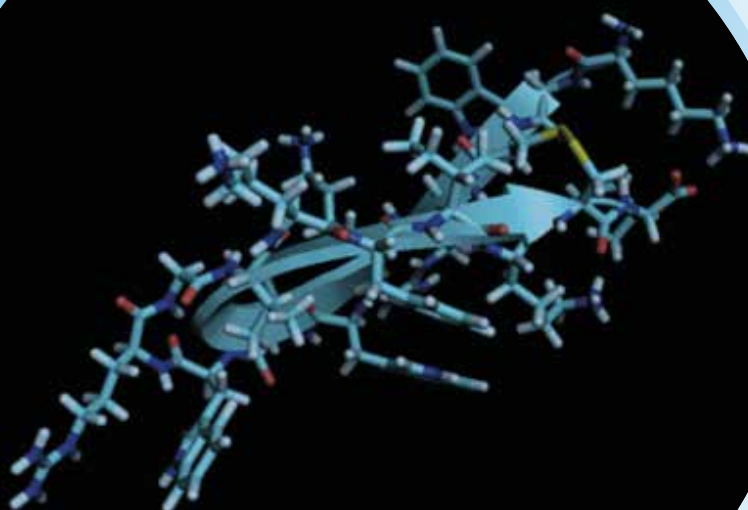


AMP2041

L'évolution de la connaissance

BORDEAUX 2016



Réservé aux Vétérinaires et Pharmaciens

AMP2041

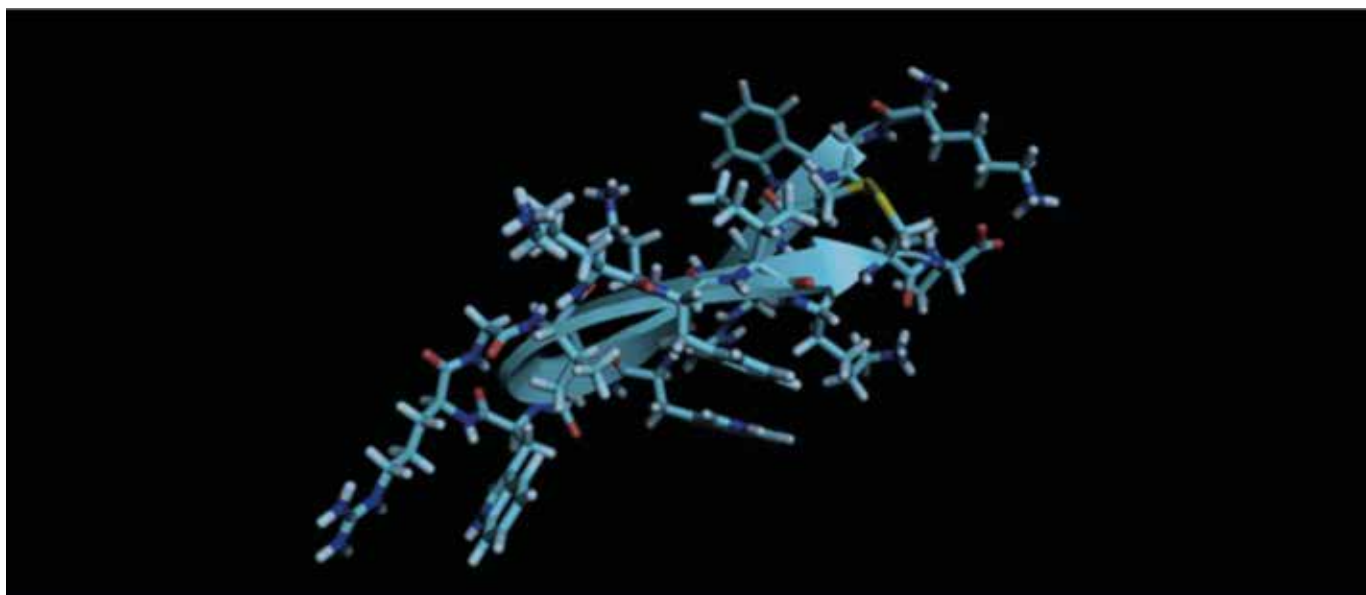
L'évolution de la connaissance
BORDEAUX 2016

Index

- 1.** *Antibiorésistance*
- 2.** *ICF: nos initiatives*
- 3.** *AMP2041 : c'est le moment d'en parler*
 - 3.1- Caractéristiques*
 - 3.2- Mécanisme d'action*
- 4.** *Profil d'innocuité*
- 5.** *Conclusions*

AMP2041

L'évolution de la connaissance



1. Résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance est un aspect indésirable de la survie des bactéries, qui défie continuellement la santé humaine et animale.

Les « progrès » médicaux et le développement révolutionnaire de nouvelles molécules antibiotiques ont significativement réduit la mortalité et la morbidité associées aux infections bactériennes. L'apparition et la diffusion de bactéries antibiorésistantes ont fortement miné ce progrès, en rendant des infections simples à soigner, de plus en plus difficiles, voire impossibles à traiter (1).

L'antibiorésistance est un problème à échelle européenne et mondiale, qui concerne plusieurs secteurs, comme la médecine humaine et vétérinaire, l'élevage, l'agriculture, l'environnement

et le commerce (2).

La nature globale du problème a incité les institutions internationales, telles que l'organisation mondiale de la santé (OMS) et le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) à émettre une alarme sérieuse et à inscrire l'antibiorésistance parmi les priorités que les pays membres devront affronter, avec la résolution suivante : « Une stratégie européenne contre la menace microbienne » (1999 / C195 / 01) qui stipule qu'une réduction effective de l'antibiorésistance ne peut pas être réalisée par des mesures appliquées à l'échelle nationale, mais requiert une stratégie et une action communes, prises aux niveaux communautaire et international.

Les aliments et le contact direct avec les animaux peuvent représenter un vecteur de transmission de l'antibiorésistance de l'animal à l'homme. Ce qui met en évidence l'importance du lien entre la médecine vétérinaire et humaine comme décrite par l'approche « One Health ». *

Même à l'intérieur du secteur vétérinaire il existe des aspects qui sont préoccupants (3). Un rapport publié par l'ESFA déjà en 2007, ainsi qu'un autre en 2010, affirment que certaines parmi les plus communes des bactéries zoonotiques présentes chez les animaux et dans l'alimentation au sein de l'UE, avaient développé une résistance aux antibiotiques. En particulier, des résistances à l'ampicilline, aux sulfamides et à la tétracycline ont été décelées à maintes reprises chez les bactéries testées. Plusieurs pays ont reporté des résistances aux fluoroquinolones, macrolides et céphalosporines de troisième génération (antibiotiques importants dans le traitement de maladies infectieuses chez les humains (6)).

