

**UNIVERSITE DE STRASBOURG**

**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

Année 2016

N° 24

**THESE**

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

le 21 juillet 2016

par

**TAKEDA Alain**

Né le 12/01/1989 à *Strasbourg*

**Les activités antimicrobiennes des peptides M28D et S11D dérivés de l'Amélogénine : relation structure-fonction et signification en odontologie**

Président : Professeur MEYER Florent

Assesseurs : Docteur METZ-BOUTIGUE Marie-Hélène

Docteur HUCK Olivier

Docteur FIORETTI Florence

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>2</b>
<b>INDEX DES FIGURES.....</b>	<b>5</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX.....</b>	<b>6</b>
<b>INDEX DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>INDEX DES ABBREVIATIONS DES ACIDES AMINES .....</b>	<b>11</b>
<b>AVANT-PROPOS : .....</b>	<b>12</b>
<b>1. LES AMELOGENINES.....</b>	<b>13</b>
1.1. L'AMELOGENESE .....	13
1.2. LES PROTEINES DE L'AMELOGENESE .....	16
1.3. LES PROTEINES AMELOGENINES .....	17
1.4 LES DERIVES DE LA MATRICE AMELAIRE, EMD, EMDOGAIN .....	21
1.5 LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES AMELOGENINES .....	22
1.5.1 LES INTERACTIONS DES AMELOGENINES AVEC LES CELLULES DE L'HOTE .....	22
1.5.2. LE ROLE BIOLOGIQUE DES AMELOGENINES DANS LA BIOMINERALISATION DE L'EMAIL .....	24
1.5.3 LE ROLE BIOLOGIQUE DANS LA CICATRISATION DES LESIONS.....	25
1.6 L'APPLICATION CLINIQUE DES AMELOGENINES .....	27
<b>2. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS (PAMS) .....</b>	<b>28</b>
2.1. LA CLASSIFICATION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS.....	28
2.2. LA STRUCTURE DES PAMS.....	31
2.2.1. LES CARACTERISTIQUES ET SPECIFICITES DES PAMS .....	31
2.4. ACTIVITE BIOLOGIQUE ANTIMICROBIENNE.....	34
2.5. LES RESISTANCES DES MICROORGANISMES AUX PAMS .....	35

2.5.1 LA RESISTANCE NATURELLE AUX PAMs .....	35
2.5.2. LA RESISTANCE ACQUISE AUX PAMs.....	35
<b>2.6. AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PAMs / HDPS .....</b>	<b>36</b>
<b><u>MATERIELS ET METHODES .....</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b>1 PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>38</b>
1.1. PEPTIDES SYNTHETIQUES D'AMELOGENINE .....	38
<b>2. METHODES DE PURIFICATION .....</b>	<b>39</b>
2.1. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE DE PHASE INVERSE (RP-HPLC).....	39
<b>3. METHODES DE CARACTERISATION STRUCTURALE DES PEPTIDES .....</b>	<b>42</b>
3.1. LE SEQUENÇAGE AUTOMATIQUE .....	42
3.2. LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....	44
<b>4. METHODES DE CARACTERISATION BIOLOGIQUES DES PEPTIDES ACTIFS .....</b>	<b>45</b>
4.1. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES .....	45
<b>5. METHODES INFORMATIQUES .....</b>	<b>48</b>
<b><u>LES RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b>1 INTRODUCTION : LES RESULTATS PRELIMINAIRES A L'ETUDE .....</b>	<b>49</b>
<b>2 NOUVEAUX TESTS ANTIMICROBIENS .....</b>	<b>50</b>
2.1. EXPERIENCE AVEC M28D LOT 1 .....	50
2.2. EXPERIENCE AVEC M28D LOT 2 .....	52
2.3. EXPERIENCE AVEC S11D LOT 1 .....	53
<b>3 CONTROLE ANALYTIQUE DES PEPTIDES M28D ET S11D .....</b>	<b>53</b>
3.1. CAS DE S11D LOT 1 .....	54
3.2. CAS DE M28D LOT 1.....	55
<b>4. ETUDE RELATION STRUCTURE FONCTION .....</b>	<b>57</b>

4.1 CAS DE S11D (STDKTKREEVD).....	58
4.2 CAS DE M28D (MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKREEVD) .....	59
<b>5. ETUDE SUR L'ADMINISTRATION DES ANTIBIOTIQUES ASSOCIE AU M28D.....</b>	<b>62</b>
<b>6. TESTS DE STABILITE DU PEPTIDE M28D.....</b>	<b>63</b>
6.1 STABILITE DE M28D EN CONDITIONS DE VARIATIONS DE PH ET DE TEMPERATURE .....	63
6.2 STABILITE DE M28D EN PRESENCE D'ALBUMINE .....	64
7.3. STABILITE DE M28D EN PRESENCE DES SURNAGEANTS BACTERIENS.....	64
<b><u>DISCUSSION .....</u></b>	<b><u>66</u></b>
M28D LE FRAGMENT C-TERMINAL DE L'AMELOGENINE ET AAMPs .....	67
LA REMINERALISATION DES LESIONS CARIEUSES INITIALES .....	69
LA THERAPEUTIQUE PULPAIRE ET LA REGENERATION DENTINAIRE.....	70
AMELOGENINE : REGENERATION OSSEUSE ET PARODONTALE .....	71
LA REGENERATION OSSEUSE ET LIGAMENTAIRE .....	72
IMPLANTOLOGIE DENTAIRE .....	73
TRAITEMENT DES TRAUMATISMES DENTAIRE.....	74
<b><u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>	<b><u>76</u></b>

