée dans un premier temps avec des antibiotiques commercialisés et des souches ATCC dont les valeurs des CMI figurent dans le CA-SFM, ceci afin de s'assurer de sa bonne réalisation. Les calculs de dilution ont été vérifiés afin de s'assurer de l'absence d'une erreur de dilution. Les inocula bactériens ont été réalisés selon la méthode de référence de BMD et à partir de bactéries en phase exponentielle de croissance. Cette phase exponentielle de croissance est très importante puisqu'un antibiotique est actif lors de la duplication bactérienne et donc inactif en phase stationnaire par définition. De plus, la phase de déclin donne un taux de croissance bactérienne négatif et donc, apporte un biais à cette étude.

Une contamination des puits par une autre espèce bactérienne a été envisagée. En effet, les solutions de dipeptides cycliques et de cyclodextrines ont été réalisées à partir d'eau stérilisée et sous PSM (poste de sécurité microbiologique) mais cela n'excluait pas pour autant une contamination. C'est pourquoi les cupules après incubation ont été repiquées sur gélose et les bactéries identifiées afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de la même espèce bactérienne.

L'évaluation des activités synergiques par technique du checkerboard n'ont pas été réalisées en duplicate et c'est ce point-là qui pose la limite de ces résultats.

Cependant, plusieurs limites et biais semblent se dessiner dans certaines études. Dans le cas du travail de Rhee par exemple, l'évaluation des CMI est réalisée sur milieu gélosé et non par BMD, qui est la technique de référence. De plus, les inocula bactériens sont plus faibles (10^4 UFC/puit contre 10^5 UFC/puit pour la méthode de référence) et il n'est pas

précisé si les bactéries étaient bien en phase exponentielle de croissance, ce qui peut apporter un biais supplémentaire si ce n'était pas le cas. Enfin, la teneur en ions divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) du milieu n'est pas précisée dans cette étude, or il est bien connu que certains antibiotiques agissant sur la membrane (ex : daptomycine) ont besoin de Ca^{2+} pour pouvoir fonctionner et que leur action antibiotique ne peut s'apprécier *in vitro* qu'en présence d'une certaine concentration en cations divalents. Cela peut ainsi apporter un biais supplémentaire à ce genre d'étude.

5. Conclusion :

Lors de cette étude, les différents dérivés des cyclodextrines et de dipeptides cycliques testés n'ont pas montré d'action antibactérienne, ainsi qu'une action synergique avec d'autres antibiotiques déjà commercialisés. Ces résultats sont en contradiction avec ceux déjà publiés sur le sujet mais il serait nécessaire de reproduire exactement les mêmes études afin de pouvoir les comparer entre elles.

Bibliographie

1. Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* [Internet]. déc 1940 [cité 21 août 2019];146(3713):837- 837. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/146837a0>
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1 janv 2009 [cité 24 août 2019];48(1):1- 12. Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/article/48/1/1/288096>
3. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* [Internet]. 2 avr 2016 [cité 21 août 2019];7(3):252- 66. Disponible sur: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
4. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1645- 58.
5. CDC. The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S. [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cité 22 sept 2019]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html
6. World Health Organization, éditeur. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
7. Publications | AMR Review [Internet]. [cité 23 sept 2019]. Disponible sur: <https://amr-review.org/Publications.html>
8. Rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques. :150.
9. Pulcini C, Bush K, Craig WA, Frimodt-Møller N, Grayson ML, Mouton JW, et al. Forgotten Antibiotics: An Inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin Infect Dis* [Internet]. 15 janv 2012 [cité 27 sept 2019];54(2):268- 74. Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/article/54/2/268/471278>
10. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. juin 2013;56(12):1685- 94.
11. Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci* [Internet]. mai 2014 [cité 23 août 2019];119(2):149- 53. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4034552/>
12. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clin Microbiol Rev* [Internet]. avr 1988 [cité 23 août 2019];1(2):139- 56. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358039/>
13. Kumar SN, Lankalapalli RS, Kumar BSD. In Vitro Antibacterial Screening of Six Proline-Based Cyclic Dipeptides in Combination with β -Lactam Antibiotics Against Medically Important Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 1 mai 2014 [cité 21 août 2019];173(1):116- 28. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0808-3>
14. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Pept Sci* [Internet]. 1998 [cité 7 oct 2019];47(6):415- 33. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0282%281998%2947%3A6%3C415%3A%3AAID-BIP2%3E3.0.CO%3B2-D>
15. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2002 [cité 8 oct 2019];71:635- 700. Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2569852/>