Au cours des 10 dernières années, la prise de conscience concernant la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les animaux de compagnie, ainsi que les effets possibles sur la santé humaine, a été en constante augmentation.

Ceci est en partie dû à une augmentation des prescriptions d'antibiotiques pour les animaux familiers, pas toujours nécessaires.

Tout cela a encore augmenté le risque de développer une antibiorésistance et la possible diffusion entre les espèces de clones résistants.

Au vu de ces problèmes urgents, le besoin de développer de nouveaux agents antimicrobiens augmente, et de considérables efforts ont été faits (bien que pas toujours récompensés par des résultats satisfaisants) afin de trouver de nouveaux composés fonctionnels, pouvant être utilisés comme une

alternative aux antibiotiques lorsque ceux-ci ne sont pas strictement nécessaires.

L'option la plus prometteuse, à ce jour, est le développement de peptides antimicrobiens synthétiques (AMP).

En effet, des études ciblées sur le développement de peptides naturels ont démontré leur faible sélectivité pour tuer rapidement des agents pathogènes.

2. ICF: Nos initiatives

Depuis 10 ans, nous avons concentré nos efforts sur la recherche de molécules sûres et efficaces pouvant être une alternative aux antibiotiques conventionnels.

De cette recherche sont nés de nouveaux peptides antimicrobiens de synthèse, plus sélectifs, plus efficaces et plus sûrs.

Ce travail a conduit au premier dépôt d'un brevet national le 28 août 2012, obtenu le 26 octobre 2015 portant le numéro n. IT 1418804, ainsi qu'un ultérieur dépôt international n. WO 2014102596 le 30 décembre 2013. Nos brevets contiennent plusieurs séquences de peptides antimicrobiens cycliques.

Nos résultats ont été obtenus avec la collaboration des départements de médecine clinique et expérimentale, de médecine vétérinaire de l'université de Parme et de l'hôpital universitaire de Parme.

Les peptides ont été créés et sélectionnés en utilisant un logiciel de criblage conçu sur mesure (générateur de peptide antimicrobien) appelé STAMP (salt tolerant antimicrobial peptide) développé par ARTA PEPTIDION S.r.l.s., Parme.

Ce logiciel inclus 4 sous-unités :

1. **Générateur de peptide aléatoire** : une unité qui convertit des acides aminés individuels en nombres entiers allant de 1 à 20, en appliquant les méthodes de Mersenne Twister, et un générateur de nombres pseudo-aléatoires développé par Makoto & Takuji.
2. **Filtre de premier passage** : contrôles de chaque peptide généré aléatoirement en éliminant les peptides ayant des séquences improbables.

*Publication of American
Veterinary Medical Association



3. **Unité de criblage** : unité centrale du logiciel, qui exploite la réponse de 5 réseaux neuronaux pour sélectionner de potentiels peptides antimicrobiens. Les réseaux neuronaux comprennent 3 couches entièrement connectées (entrée, centre et sortie) ; la couche d'entrée est constituée de plusieurs jonctions, une pour chaque paramètre (paramètres chimique, physique ou structurel), utilisé pour décrire les caractéristiques des peptides antimicrobiens expérimentalement validés. La couche centrale comprend un nombre de neurones artificiels allant de la moitié au double du nombre de paramètres utilisés.
4. **Filtre de second passage** : filtre les peptides présentant un potentiel antimicrobien, comme par exemple ceux ayant une solubilité dans l'eau égale ou supérieure à 90%. Le logiciel sélectionne 1 peptide antimicrobien pour 10 000 peptides générés.

En modifiant correctement les filtres et paramètres utilisés, ce logiciel extrêmement versatile nous a permis de « créer » des peptides avec des caractéristiques chimiques, physiques, et structurelles précises. Ces peptides sont ciblés non seulement contre les souches bactériennes générales (Gram + ou Gram-) mais aussi contre des souches bactériennes diverses et bien définies (par exemple : *S.aureus*, MRSA, *P.aeuruginosa*). Parmi les séquences brevetées, AMP2041 se caractérise par sa spécificité et sa singularité.