## INDEX DES FIGURES

<i>Figure 1 : La structure de l'émail ; illustration en microscopie électronique (Dr. ALLIOT-LICHT 2013).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 2 : La structure du cristal d'émail et sa maille élémentaire (adapté du Dr. ALLIOT-LICHT 2013).....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 3 : Les phases de différenciation des améloblastes (adapté du Dr. ALLIOT-LICHT 2013).....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 4 : Les rôles des protéines de l'amélogénèse (adapté du Dr. ALLIOT-LICHT 2013).....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 5 : Les peptides C-terminaux de l'Amélogénine X humaine (source personnelle).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 6 : Séquences peptidiques de l'Amélogénine humaine et porcine (source personnelle).....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 7 : Formation de vésicules par manteau de clathrine (LAMP).....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 8 : Modèles d'Insertion des PAMs dans les bicouches lipidiques (source sanderson 2005).....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 9 : Changement de conformation d'un peptide, et d'un copolymère à séquence aléatoire en présence d'une membrane (source mowery 2009).....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 10 : Mécanismes d'action proposés pour les PAMs (source Peters 2010).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 11 : Mécanismes de résistance acquise aux PAMS (source Peschel 2006).....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 12 : Les principales activités biologiques des HDPs (atindehou 2012 adapté de YEUNg 2011).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 13 : Les fonctions des HDPs et IDRs dans l'immuno-modulation (adapté de Hilchie 2013).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 14: Illustration RP NANO-HPLC ULTIMATE 3000 DIONEX (source personnelle).....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 15: Temps d'élution des PTH-aas standards (source personnelle).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 16 : Corrélation indiCE CFI et EFFET (source personnelle).....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 17 : Figure Analyse de l'intégrité du peptide S11D <u>lot 1</u>.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 18 : Figure Analyse de l'intégrité du peptide M28D <u>lot 1</u>.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 19 : Interactions peptides/lipides (Galdiero 2013).....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 20 : Projection de la séquence de S11D sur une hélice (helical wheel projection RZ-lab).....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 21 : Projection de la séquence de M28D et M22T sur une hélice (helical wheel projection RZ-lab).....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 22 : Chromatogramme du M28D <u>lot 2</u> seul ;témoin à température ambiante.....</i>	<i>63</i>

<i>Figure 23 : Chromatogrammes (A) albumine seule, (B) M28D en présence d'albumine.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 24 : Chromatogrammes de M28D en présence des surnageants bactériens comparés avec les surnageants correspondants.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 25: Fonctions des Amélogénines .....</i>	<i>68</i>

## INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 Les gènes exprimés dans les ostéoblastes et régulés par EMD (adapté de S. P. LYGSTADASS 2009)...</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 2 : La Classification des PAMs selon leur structure (source Brogden 2005).....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 3 : pourcentage d'Inhibition de la croissance de microorganismes par M28D et S11D <u>lots 1</u>.....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 4: nouveaux tests antimicrobiens avec M28D (<u>lot 1</u>).....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 5 : nouveaux tests antimicrobiens avec M28D (<u>lot 2</u>).....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 6 : nouveaux tests antimicrobiens avec S11D (<u>lot 1</u>) .....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 7 : Taux d'inhibition de la croissance de M. luteus, couple amoxicilline/M28D .....</i>	<i>62</i>

## INDEX DES ABREVIATIONS

### A

AA : Acide Aminé

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

AP : Protéique d'Adaptation clathrine

ATZ-aa :(AnilinoThioZolino-acide aminé)

### B

BHI : Brain Heart Infusion

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMR : Bactérie Multi-Résistante aux antibiotiques

BSP : Bone SialoProtein

### C

CD : Cluster de Différenciation

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

### D

Da : Dalton, unité de masse atomique

DIEA : Di Isopropyl Ethyl Amine

### E

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EGF : Epidermal Growth Factor

EMD : Enamel Matrix Derivative ; (Emdogain)

**F**

FGF : Fibroblastic Growth Factor

Fmoc : 9Fluorenylmethyloxycarbonyl

**H**

HCL : acide chlorhydrique

HDP : Human Defence Peptide

HOBT : (HydrOxyBenzoTriazole)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