16. Outer Membrane Biogenesis | Annual Review of Microbiology [Internet]. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-090816-093754>
17. Porfirio S, Carlson RW, Azadi P. Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset. Trends Microbiol [Internet]. 1 juill 2019 [cité 8 oct 2019];27(7):607- 22. Disponible sur: [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(19\)30022-8](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(19)30022-8)
18. Proteomics C. Peptidoglycan Structure Analysis [Internet]. Creative Proteomics. [cité 8 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.creative-proteomics.com/services/peptidoglycan-structure-analysis.htm>
19. Wang X, Li Y, Zhang X, Lai D, Zhou L. Structural Diversity and Biological Activities of the Cyclodipeptides from Fungi. Molecules [Internet]. déc 2017 [cité 22 août 2019];22(12):2026. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/12/2026>
20. Borthwick AD. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. Chem Rev [Internet]. 11 juill 2012 [cité 21 août 2019];112(7):3641- 716. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/cr200398y>
21. Fenical William. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem Rev [Internet]. 1 juill 1993 [cité 21 août 2019];93(5):1673- 83. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00021a001>
22. Stierle AC, Cardellina JH, Singleton FL. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. Experientia [Internet]. 1 déc 1988 [cité 21 août 2019];44(11):1021- 1021. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/BF01939910>
23. De Rosa S, Mitova M, Tommonaro G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. Biomol Eng [Internet]. 1 juill 2003 [cité 21 août 2019];20(4):311- 6. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389034403000388>
24. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms - Natural Product Reports (RSC Publishing) DOI:10.1039/B301926H [Internet]. [cité 21 août 2019]. Disponible sur: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2004/np/b301926h>
25. Huang R, Zhou X, Xu T, Yang X, Liu Y. Diketopiperazines from Marine Organisms. Chem Biodivers [Internet]. 2010 [cité 21 août 2019];7(12):2809- 29. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.200900211>
26. Lieberman HR, Kanarek RB, Prasad C. Nutritional Neuroscience. CRC Press; 2005. 430 p.
27. Prasad C. Bioactive cyclic dipeptides. Peptides [Internet]. 1 janv 1995 [cité 21 août 2019];16(1):151- 64. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019697819400017Z>
28. Martins MB, Carvalho I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. Tetrahedron [Internet]. oct 2007 [cité 21 août 2019];63(40):9923- 32. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402007012112>
29. (-)-Phenylhistin Arrests Cells in Mitosis by Inhibiting Tubulin Polymerization [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/52/2/52_2_134/_article/-char/ja/
30. Synthesis and Antiviral Properties of Arabino and Ribonucleosides of 1,3-Dideazaadenine, 4-Nitro-1, 3-dideazaadenine and Diketopiperazine: Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids: Vol 23, No 12 [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/NCN-200040614>
31. Discovery of a Class of Diketopiperazines as Antiprion Compounds - Bolognesi - 2010 - ChemMedChem - Wiley Online Library [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmde.201000133>