3. AMP2041 : il est temps d'en parler. Le futur c'est maintenant !

3.1 Caractéristiques

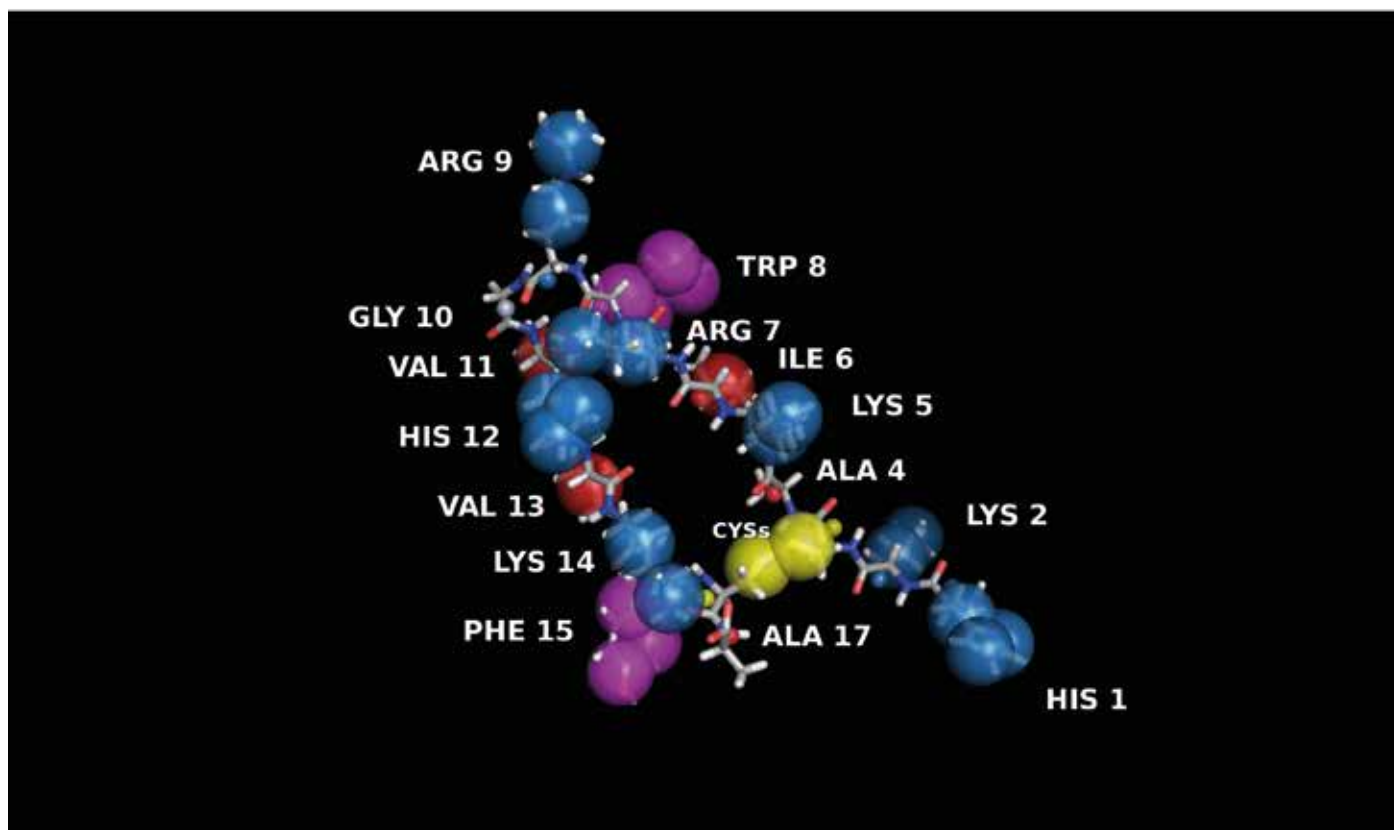


Fig. Représentation schématique du peptide AMP2041 dans son modèle « tout atome » (en bâtonnet) et dans son modèle « gros grain ». La superposition des deux modèles permet de voir la réduction de la complexité du peptide. D'une manière générale, la réduction est de 4 :1.

AMP2041 a les propriétés suivantes :

- **Spectre antibactérien contre les Gram-négatifs** (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*) **et Gram-positifs** (*S.aureus* sensibles à la méthicilline et résistants à la méthicilline MRSA) (7-8).
- **Efficace contre** *Candida albicans* **et** *Malassezia pachydermatis*.
- **Haut degré de solubilité dans les environnements aqueux (>95%) garantissant une utilisation facile dans les différentes formulations** (7).
- **Haute stabilité due aux liaisons disulfure** (7).
- **Insensibilité au sel, permettant un usage efficace du peptide dans différentes conditions environnementales** (activité supérieur à 90% en présence de 250 mM de NaCl contre *P.aeruginosa* et *E.coli*) (7).
- **Spécificité envers les cellules procaryotes** (7).
- **Action synergique avec les antibiotiques conventionnels** (7).
- **Action synergique avec la Chlorhexidine.**

La particularité du peptide breveté AMP2041 produit par ICF est sa sélectivité d'action, basée sur la reconnaissance entre les différences de charge et de composition des membranes cytoplasmiques des cellules eucaryotes supérieures et celles des cellules procaryotes et des champignons. Les membranes cellulaires bactériennes sont principalement composées de phospholipides chargés négativement, comme la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol, et le bis(phosphatidyl)glycérol. Les membranes cellulaires eucaryotes, à l'inverse, comportent un grand nombre de composés neutres à pH physiologique, comme le cholestérol, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, et ne sont donc pas « attaquées » par les peptides ! L'activité d'AMP2041, révélée par divers tests, se manifeste par la perturbation et la destruction des membranes bactériennes :

Activité d'AMP2041 sur la membrane interne et externe d'*E.coli* ML-35pYC

La souche *E.coli* ML-35pYC a été utilisée pour tester la cinétique de perméabilisation de la membrane. Cette souche bactérienne contient une bêta-galactosidase cytoplasmique, et a été créée avec un plasmide permettant la synthèse de bêta-lactamase périplasmique. La cinétique de la réaction a été évaluée en enregistrant les valeurs d'absorbance à 600 nm et 405 nm pour ONPG (pour la membrane interne) et CENTA (pour la membrane externe) respectivement, toutes les 10 minutes pendant une durée maximale de 120 minutes.

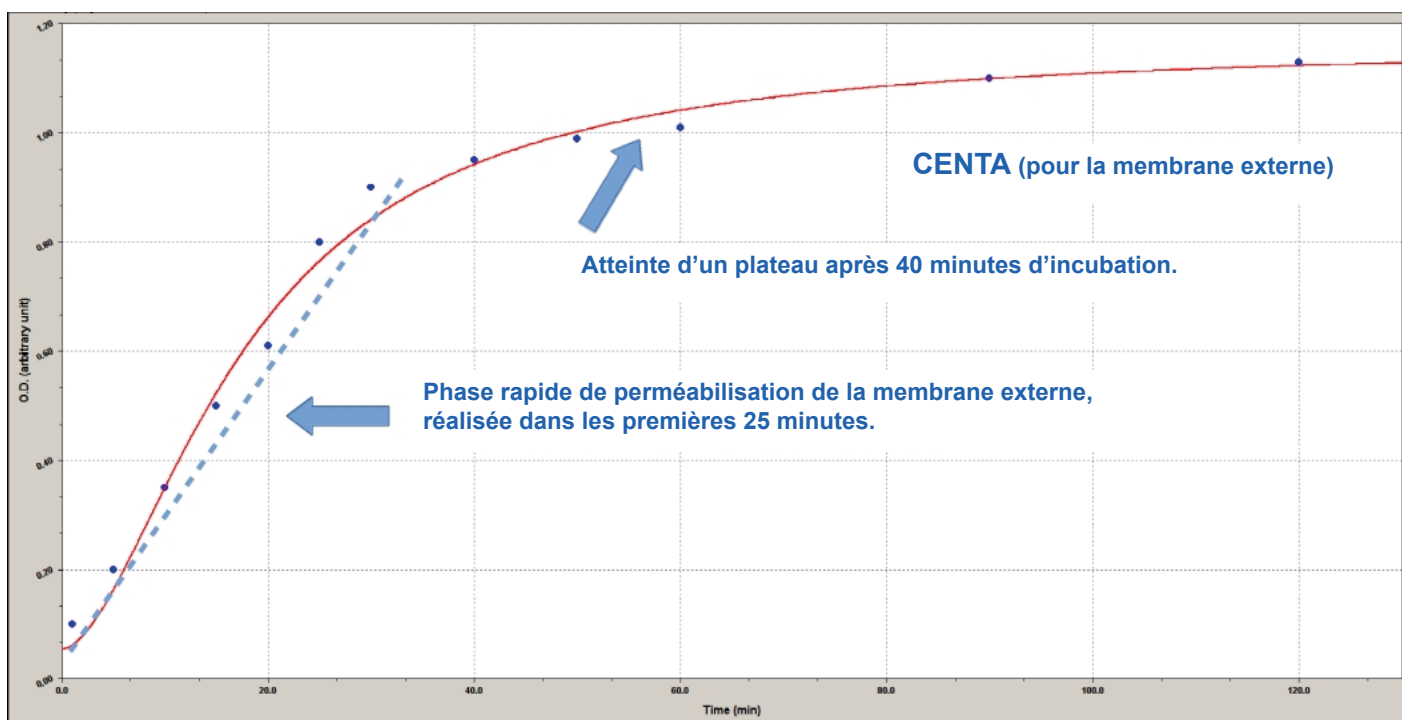


Fig. Lors d'une lésion de la membrane externe, la bêta-lactamase périplasmique est libérée dans la solution tampon et rompt l'anneau lactame du CENTA (antibiotique chomogénique de la famille des bêta-lactamine contenu dans la solution tampon), provoquant l'apparition d'une couleur qui peut être détectée par spectrophotométrie. L'augmentation de la densité optique (précisément la couleur) est proportionnelle au nombre de bactéries ayant une membrane externe endommagée.