H<sub>2</sub>O : eau

**I**

IDP : Immune Defence Peptide

IDR : Immune Defence Regulator

IG : ImmunoGlobuline

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL : InterLeukine

**K**

kDa : kilo Dalton

KLK4

**L**

LAD : Ligament Alvéolo-Dentaire

LAMP 1- 3 (CD 63)

LBP : LPS Binding Protein

LPS : LipoPolySaccharide

Lymphocytes NK : Natural Killer

Lymphocyte Th: Lymphocytes T helper ou auxiliaires

LRAP : Leucine Rich Amelogenin Peptide

LS-8



**M**

MAP-kinases: Mitogen Activated Protein kinases

MALDI-TOF : Matrix Assisted Desorption Laser - Time Of Flight

MBL : Mannan Binding Lectin

MBP : Mannan Binding Protein

MCP-1 : Monocyte Chimio-attractante Protein 1

MHB : Mueller Hinton Broth

MMP(s) : MétalloProtéases Matricielles

MMR : Macrophage Mannose Receptor

MS : Mass Spectrometry

M24R : domaine cationique du M28D ; MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKRQ

M28D : peptide de l'Amélogénine de 28 résidus MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKREEVD

**O**

OPG : OstéoProtéGérine

**P**

pH : potentiel Hydrogène

PAM(s) : Peptide(s) AntiMicrobien(s)

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PGA : Poly Glycol Alginate

PAL : Phosphatase ALcaline

PITC : PhénylIsoThioCyanate

PM : Poids Moléculaire

PRR : Pattern Recognition Receptors

PTC-aa : PhénylThioCarbamyl amino acide

PTH-aa : PhénylThioHydantoine amino acide

**R**

RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene 1

RLR(s) : RIG-I-like receptor(s)

RP-HPLC : Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

**S**

S11D : peptide dérivé de l'Amélogénine, 11 résidus STDKTKREEVD

**T**

TFA : Acide TriFluoroacétique

TGF : Transformant Growth Factor

TLR : Toll Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAP : Tyrosine Rich Amelogenin Peptide

**U**

UV : ultra-violets

**V**

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VLU : Venous Leg Ulcer

## INDEX DES ABBREVIATIONS DES ACIDES AMINES

Acide Aminé	Abréviations 3 Lettres	Abréviations 1 Lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartique	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Mét	M
Phénylalanine	Phé	F
Proline	Pro	P
Sérine	Sér	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

---

# LES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES PEPTIDES M28D ET S11D DERIVES DE L'AMELOGENINE

## AVANT-PROPOS :

La fréquence accrue de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques causant des intoxications alimentaires et maladies nosocomiales (BMR) (1) (2) incite sans cesse à chercher de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le domaine de l'odontologie de nombreuses pathologies très courantes sont causées par des infections microbiennes et l'un des espoirs pour traiter les patients pourrait être l'utilisation des peptides antimicrobiens (PAMs) (3). Les PAMs sont des agents naturels du système immunitaire inné, qui jouent aussi un rôle dans la mise en place du système immunitaire adaptatif. Ces PAMs ont été caractérisés dans la plupart des espèces du vivant (Bactéries, Mycètes, Insectes, Plantes, Batraciens, Mammifères) (4). Chez l'Homme, les PAMs les plus étudiés sont les Défensines (5). L'intérêt des PAMs est leur large spectre d'activité, l'absence de toxicité et leurs propriétés immuno-modulatrices.

Une étude réalisée en 2013 à l'INSERM U1121 sur intitulé peptides dérivés de l'Amélogénine (Marin VINCENT pour son mémoire de Master 2), a montré que la séquence du peptide M28D présente de nombreuses similitudes avec les PAMs (petite taille, amphiphile, contient un domaine cationique M24R), suggérant des activités antimicrobiennes. Pour valider cette hypothèse des tests antimicrobiens avaient été réalisés avec le peptide synthétique M28D qui correspond à un fragment endogène de l'Amélogénine humaine. Des activités antimicrobiennes à une concentration de l'ordre du micromolaire sur deux bactéries ainsi que sur des champignons et levures avaient été démontrées.

Nous nous proposons dans cette thèse de recherche fondamentale d'approfondir l'étude des propriétés antimicrobiennes des peptides synthétiques dérivés de l'Amélogénine par des tests antimicrobiens complémentaires, en élargissant les souches microbiennes testées et de définir les paramètres structuraux du peptide qui sont importants pour l'expression des activités antimicrobiennes. Cette étude repose sur des expériences de biochimie, de microbiologie et nous discuterons des différents aspects des propriétés biologiques de l'Amélogénine dans le contexte de l'odontologie.

# PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE

## 1. LES AMELOGENINES

### 1.1. L'AMELOGENESE

L'amélogénèse est la formation de l'émail par les améloblastes. L'émail, structure minéralisée la plus dure du corps, correspond à la couche la plus superficielle des dents. L'émail est organisé en prismes, entourés par la substance interprismatique (Fig. 1), et sont composés de cristallites d'apatites carbonatées, eux-mêmes d'une maille élémentaire d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  polysubstituée(6) (Fig, 2 (A)). Ces cristaux ont la forme d'un ruban à section hexagonale, dont l'épaisseur est de 25 et 30 nm, dont la largeur de 60 à 70 nm et dont la longueur peut dépasser 1mm (7) (Fig. 2 (B)).