32. Kilian G, Jamie H, Brauns SCA, Dyason K, Milne PJ. Biological activity of selected tyrosine-containing 2,5-diketopiperazines [Internet]. 2005 [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2005/00000060/00000004/art00014>
33. Imamura M, Prasad C. Cyclo (His-Pro) potentiates GABA/ethanol-mediated chloride uptake by neurosynaptosomes. *Peptides* [Internet]. 1 mars 2003 [cité 22 août 2019];24(3):445- 8. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978103000603>
34. Withers H, Swift S, Williams P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 1 avr 2001 [cité 22 août 2019];4(2):186- 93. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527400001879>
35. Controlling Pathogenic Gram-Negative Bacteria by Interfering with...: Ingenta Connect [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ddro/2005/00000002/00000001/art00002>
36. Rhee K-H, Choi K-H, Kim C-J, Kim C-H. Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 Producing Antibiotic Substance Inhibitory to Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2001 [cité 22 août 2019];11(3):469- 74. Disponible sur: <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200111920817833.page>
37. Rhee K-H. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. *J Gen Appl Microbiol*. 2002;48(6):321- 7.
38. Rhee K-H. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 1 nov 2004 [cité 22 août 2019];24(5):423- 7. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857904002183>
39. Karginov VA. Cyclodextrin derivatives as anti-infectives. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 1 oct 2013 [cité 22 août 2019];13(5):717- 25. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489213001537>
40. de Oliveira Andrade L. Understanding the role of cholesterol in cellular biomechanics and regulation of vesicular trafficking: The power of imaging. *Biomed Spectrosc Imaging* [Internet]. 1 janv 2016 [cité 7 oct 2019];5(s1):S101- 17. Disponible sur: <https://content.iospress.com/articles/biomedical-spectroscopy-and-imaging/bsi157>
41. Cyclodextrins - Valentino J. Stella, Quanren He, 2008 [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0192623307310945>
42. VIDAL - Itraconazole [Internet]. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/substances/3992/itraconazole/>
43. VIDAL - Voriconazole [Internet]. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/substances/21915/voriconazole/>
44. Romeo L, Lanza Cariccio V, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E. The α -Cyclodextrin/Moringin Complex: A New Promising Antimicrobial Agent against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* [Internet]. sept 2018 [cité 22 août 2019];23(9):2097. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2097>
45. Antibacterial activity of cyclodextrins against *Bacillus* strains | SpringerLink [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-008-0415-1>
46. Yamamura H, Suzuki K, Uchibori K, Miyagawa A, Kawai M, Ohmizo C, et al. Mimicking an antimicrobial peptide polymyxin B by use of cyclodextrin. *Chem Commun* [Internet]. 14 déc 2011 [cité 22 août 2019];48(6):892- 4. Disponible sur: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c1cc16369h>
47. Smail F. Antibiotic Susceptibility and Resistance Testing: An Overview [Internet]. Canadian

- Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2000 [cité 27 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/cjgh/2000/382415/abs/>
48. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 juill 2001 [cité 7 oct 2019];48(suppl_1):5- 16. Disponible sur: https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513
 49. P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen. *Antibiogramme*. 2ème. 8 p.
 50. Dworak A, Slomkowski S, Basinska T, Gosecka M, Wałach W, Trzebicka B. Polyglycidol - how is it synthesized and what is it used for? *Polimery*. 1 sept 2013;58:641-9.
 51. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2003 [cité 14 oct 2019];9(8):ix- xv. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
 52. TM53.pdf [Internet]. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf
 53. Medicinal Chemistry: The Biological Activity of Selected Cyclic Dipeptides - MILNE - 1998 - *Journal of Pharmacy and Pharmacology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03355.x>
 54. Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial Peptides and Their Analogs: Searching for New Potential Therapeutics. *Perspect Med Chem* [Internet]. 12 oct 2014 [cité 8 oct 2019];6:73- 80. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4213192/>
 55. Hancock REW, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1 janv 2002 [cité 22 août 2019];206(2):143- 9. Disponible sur: <https://academic.oup.com/femsle/article/206/2/143/479317>
 56. Hancock REW, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1 févr 1998 [cité 6 oct 2019];16(2):82- 8. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779997011566>
 57. Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1995 [cité 6 oct 2019];58(2):128- 36. Disponible sur: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jlb.58.2.128>
 58. Hancock REW, Chapple DS. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 juin 1999 [cité 7 oct 2019];43(6):1317- 23. Disponible sur: <https://aac.asm.org/content/43/6/1317>
 59. Hancock REW, Patrzykat A. Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: From Natural to Novel Antibiotics [Internet]. 2002 [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdtid/2002/00000002/00000001/art00008>
 60. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1 juill 2006 [cité 7 oct 2019];19(3):491- 511. Disponible sur: <https://cmr.asm.org/content/19/3/491>
 61. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Pept Sci* [Internet]. 1998 [cité 7 oct 2019];47(6):451- 63. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0282%281998%2947%3A6%3C451%3A%3AAID-BIP4%3E3.0.CO%3B2-F>
 62. Yamamura H, Sugiyama Y, Murata K, Yokoi T, Kurata R, Miyagawa A, et al. Synthesis of antimicrobial cyclodextrins bearing polyarylamino and polyalkylamino groups via click chemistry for bacterial membrane disruption. *Chem Commun* [Internet]. 24 avr 2014 [cité 7 oct 2019];50(41):5444- 6. Disponible sur: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/cc/c3cc49543d>
 63. Attioui F, Al-Omar A, Leray E, Parrot-Lopez H, Finance C, Bonaly R. Recognition ability and cytotoxicity of some oligosaccharidylsubstituted β -cyclodextrins. *Biol Cell* [Internet]. 1994 [cité 3 oct 2019];76(1):1- 10. Disponible sur: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1994/bc/bc32101a>

