

**Année 2021-2022 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom du directeur de thèse : [LANDON Céline](#)
Co-directeur de thèse (éventuellement) :
Unité, Equipe : CBM, AMV, groupe RMN
Filière de rattachement : C
Email de l'encadrant : celine.landon@cnrs-orleans.fr

2. Titre de la thèse : [Mécanismes d'actions des défensines](#)

3. Mots-clés Peptides Antimicrobiens (PAM), peptides riches en ponts disulfures (DRP), Résonance Magnétique Nucléaire, microscopie de fluorescence, structure, membranes.

3. Résumé :

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui un réel problème de santé public dont les prévisions annoncent plus de 10 millions de morts par an en 2050. Les peptides antimicrobiens (PAMs), produits naturellement par tout organisme vivant, et optimisés au cours de l'évolution, sont l'une des alternatives les plus prometteuses aux antibiotiques, moins propices à l'acquisition rapide de résistance. Parmi les PAMs, nous nous intéressons à deux familles de défensines, petites protéines cationiques riches en ponts disulfures. **L'objectif de cette thèse est de disséquer leurs mécanismes d'actions au niveau atomique, ce qui est une étape indispensable dans la conception d'une nouvelle génération d'antibiotiques.**

Nous suivrons la localisation de la **défensine antibactérienne AvBD103b du manchot Royal** et ses effets de perméabilisation membranaire, sur bactéries vivantes en temps réel par microscopie de fluorescence (Plateforme P@cyfic, CBM). Nous étudierons aussi l'impact de sa translocation sur les membranes de bactéries entières, par RMN du solide (Coll. D. Warschawski, Paris).

Par RMN en solution sur systèmes membranaires modèles, nous étudierons l'interaction de la **défensine antifongique ETD151 issues de papillons** avec un lipide spécifique de la membrane fongique, et identifié comme cible dans la 1^{ère} étape de son mécanisme. Pour compléter notre vision du mécanisme sur des membranes réelles, et étudier l'impact du peptide sur la membrane, nous transposerons les méthodes précédentes de RMN du solide sur des champignons entiers (Coll. D. Warschawski, Paris & IR-RMN Orléans).

4 Thématique, Domaine, Objectifs, Contexte, Méthode, Résultats attendus et Références bibliographiques

Thématique/domaine/objectifs

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui un réel problème de santé public dont les prévisions annoncent plus de 10 millions de morts par an en 2050, soit un nombre de décès supérieur à celui associé au cancer (OMS, 2016). Une des alternatives les plus prometteuses aux antibiotiques, moins propices à l'acquisition rapide de résistance, réside dans l'identification, l'amélioration et/ou le développement de peptides antimicrobiens (PAMs). Les PAMs sont produits naturellement par tout organisme vivant colonisé par un agent pathogène, et leur immense diversité (structurale et fonctionnelle) s'est enrichie au fil de l'évolution. **Parmi les PAMs, nous nous intéressons aux défensines, petites protéines cationiques riches en ponts disulfures (DRPs).**

L'interaction des PAMs avec les membranes des microorganismes est toujours la première étape cruciale, mais elle ne conduit pas nécessairement à la mort du microorganisme par simple lyse. Les mécanismes sont en fait souvent beaucoup plus complexes qu'initialement décrits, combinant des perturbations membranaires variées (ciblées ou non) et des perturbations de processus intracellulaires essentiels, eux aussi variés.

L'objectif de cette thèse est de disséquer ces mécanismes d'actions au niveau atomique, ce qui est une étape indispensable dans la conception d'une nouvelle génération d'antibiotiques.

Contexte/Méthodes/résultats attendus

Le terme défensine couvre deux superfamilles de DRPs indépendantes phylogénétiquement et structuralement. Nous prendrons comme molécules de référence la sphéniscine antibactérienne AvBD103b du Manchot royal pour les défensines dites *trans*-défensines, et le peptide ETD151, optimisé à partir de peptides antifongiques de papillon, pour les défensines dites *cis*-défensines.

La structure 3D de AvBD103b que nous avons déterminée en 2004 (Landon *et al.* 2004a) était la première structure de défensine aviaire. Depuis, nos travaux sur d'autres défensines nous ont permis de mieux comprendre les relations structure-fonction. Cependant pour avoir une vision claire des mécanismes d'action, il nous faut combiner nos approches de biologie structurale, moléculaires, et une approche cellulaire. Pour la première fois, les effets de AvBD103b sur des bactéries vivantes en temps réel viennent d'être explorés par microscopie de fluorescence à champ large (C. Landon Chercheur invité à l'Université de Madison, WI, USA ; Landon *et al.* in prep), et nous permettent de faire les premières hypothèses de son mécanisme. **L'objectif au cours de cette thèse sera d'affiner nos connaissances du mécanisme** i) en important cette méthode de vidéomicroscopie au CBM, et en l'adaptant en microscopie confocale (Plateforme P@cyfic). Le marquage fluorescent de la molécule sera réalisé par le doctorant en collaboration avec le groupe de chimie des peptides du CBM, ce qui permettra de suivre la localisation spatiale précise d'AvBD103b au fil du mécanisme; ii) en étudiant l'impact de la translocation du peptide sur les membranes de bactéries entières, par RMN du solide, selon une méthodologie très originale récemment importée du Canada (Coll. D. Warschawski, Paris) (Laadhari *et al.* 2016 ; Booth *et al.* 2017).