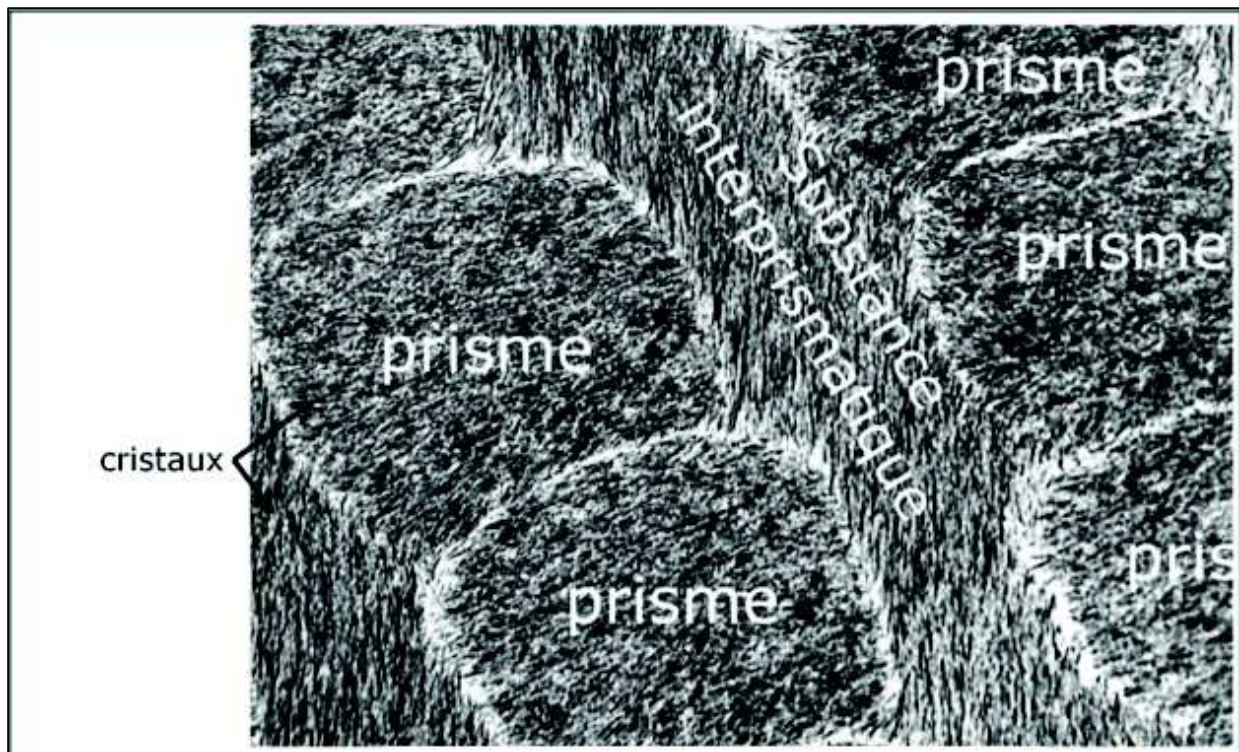


FIGURE 1: LA STRUCTURE DE L'EMAIL ; ILLUSTRATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (DR. ALLIOT-LICHT 2013)