2019];82(2-3):161-7. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/S0248-4900%2894%2980018-9>

64. Badi N, Auvray L, Guégan P. Synthesis of Half-Channels by the Anionic Polymerization of Ethylene Oxide Initiated by Modified Cyclodextrin. *Adv Mater* [Internet]. 2009 [cité 6 oct 2019];21(40):4054-7. Disponible sur:

<https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.200802982>

65. Tabushi I, Kuroda Y, Yokota K. A,B,D,F-tetrasubstituted β -cyclodextrin as artificial channel compound. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 1 janv 1982 [cité 3 oct 2019];23(44):4601-4. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403900856646>

66. Wu EL, Fleming PJ, Yeom MS, Widmalm G, Klauda JB, Fleming KG, et al. E. coli Outer Membrane and Interactions with OmpLA. *Biophys J* [Internet]. 3 juin 2014 [cité 8 oct 2019];106(11):2493-502. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052237/>

67. Eskandani Z, Le Gall T, Montier T, Lehn P, Montel F, Auvray L, et al. Polynucleotide transport through lipid membrane in the presence of starburst cyclodextrin-based poly(ethylene glycol)s. *Eur Phys J E* [Internet]. 15 nov 2018 [cité 22 août 2019];41(11):132. Disponible sur: <https://doi.org/10.1140/epje/i2018-11743-3>

68. Vollmer W, Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* [Internet]. 1 sept 2008 [cité 8 oct 2019];1778(9):1714-34. Disponible sur:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607002210>

Annexes :

Annexe 1 : Tableau reprenant les différents dipeptides cycliques et dérivés ayant une action antibiotique

| nom du DPC ou dérivé | origine | action antibactérienne | source |
|---|---|---|------------------|
| cyclo(L-Leu-L-Pro) | <i>Streptomyces</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> ERV | Rhee |
| cyclo(L-Leu-L-Pro) + cyclo(L-Phe-L-Pro) | <i>Streptomyces</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> ERV, <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Rhee |
| cyclo(L-Leu-L-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Phe-L-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(Gly-L-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Pro-L-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Pro-L-Val) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Leu-L-trans-4-OH-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Phe-L-trans-4-OH-Pro) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> | Furtadoa |
| cyclo(L-Pro-L-Pro) | <i>Lucilia sericata</i> | <i>Micrococcus luteus</i> , <i>P.aeruginosa</i> | Huberman |
| cyclo(L-Phe-L-Pro) | <i>Psychrobacter</i> | <i>Vibrio vulnificus</i> (action protective) | Li |
| cyclo(L-Arg-L-Leu) | <i>Streptomyces</i> | antibactérienne | Smaoui |
| cyclo(D-Trp-L-Trp) | <i>Penicillium fellutanum</i> , <i>Streptomyces</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Lee |
| CJ-17,665 | <i>Aspergillus ochraceus</i> | <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecalis</i> | Sugie |
| acide rhodotorulique | <i>Rhodotorula pilimanae</i> | antibactérienne en liant le fer | Atkin |
| echinuline | <i>Aspergillus amstelodami</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Allen |
| Roquefortine C | <i>Penicillium</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | Kopp-Holtwiesche |
| Cyclomazarines A et B | <i>Salinispora arenicola</i> | <i>S. aureus</i> meti-R et <i>E. faecalis</i> ERV | Schultz |
| cyclo(glycyl-L-tyrosyl)-4,4-dimethylallyl ether | <i>Gliocladium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> | Koolen |
| albonoursin | <i>Actinomyces tumemacerans</i> | <i>Bacillus</i> sp. | Fukushima |
| albonoursin | <i>Nocardiosis alba</i> | <i>E. coli</i> ? <i>Paenibacillus larvae</i> ? | Yongli |
| bisdethiobis(methylthio)gliotoxin | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <i>S. aureus</i> | Guimaraes |
| sirodesmin | fungi | Gram + | Boudart |
| thia-diketopiperazines | <i>Microsphaeropsis</i> | <i>Bacillus</i> sp, <i>S.aureus</i> , <i>luteus</i> | Funabashi |