Le graphique met en évidence deux phases distinctes: durant les 20-25 premières minutes il y a une phase de perméabilisation membranaire rapide, ce qui suggère une forte activité membranolytique d'AMP2041, suivie d'une phase plateau, due à la réduction du nombre de bactéries ayant des membranes intactes, et par conséquent, une moindre production de couleur (9).

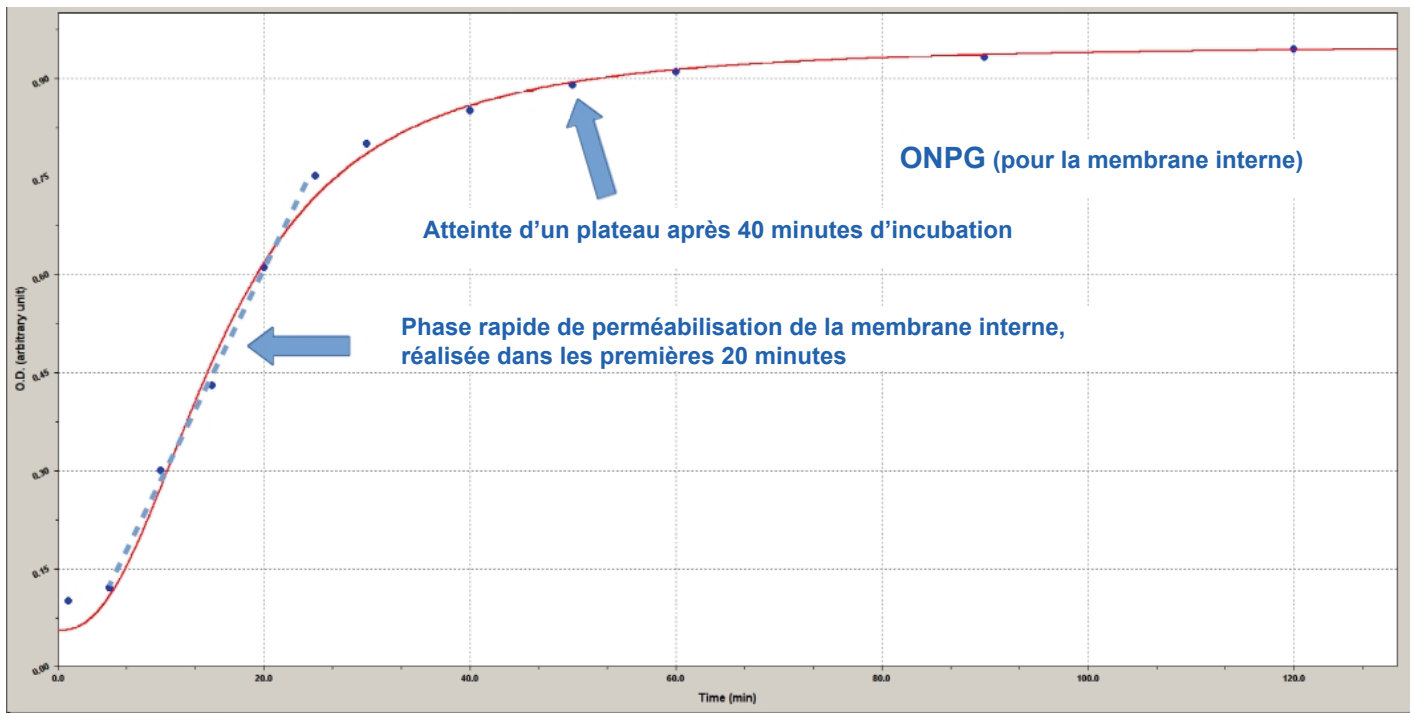


Fig. Lors d'une lésion de la membrane interne, la bêta-galactosidase cytoplasmique est libérée dans le tampon et dégrade le substrat ONPG (substrat chromogénique contenu dans la solution tampon fait d'une molécule de nitrophénol et d'une molécule de galactose) en ses deux constituants, provoquant l'apparition d'une couleur qui peut être détectée par spectrophotométrie. L'augmentation de la densité optique (précisément de la couleur) est proportionnelle au nombre de bactéries ayant une membrane interne endommagée. Le graphique met en évidence deux phases distinctes: durant les 20-25 premières minutes il y a une phase rapide de perméabilisation membranaire (ce qui suggère une forte activité membranolytique d'AMP2041), suivie d'une phase plateau, due à la réduction du nombre de bactéries ayant des membranes intactes, et par conséquent, une moindre production de couleur.

Un autre test de cinétique de perméabilisation de la membrane, utilisant le dosage IP-absorption, et réalisé avec la technique de cytofluorométrie a confirmé l'activité lytique du peptide AMP2041 contre la membrane bactérienne.