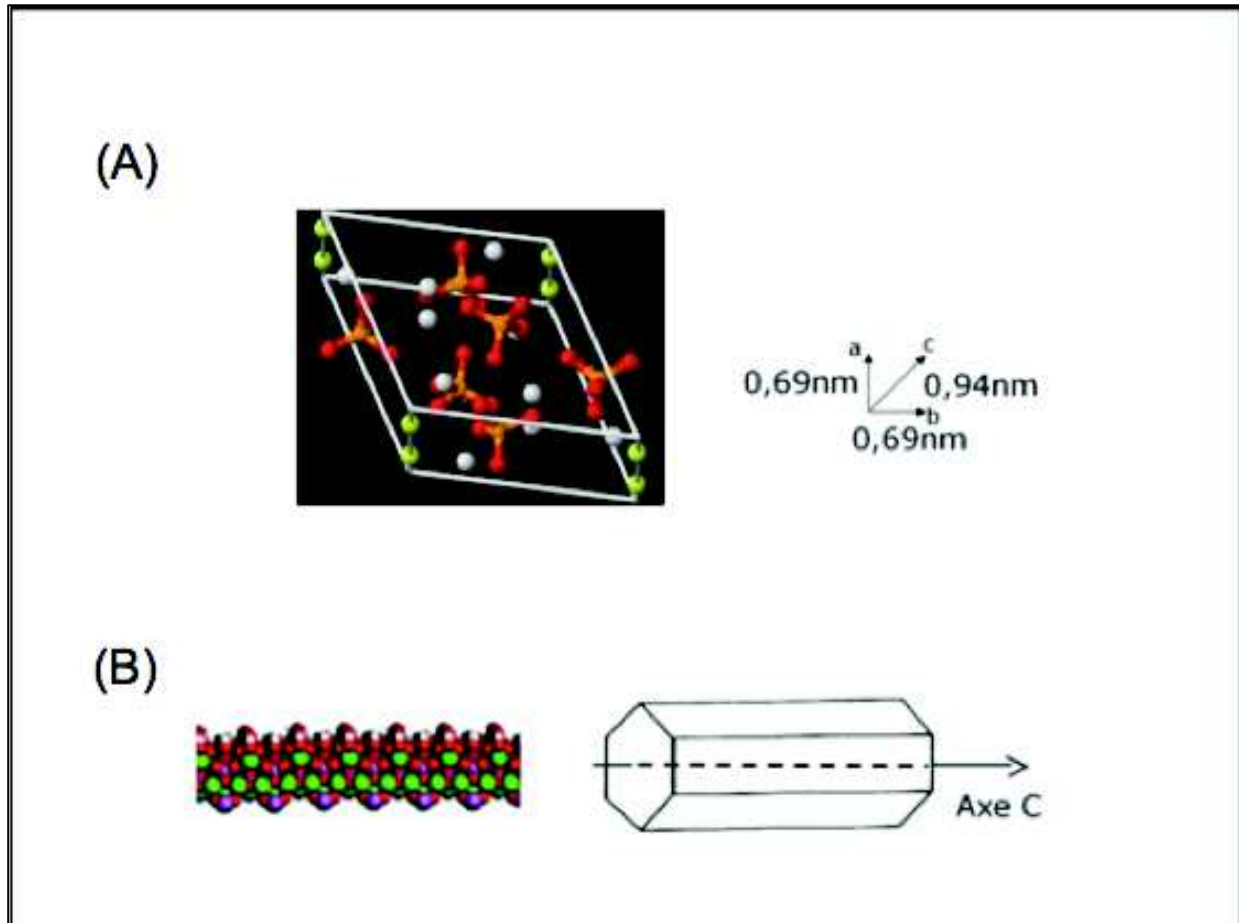


FIGURE 2: LA STRUCTURE DU CRISTAL D'EMAIL ET SA MAILLE ELEMENTAIRE (ADAPTE DU DR. ALLIOT-LICHT 2013)

**(A) Maille élémentaire d'hydroxyapatite polysubstituée ; (B) Assemblage des mailles élémentaires en un ruban à section hexagonale**

L'émail a une origine ectodermique et les améloblastes sont les cellules responsables de l'amélogénèse, qui inclut la synthèse et la sécrétion des molécules de la matrice de l'émail, la minéralisation puis la maturation de l'émail (8, 11). Les améloblastes sont issus de la différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne de l'organe de l'émail. L'émail se forme uniquement au stade couronne de l'odontogénèse (9) et lorsque la formation de l'émail d'une dent est terminée, débute le stade racine de l'odontogénèse. L'amélogénèse suit un gradient spatio-temporel de différenciation entre la cuspide et le collet. De ce fait au stade de la couronne une dent présente toutes les phases de la vie d'un améloblaste. L'amélogénèse est déjà terminée au niveau de la cuspide alors qu'elle n'a pas commencé au niveau du collet de la dent

en bas de la Figure 3 (7). Toutes les étapes de l'amélogénèse peuvent être observées sur une dent en formation au stade couronne.