| | | | |
|--------------------------------------|--|--|---|
| bicyclomycin (antibiotique) | <i>Streptomyces sapporonensis</i> et <i>aizunensis</i> | <i>Proteus, P. aeruginosa, M. luteus</i> | Kamiya et Nishida, Kohn, Muller, Williams, Park, Santillan |
| cyclo(D-Pro-L-Pro) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(L-Pro-L-Met) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(D-Pro-L-Phe) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(L-Pro-L-Phe) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(L-Pro-L-Tyr) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(L-Pro-D-Tyr) | <i>Bacillus</i> sp | <i>S. epidermidis, K.pneumoniae, P. mirabilis, V. cholerae</i> | Nishanth |
| cyclo(L-Pro-D-Ile) | <i>E. coli</i> GZ-34 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | Shishao |
| cyclo(L-Pro-L-Phe) | <i>E. coli</i> GZ-34 | <i>Ralstonia solanacearum</i> | Shishao |
| cyclo(L-Phe-L-Pro) | synthetisés in vitro | <i>E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia, S. aureus, B. subtilis, S. pneumoniae</i> | Milne |
| cyclo(L-Tyr-L-Pro) | synthetisés in vitro | <i>E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia, S. aureus, B. subtilis, S. pneumoniae</i> | Milne |
| cyclo(L-Try-L-Pro) | synthetisés in vitro | <i>E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia, S. aureus, B. subtilis, S. pneumoniae</i> | Milne |
| cyclo(L-Try-L-Try) | synthetisés in vitro | <i>E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia, S. aureus, B. subtilis, S. pneumoniae</i> | Milne |
| cyclo(Val-Val) | synthetisés in vitro | <i>Vibrio cholerae</i> (inhibition expression gène de virulence) | Amit |
| cyclo(L-Trp-L-Pro) ou brevianamide F | <i>Penicillium vinaceum</i> | | Asiri |
| cyclo(L-Trp-L-Pro) ou brevianamide F | <i>Pseudallescheria</i> sp. | <i>S. aureus</i> | Zhang |
| brevianamide S | <i>Aspergillus versicolor</i> | | Song |

| | | | |
|---|--|--|------------------|
| 8,9-dihydroxyfumitremorgin C | <i>Pseudallescheria</i> sp. | <i>S. aureus</i> | Zhang |
| fumitremorgin C | <i>Pseudallescheria</i> sp. | <i>S. aureus</i> | Zhang |
| Piscarinine A et B | <i>Penicillium</i> <i>piscarium</i> | | Kozlovsky |
| Speramide A | <i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | Chang |
| Asperazine | <i>Aspergillus</i> sp. KJ- 9 | | Xiao |
| Cristatumin A | <i>Eurotium cristatum</i> | <i>E. coli, S. aureus</i> | Du |
| Cristatumin E | <i>Eurotium</i> <i>herbarorium</i> | <i>E. coli, E.</i> <i>aerogenes</i> | Li |
| 3-((1-Hydroxy-3-(2-methylbut-3-en-2-yl)-2-oxoindolin-3-yl)methyl)-1-methyl-3,4-dihydrobenzo(1,4)diazepine-2,5-dione | <i>Aspergillus</i> sp. | <i>Vibrio</i> sp. | Zhou |
| cyclo(Phe-Ser) | <i>Verticillium</i> <i>hemipterigenum</i> | | Isaka |
| Diatretol | <i>Clitocybe diatreta</i> | | Arnone |
| Diphenylalazine C | <i>Schizophyllum</i> <i>commune</i> | | Chunyu |
| Spirobrocazine C | <i>Penicillium brocae</i> | | Meng |

DEVAUX Jean-Maxime - Dipeptides cycliques et dérivés des cyclodextrines : évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne.