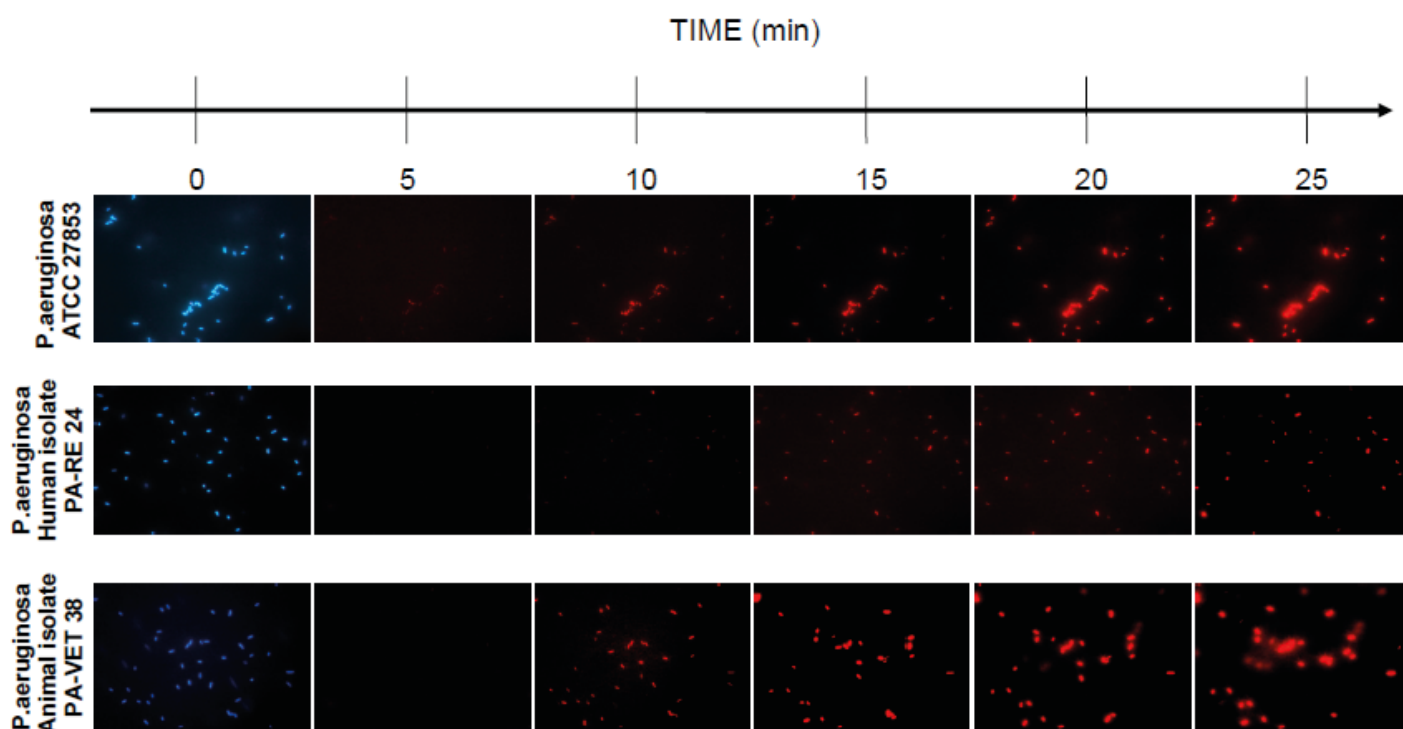


Fig. Visualisation de la capacité membranolytique du peptide AMP2041, obtenue en utilisant un colorant vital, l'iodure de propidium, généralement absent des cellules ayant des membranes intactes. Après lésion de la membrane, l'iodure de propidium pénètre dans les cellules et se lie à l'ADN. La liaison entre le colorant et l'ADN provoque l'apparition d'une fluorescence rouge vif. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de colorant qui peut se lier à l'ADN.

L'image souligne ici les lésions initiales faites aux membranes après 10 min d'incubation avec le peptide AMP2041. Au fil du temps ces lésions deviennent de plus en plus évidentes, jusqu'à saturation de la fluorescence, au bout de 25 min d'incubation. L'activité membranolytique du peptide est spécifique à la souche.

3.2 Mécanismes d'action

L'étude du mécanisme d'action du peptide AMP2041 est cruciale pour comprendre la nature de ses interactions avec les membranes bactériennes.

Des interactions électrostatiques et hydrophobes déterminent initialement l'association entre le peptide et la surface de la membrane bactérienne. Les molécules du peptide forment par la suite des trous à la surface de la cellule, réduisant le gradient protonique et provoquant la fuite des molécules du cytoplasme, ce qui inhibe la production d'ATP et ralentit d'autres processus métaboliques, conduisant à la mort de la cellule microbienne. La séquence d'acides aminés du peptide joue un rôle important, car la présence ou non d'un unique acide aminé peut déterminer l'efficacité d'AMP2041 contre les agents pathogènes.

Les tests *in vitro* ont confirmé l'activité antimicrobienne d'AMP2041. Le peptide AMP2041 possède également un excellent profil de sureté, évalué par des tests *in vitro* réalisés sur des cellules épithéliales animales.

Nous avons évalué la liaison entre le peptide AMP2041 et la membrane bactérienne d'un point de vue informatique, au moyen de dynamiques moléculaires. Afin de permettre de plus longs temps de simulation, ce processus a été réalisé en utilisant le modèle «à gros grains» qui permet de réduire de manière significative la complexité du système.

Ci-dessous, les deux images du peptide AMP2041 en modèle « tout atome » et « à gros grain » (10).

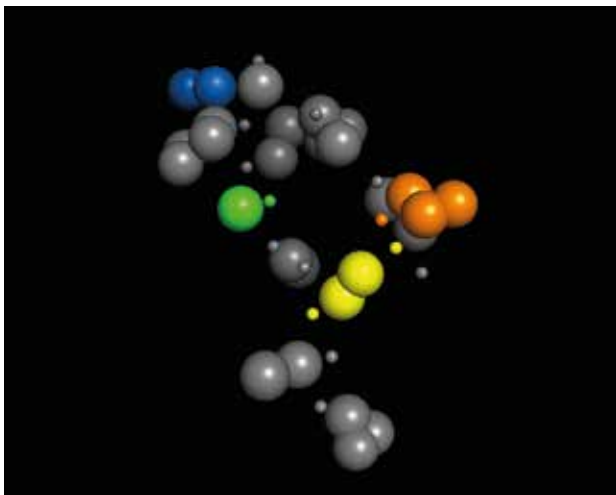


Fig. L'étude a été menée avec le logiciel de simulation GROMACS v 5.02 en utilisant le champ de force Martini pour la conversion en "gros grains". Le système, qui simule la membrane interne des bactéries Gram-négatives comprend 11272 molécules d'eau, 301 molécules de sodium, 1024 molécules de phospholipides. Les phospholipides sont des POPE (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) et des POPG (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3- (phospho-rac- (1-glycérol))).

Le peptide AMP2041 se positionne parallèlement à la membrane, avant de se retourner pendant les premières 500 ns de la simulation de dynamique moléculaire.

L'AMP2041 entre en contact avec la membrane bactérienne au bout de 30 ns.