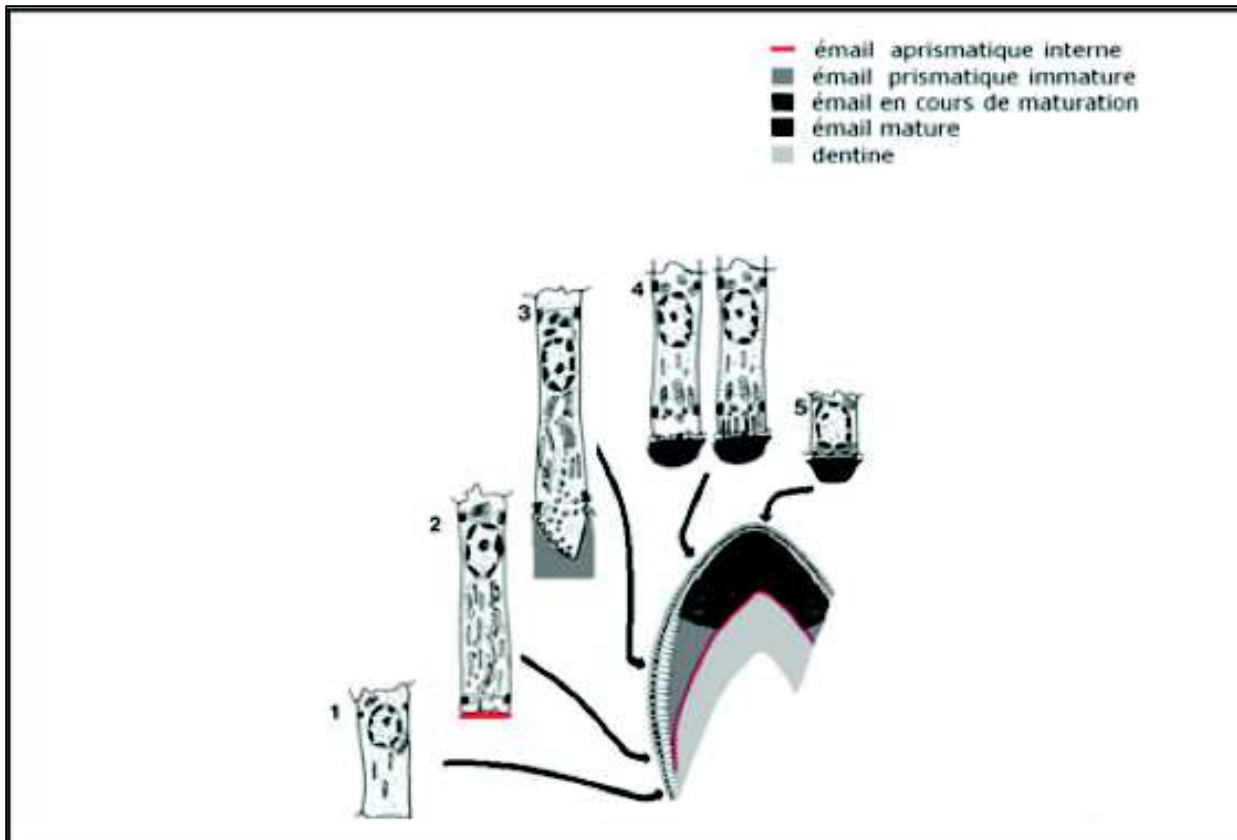


FIGURE 3 : LES PHASES DE DIFFERENCIATION DES AMELOBLASTES (ADAPTE DU DR. ALLIOT-LICHT 2013)

- 1 - L'améloblaste pré-sécréteur se place en regard de la dentine,
- 2 - l'améloblaste sécréteur sans prolongement de Tomes secrète une fine couche d'émail aprismatique au contact de la dentine,
- 3 - l'améloblaste sécréteur avec prolongement de Tomes secrète l'émail prismatique immature,
- 4 - l'améloblaste de maturation assure la maturation de l'émail
- 5 - l'améloblaste de protection protège la surface de l'émail mature jusqu'à l'éruption.



## 1.2. LES PROTEINES DE L'AMELOGENESE

Les Amélogénines dont le poids moléculaire est variable, sont présentes dans toute l'épaisseur de l'émail en formation. Elles s'assemblent en nanosphères dont le rôle principal est d'empêcher la croissance en largeur et en épaisseur des cristaux d'émail et d'empêcher la fusion des cristaux (Fig. 4, (B)) (6).

L'améloblastine, l'énaméline et la tufteline sont regroupées sous l'appellation : protéines non-Amélogénines (Fig. 4, (A)) (10)(11)(12). Elles sont d'un poids moléculaire supérieur à 50 kDa, et représentent environ 10% des protéines de l'émail lors de l'amélogenèse. Leur rôle est d'initier la nucléation des cristaux et servent de guide aux cristaux, leur conférant une forme hexagonale. Ces hexagones réguliers vont alors croître par épitaxie selon l'axe C qui passe par le centre du cristal. Les protéines non-Amélogénines possèdent une demi-vie courte et sont présentes au voisinage des améloblastes (8).