Le peptide antifongique ETD151 a été optimisé à partir de peptides de papillons, en collaboration avec la startup EntoMed SA au début des années 2000 (Landon *et al.* 2004b). Plus récemment, en collaboration avec la société BayerCropscience, nous avons mis en évidence, par une étude protéomique fine, plusieurs voies métaboliques impactées par

l'antifongique (Aumer *et al.* 2020). De plus, un lipide spécifique de la membrane fongique a été identifié comme cible dans la 1^{ère} étape du mécanisme (T. Aumer, thèse CIFRE 2016-2019). **L'objectif au cours de cette thèse sera d'affiner nos connaissances sur cette toute première étape du mécanisme au niveau de la membrane fongique**, en étudiant au niveau atomique les interactions de ETD151 avec ce lipide spécifique. Des études par RMN en solution sur systèmes membranaires modèles ont déjà été initiées au CBM. Pour compléter notre vision du mécanisme sur des membranes réelles, et étudier l'impact du peptide sur l'organisation et la fluidité de la membrane, nous envisageons de transposer les méthodes de RMN du solide sur des champignons entiers (Coll. D. Warschawski, Paris & IR-RMN Orléans).

En conclusion, la dissection des mécanismes d'action de ces PAMs à l'échelle atomique, en combinant des expériences sur modèles membranaires et des expériences sur microorganismes entiers, aidera à concevoir une nouvelle génération d'antibiotiques moins propices à l'acquisition de résistance que les générations actuelles.

Références bibliographiques

Aumer T., Voisin S., Peyrard S., Knobloch T., **Landon C.**, Bulet P. (2020) Impact of an antifungal insect defensin on the proteome of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* *Journal of Proteome Research* 19, 1131-1146.

Booth V., **Warschawski D.E.**, Santisteban N.P., Laadhari M. and Marcotte I. (2017) Recent progress on the application of 2H solid-state NMR to probe the interaction of antimicrobial peptides with intact bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 1500-1511

Laadhari M., Arnold A.A., Gravel A.E., Separovic F. and Marcotte I. (2016) Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by 2H solid-state NMR. *Biochim. Biophys Acta* 1858, 2959-2964.

Landon, C., Thouzeau, C., Labbe, H., Bulet, P., and Vovelle, F. (2004a). Solution structure of spheniscin, a beta-defensin from the penguin stomach. *J Biol Chem* 279, 30433-30439.

Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Menin, L., Guenneugues, M., Schott, V., Vovelle, F., and Dimarcq, J.L. (2004b). Lead optimization of antifungal peptides with 3D NMR structures analysis. *Protein Sci* 13, 703-713.

5. Title, key words and abstract in english :

Title: Mechanisms of action of defensins

Keywords: AntiMicrobial Peptides (AMP), Disulfide Rich Peptides (DRP), Nuclear Magnetic Resonance, fluorescence microscopy, structure, membranes.

Summary:

Antibiotic resistance is a major public health problem, forecasts for more than 10 million deaths per year in 2050, higher than deaths associated with cancer. Antimicrobial peptides (AMPs), produced naturally by all living organisms, and optimized during the evolution, are one of the most promising alternatives to antibiotics, less conducive to the rapid acquisition of resistance. Among AMPs, we focus on two families of defensins, small cationic disulfide rich proteins. **The objective of this thesis is to dissect their mechanisms of action at the atomic level, which is an essential step in the design of a new generation of antibiotics.**

We will follow the localization of the **anti-bacterial defensin AvBD103b of the King penguin** and its membrane permeabilization effects, on living bacteria in real time by fluorescence microscopy (P@cyfic platform, CBM). We will also study the impact of its

translocation on the membranes of whole bacteria, by solid-state NMR (Coll. D. Warschawski, Paris).

We have identified a specific lipid of the fungal membrane, as the target of the **antifungal defensin ETD151 from butterflies**, in the 1st step of its mechanism. We will study this interaction ETD151/lipid at the atomic level, by solution NMR on model membrane systems. To complete our vision of the mechanism on real membranes, and study the impact of ETD151 on membranes, we will transpose the previous solid-state NMR methods on whole fungi (Coll. D. Warschawski, Paris & IR-RMN Orléans).