Après 30 ns

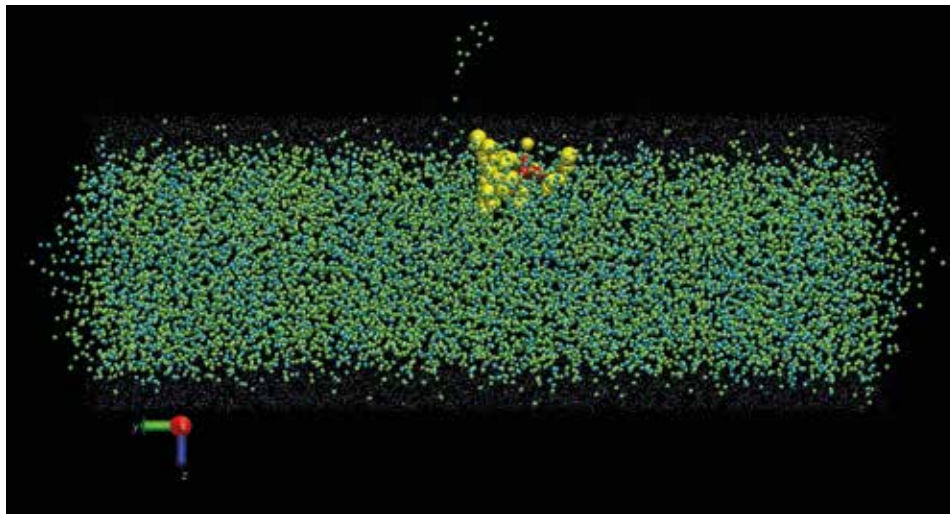


Fig. l'étude a été menée avec le logiciel de simulation GROMACS v 5.02 en utilisant le champ de force Martini pour la conversion en "gros grains".

Le système, qui simule la membrane interne des bactéries Gram-négatifs comprend 5636 molécules d'eau, 301 molécules de sodium, 1024 molécules de phospholipides. Les phospholipides sont des POPE (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) et des POPG (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3- (phospho-rac- (1-glycérol))).

Image du modèle de membrane (sphères bleues-vertes), de l'eau pour solvation (points blancs) et du peptide (sphères jaunes, la liaison disulfure est surlignée en rouge) après simulation de 30 ns. Le peptide est lié à la membrane et orienté parallèlement.

Après 100 ns

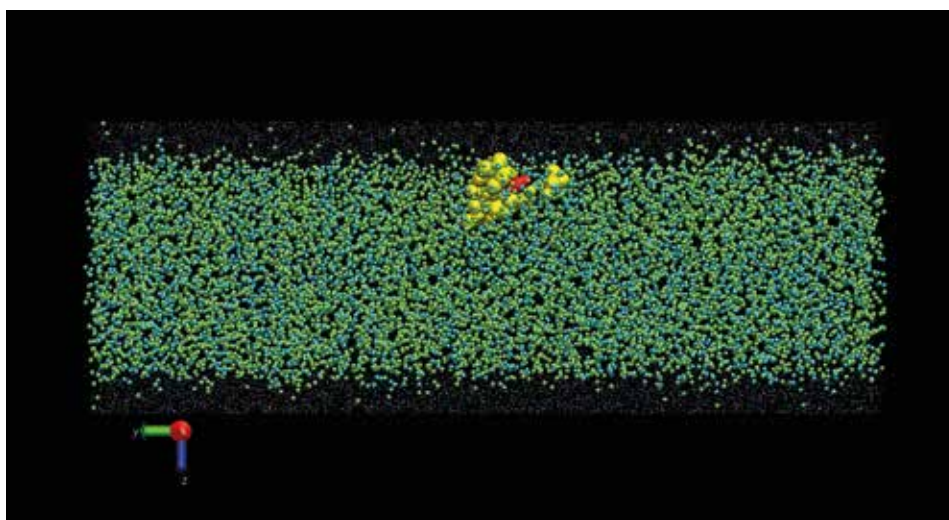


Fig. Image du modèle de membrane (sphères bleues-vertes), de l'eau pour solvation (points blancs) et du peptide (sphères jaunes, la liaison disulfure est surlignée en rouge) après simulation de 100 ns.

Le peptide est lié à la membrane, et un angle de retournement d'environ 25° est observé.

Après 250 ns

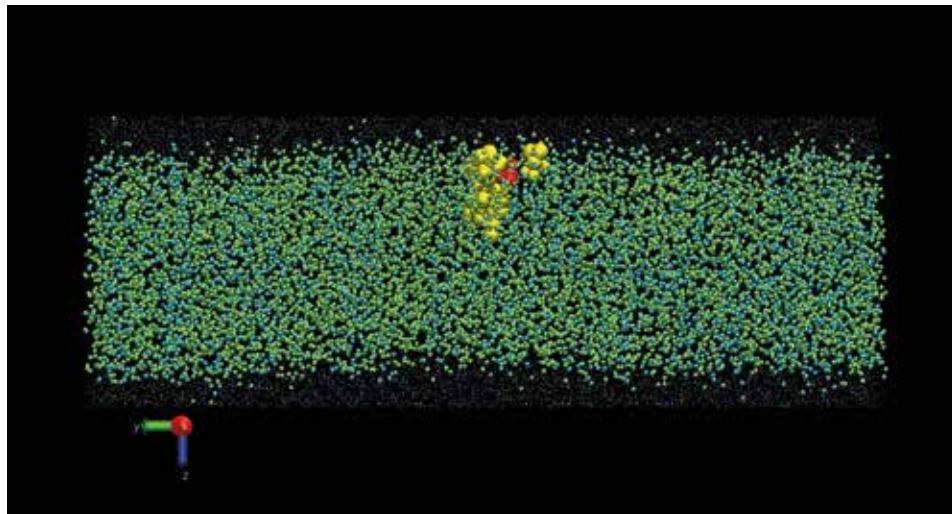


Fig. Image du modèle de membrane (sphères bleues-vertes), de l'eau pour solvation (points blancs) et du peptide (sphères jaunes, la liaison disulfure est surlignée en rouge) après simulation de 250 ns.
Le peptide est lié à la membrane et orienté perpendiculairement avec un angle d'environ 85°.