58 feuilles, 26 illustrations, 6 tableaux, 30 cm.- Thèse : Pharmacie ; Rennes 1; 2019 ; N°

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique et la découverte de nouveaux médicaments aux propriétés antibactériennes est maintenant un défi majeur de la communauté scientifique. De nombreuses recherches sont ainsi réalisées sur des molécules ciblant les membranes des bactéries. Ce travail s'est intéressé aux propriétés antibactériennes de deux molécules susceptibles d'agir sur les membranes bactériennes : les dérivés des cyclodextrines et les dipeptides cycliques. Pour cela, l'activité *in vitro* de ces produits a été évaluée à l'aide de différentes méthodologies standardisées sur une collection de souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*). La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été réalisée par la technique de microdilution en milieu liquide et l'évaluation d'une action synergique des composés testés avec des antibiotiques déjà commercialisés sur le marché (amoxicilline, ceftriaxone, vancomycine et gentamicine) a été réalisée par la technique de l'échiquier ou « checkerboard assay ». Les CMI obtenues pour les différents composés testés étaient toutes supérieures à 256 mg/L, ce qui témoigne d'une absence d'activité antibactérienne. Le « Fractional inhibitory concentration » (FIC) est un index calculé qui indique si deux composés associés entre eux présentent une action synergique, antagoniste ou bien indifférente. La majorité des FIC obtenus avec les molécules étudiées indiquait une association indifférente entre les antibiotiques d'une part et les dipeptides cycliques ou les dérivés des cyclodextrines d'autre part. Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'autres études sur le sujet et amènent donc à se poser certaines questions quant au mécanisme d'action supposé de ces molécules sur les membranes bactériennes et à la méthodologie des autres études. Ce travail n'a pas mis en évidence d'activité antibactérienne des dipeptides cycliques et dérivés des cyclodextrines testés mais des études complémentaires pourraient être entreprises pour évaluer d'autres effets sur la physiologie bactérienne (ex. biofilm, adhésion, quorum sensing,...).

Increasing antibiotic resistance has become a major public health problem and the discovery of new antibacterial drugs is now a major challenge for the scientific community. Many research projects are currently conducted on molecules targeting bacterial membranes. This work focused on two types of compounds that could putatively exert antibacterial properties through an interaction with bacterial membranes: cyclodextrin derivatives and cyclic dipeptides. For this purpose, the *in vitro* activity of these products was assessed using different standardised methodologies against a collection of bacterial reference strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*). Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the broth microdilution method and the evaluation of synergistic action of tested compounds with commercially-available antibiotics (i.e., amoxicillin, ceftriaxone, vancomycin and gentamicin) was performed using the checkerboard assay. MICs obtained for the different tested compounds were all higher than 256 mg/L, indicating a lack of antibacterial activity. Fractional inhibitory concentration (FIC) is a calculated index that indicates whether two compounds associated with each other have synergistic, antagonistic or indifferent action. The majority of FICs obtained with the tested molecules indicated an indifferent association between antibiotics on the one hand and cyclic dipeptides or cyclodextrin derivatives on the other. These results are in contradiction with those published in some previous studies and therefore raise some questions about the supposed mechanism of action of these molecules on bacterial membranes and about the methodology used in other studies. This work has not shown antibacterial activity of cyclodextrin derivatives or cyclic dipeptides tested but further investigation may be undertaken to evaluate other effects on bacterial physiology (biofilm, adhesion, quorum sensing,...).

Rubrique de classement : BACTERIOLOGIE

Mots-clés: Cyclodextrines, dipeptides cycliques ; antibiotiques ; concentration minimale inhibitrice

Mots-clés anglais MeSH : Cyclodextrins ; cyclic dipeptides ; antibiotics ; minimal inhibitory concentration

JURY : Pr Anne Gougeon. PU-PH (Présidente du jury)
Pr Vincent Cattoir. PU-PH (Directeur de thèse)
Pr Philippe Guégan. PU (assesseur)
Dr Florian Lemaître. MCU-PH (assesseur)