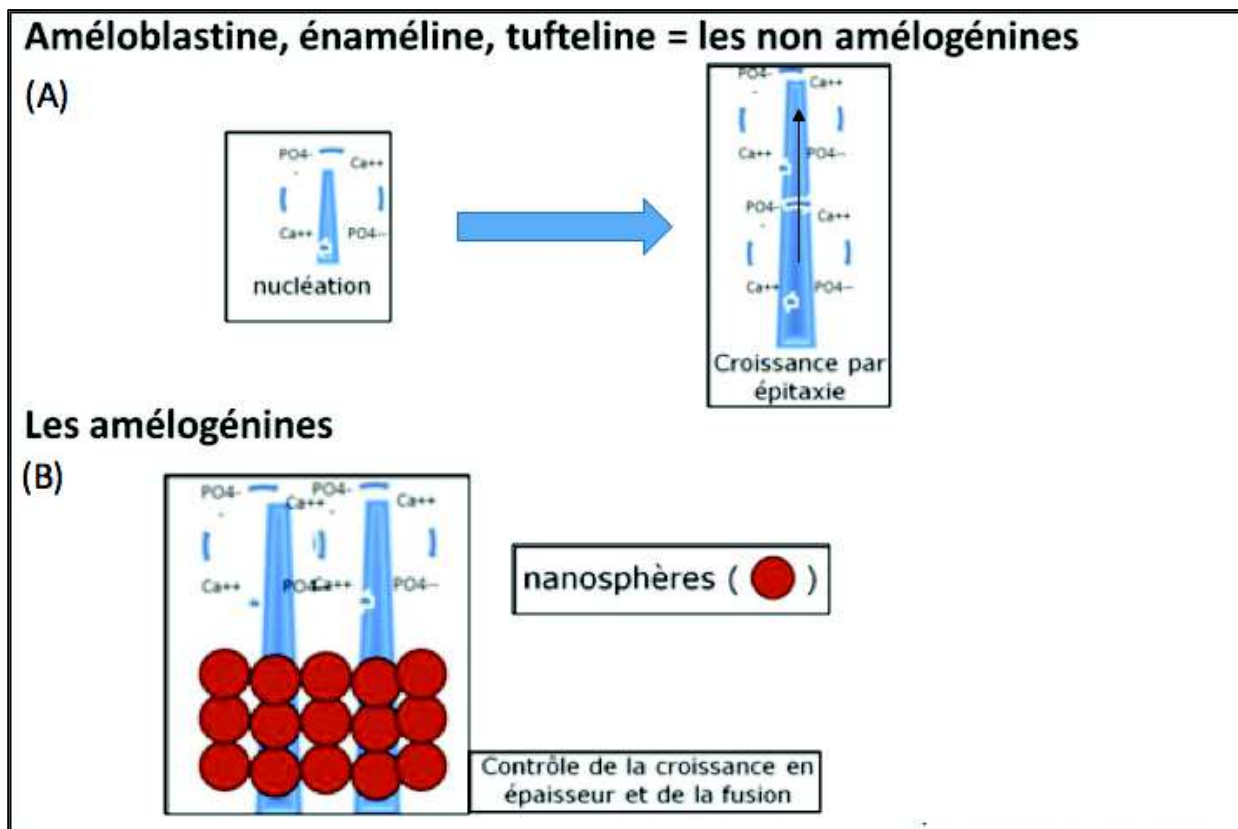


FIGURE 4 : LES ROLES DES PROTEINES DE L'AMELOGENESE (ADAPTE DU DR. ALLIOT-LICHT 2013)



### 1.3. LES PROTEINES AMELOGENINES

L'Amélogénine est une famille de protéines hydrophobes dérivées d'un gène unique AMEL, situé sur les chromosomes X et Y, par épissage alternatif et par une maturation contrôlée post-sécrétoire. Le gène AMEL et les séquences protéiques N- et C-terminales sont très conservées (13) à travers les espèces (80% d'homologie). Elles sont très étudiées chez les mammifères (14). Chez l'homme trois isoformes de l'Amélogénine liée au chromosome X (Q99217)(15), ainsi qu'un isoforme de l'Amélogénine liée au chromosome Y (Q99218)(15) ont été recensés dans la base de données UniProtKB. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux peptides C-terminaux (M28D et S11D), qui correspondent aux peptides endogènes de 28 et 11 résidus C-terminaux de l'Amélogénine humaine AMEL-X (Fig. 5 et 6) (16). L'Amélogénine porcine lié au chromosome X constitue le composant majoritaire de EMD, Emdogain (Straumann AG, Bâle, Suisse ; Fig. 6). Les Amélogénines sont connues pour leur auto-assemblage en agrégats supramoléculaires qui forment une matrice extracellulaire insoluble ayant une forte affinité avec l'hydroxyapatite et le collagène (17).