Après 500 ns

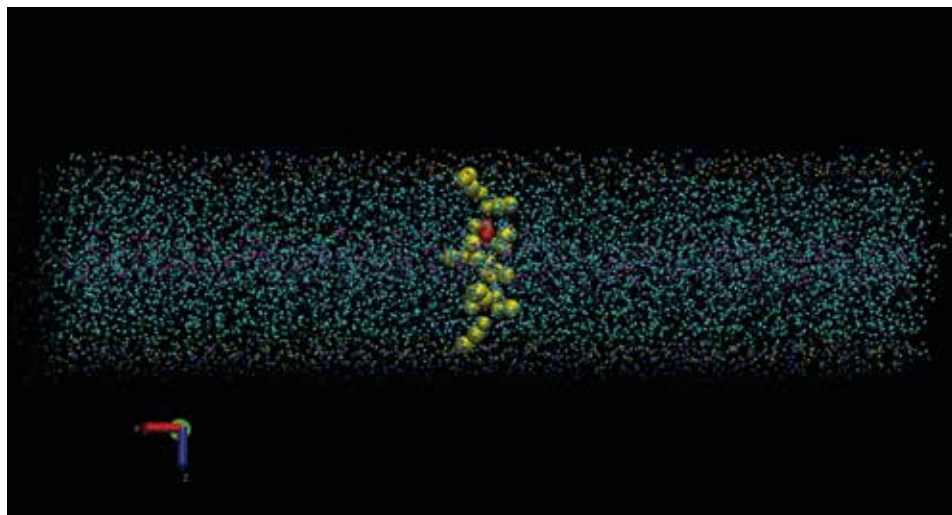
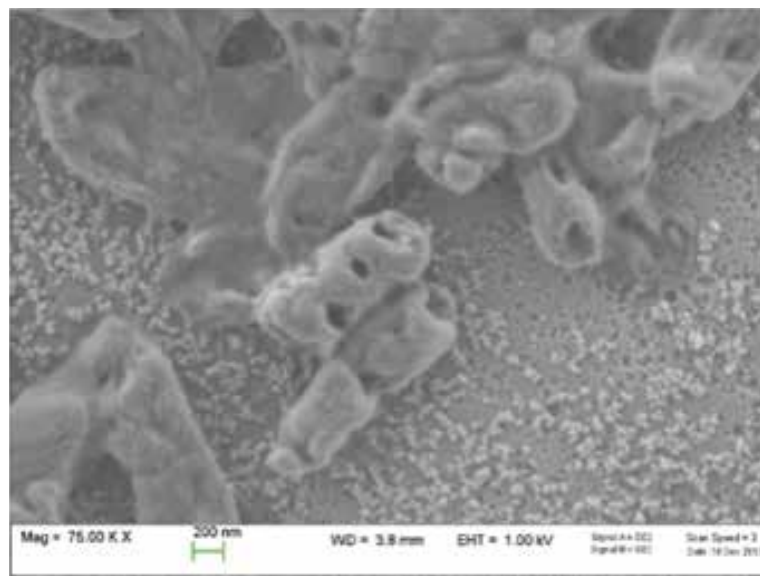


Fig. Image du modèle de membrane (sphères bleues-vertes), de l'eau pour solvation (points blancs) et du peptide (sphères jaunes, la liaison disulfure est surlignée en rouge) après simulation de 500 ns.
Le peptide est orienté perpendiculairement à l'axe de la membrane.



Avec l'aimable autorisation du
département des sciences
médicales et vétérinaires,
Université de Parme

Fig. Image de bactéries en bâtonnet ayant des trous évidents dans la membrane cellulaire bactérienne causés par l'AMP2041.

4. Profil d'innocuité

En supposant que l'activité bactéricide ou cytolytique représente le résultat final de la liaison d'AMP2041 à la membrane, on peut conclure que l'AMP2041 est un peptide sans danger.

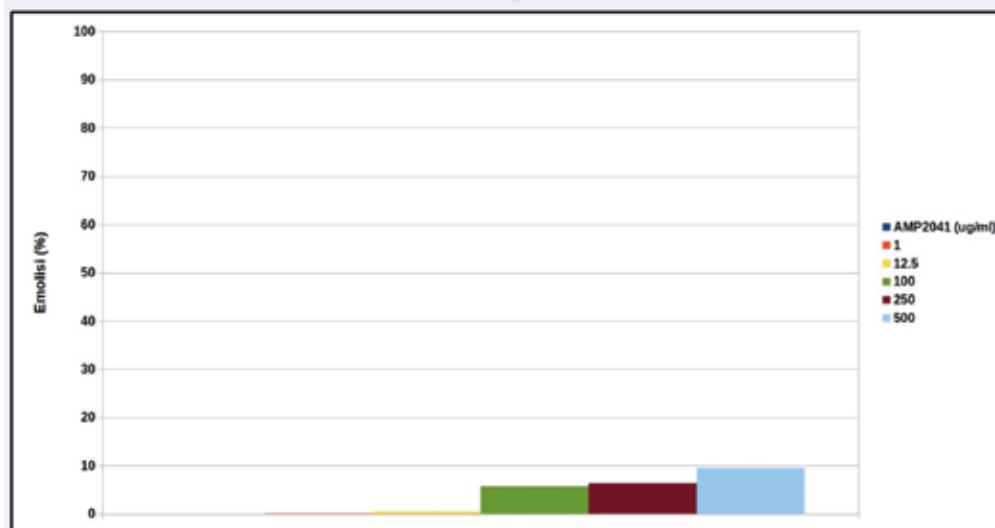


Fig. Méthodes d'hémolyse : immédiatement après l'échantillonnage, les érythrocytes héparinés ont été centrifugés pendant 15 minutes. Ils ont ensuite été lavés trois fois avec du PBS, et remis en suspension à la concentration de 2% dans du PBS avec 308 mM de saccharose. Cinquante microlitres d'érythrocytes ont été incubés avec 50 µL d'AMP2041 à différentes concentrations (500, 250, 100, 12.5 et 1 µg / ml) pendant 60 min à 37 ° C. A la fin la libération d'hémoglobine a été quantifiée par spectrophotométrie à 450 nm. Pour le contrôle positif il a été utilisé 1% de Tween-20, tandis que pour le contrôle négatif il a été utilisé 10 mM de phosphate tampon + 308 mM de saccharose (pour maintenir l'osmolarité).

Le peptide AMP2041 est sans danger, même à 500 µg/ml, l'hémolyse est maintenue à moins de 10%.

Le test d'hémolyse indique en particulier que la première concentration déterminant l'hémolyse est de 100 µg/ml, ce qui correspond à une dose de 10 mg/kg.

La sûreté du peptide AMP2041 a en outre été évaluée sur les trois principaux composants des tissus : les cellules endothéliales (qui constituent les vaisseaux sanguins), les fibroblastes (qui forment l'échafaudage des tissus) et les cellules épithéliales (qui constituent l'épithélium des tissus). Le graphique montre clairement la capacité sélective d'AMP2041 à ne se lier efficacement qu'aux membranes bactériennes, avec une réduction du nombre de cellules d'environ 2 à 6% par rapport au témoin.

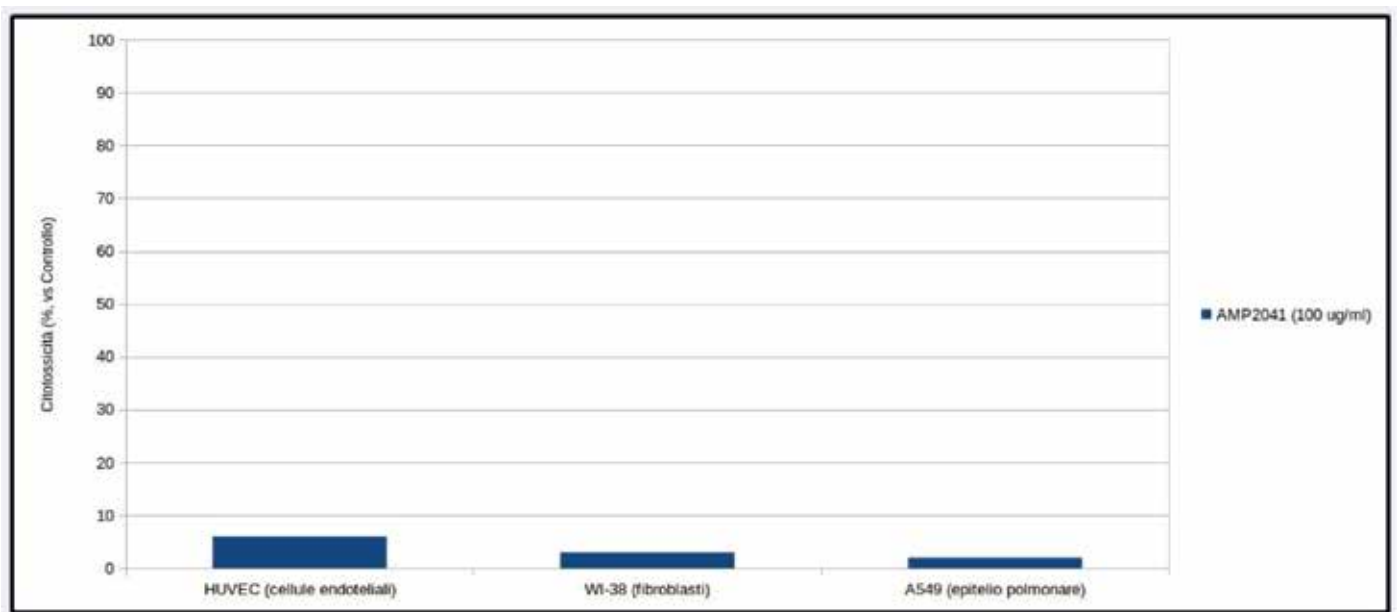


Fig. L'évaluation de la cytotoxicité a été effectuée selon la méthode Gillies RJ et al (12). Les cellules ont été mises en incubation avec 100 µg/ml d'AMP2041 pendant deux heures à 37 °C. Les cellules ont ensuite été fixées avec 1% de formaldéhyde et colorées avec du cristal violet à 0,1% dans du PBS. Le colorant non lié est ensuite éliminé par des lavages. A la fin, le colorant lié aux cellules est solubilisé par une solution à 0,2% de Triton-X dans du PBS. L'intensité de la couleur, proportionnelle au nombre de cellules, a été analysée dans un spectrophotomètre à 570 nm.

5. Conclusions

L'AMP2041 est un agent antimicrobien innovant et efficace, dont les actions entraînent la perturbation et la destruction des membranes de bactéries Gram négatives (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonelle*) et Gram positives (SARM/MRSA résistants à la méthicilline et *S.aureus* sensibles à la méthicilline). Il est également efficace contre *Candida albicans* et *Malassezia pachydermatis*.

Après d'innombrables tests effectués, nous pouvons conclure que l'AMP2041 :

- a une action spécifique contre les cellules procaryotes .
- a une action synergique avec les antibiotiques conventionnels .
- a une action synergique avec le système immunitaire acquis de l'animal .
- ne provoque pas de résistance bactérienne ;
- est sans danger.

Grâce à la fiabilité des recherches effectuées ICF a déposé un premier brevet national le 28 août 2012, et a reçu l'autorisation connexe n. IT 1418804 le 26 octobre 2015 ; ainsi que le dépôt international n. WO 2014102596 le 30 décembre 2013.

Ces brevets ne contiennent pas seulement l'AMP2041 mais également d'autres séquences de peptides antimicrobiens cycliques.

Une nouvelle fois, ICF contribue de manière significative et déterminante à l'évolution de la connaissance en médecine vétérinaire, pas seulement en théorie, mais aussi de manière concrète et pratique, basée sur des faits scientifiques démontrés.

Tout cela dans le but d'offrir aux vétérinaires une gamme complète de solutions alternatives pour une vision moderne de la profession, focalisée sur le bien être des chats et des chiens.

“those who think it is impossible, should not interrupt those who are doing it! » (A. Einstein)



Pour toute information concernant la France et la Belgique, veuillez contacter :

MP Labo

45 bd Marcel Pagnol - 06 130 Grasse
Tel : 04 93 09 85 79
Email : contact@mplabo.eu
www.mplabo.eu

Bibliographie

1(Wang SY, George D, Purych D, Patrick DM, Antibiotic resistance: A global threat to public health. BCMJ,2014, 6:295-296 — BC Centre for Disease Control).

2(Roca I, Akova M, Baquero F, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New Microbes and New Infections. 2015;6:22-29).

3 (Carattoli A et al. 2005; Busani C. et al 2004).

4 EFSA Trends for Sources of zoonoses and Zoonotic Agents, 2007

5 EFSA Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, 2010

6 EFSA Trends for Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents anFood-borne Outbreaks in the European Union in 2008, 26 Aprile 2010;

7 Romani AA, et al. In vitro activity of novel in silico-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens. J Pept Sci. 2013 Sep; 19(9):554-65;

8 Cabassi CS, Taddei S, Cavarani S, Barinu MCm Sansoni P, Romani AA, Broad-spectrum activity of a novel antibiotic peptide against multidrug-resistant veterinary isolates, Vet J. 2013 Nov; 198(2):534-7;

9 Tossi A, Sandri L, Giangaspero A, 2000, Biopolymers 55, 4-30;

10 (D.H. de Jong, G. Singh, W.F.D. Bennett, C. Arnarez, T.A. Wassenaar, L.V. Schäfer, X. Periole, D.P. Tieleman, S.J. Marrink. Improved parameters for the Martini coarse-grained force field, JCTC, 2013 9:687-697;

11 Berendsen D, van der Spoel R, van Drunen GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, 1995, Comp. Phys. Comm. 91:43-56;

12 Gilles RJ, Didier N, Denton M, Determination of cell number in monolayer cultures. Anal. Biochem, 1986; 159:109-113;