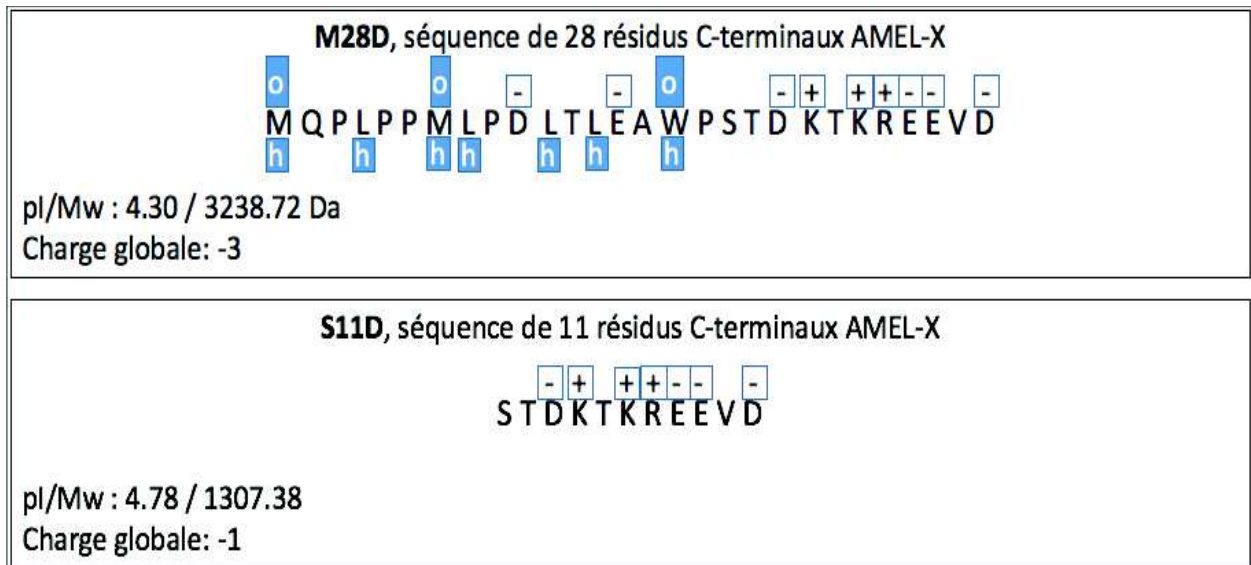


FIGURE 5 : LES PEPTIDES C-TERMINAUX DE L'AMELOGENINE X HUMAINE (SOURCE PERSONNELLE)

o oxydation ; - charge négative ; + charge positive ; h résidu hydrophobe

Q99217(15), Isoforme 1 de l'Amélogénine lié au Chromosome X, *Homo sapiens*

MGTWILFACL LGAAFA / **MPLP PHPGHPGYIN FSYEVLTPLK WYQSIRPPYP  
SYGYEPMGGW** LHHQIIPVLS QQHPPTHTLQ PHHHIPVVA QQPVIPQQPM  
MPVPGQHSMT PIQHHQPNLP PPAQQPYQPQ PVQPQPHQPM QPQPPVHPMQ  
PLPPQPPLPP MFPMQPLPPM LPDLTLEAWP STDKTKREEV D

Q99217-2(15), Isoforme 2 de l'Amélogénine lié au Chromosome X, *Homo sapiens*

MGTWILFACL LGAAFA / **MPVL TPLKWYQSIR PPYPSYGYEP MGGWLHHQII**  
PVLSQQHPPT HTLQPHHHIP VVPAQQPVIP QQPMMMPVPGQ HSMTPIQHHQ  
PNLPPPAQQP YQPQPVQPQ HQPMQPQPPV HPMQPLPPQP PLPPMFPMQ  
LPPMLPDLTL EAWPSTDKTK REEVD

Q99217-3(15), Isoforme 3 de l'Amélogénine lié au Chromosome X, *Homo sapiens*

MGTWILFACL LGAAFA / **MPLP PHPGHPGYIN FSYENSHSQA INVDRALVL**  
**TPLKWYQSIR PPYPSYGYEP MGGWLHHQII** PVLSQQHPPT HTLQPHHHIP  
VVPAQQPVIP QQPMMMPVPGQ HSMTPIQHHQ PNLPPPAQQP YQPQPVQPQ  
HQPMQPQPPV HPMQPLPPQP PLPPMFPMQ LPPMLPDLTL EAWPSTDKTK  
REEVD

Q99218(15), Isoforme de l'Amélogénine lié au Chromosome Y, *Homo sapiens*

MGTWILFACL VAAFA/ **MPLP PHPGHPGYIN FSYENSHSQA INVDRIALVL**  
**TPLKWYQSMI RPPYSSYGYE PMGGWLHHQI** IPVVSQQHPL THTLQSHHHI  
PVVPAQQPRV RQQALMPVPG QQSMTPTQHH QPNLPLPAQQ PFQPQPVQPQ  
PHQPMQPQPP VQPMQPLLQ PPLPPMFPLR PLPPILPDH LEAWPATDKT  
KQEEVD

P0217(15), Amélogénine Porcine, isoforme lié au Chromosome X, EMDOGAIN, EMD

MGTWILFACL LGAAFS/ **MPLP PHPGHPGYIN FSYEVLTPLK WYQSMIRHPY**  
**PSYGYEPMGG** WLHHQIIPVV SQQTPQNHAL QPHHHIPMVP AQQPVVPQQP  
MMPVPGQHSMT TPTQHHQPNL PLPAQQPFQP QSIQPQPHQP LQPHQPLQPM  
QPMQPLQPLQ PLQPQPPVHP IQPLPPQPPL PPIFPMQPLP PMLPDLPLEA  
WP/ATDKTKRE EVD

FIGURE 6 : SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'AMELOGENINE HUMAINE ET PORCINE (SOURCE PERSONNELLE)

- **Domaine N-terminal en gras** : correspond aux peptides de l'Amélogénine riches en tyrosine (Y) TRAP, TRAP-1(44résidus), TRAP-2(42 résidus) insoluble, TRAP (45 résidus Porc)
- Domaine C-terminal souligné : correspond aux peptides M28D MQPLP PMLPDLPLEAWPSTDKTKREEVD, et S11D STDKTK REEVD
- Propeptide: résidus 1 à 16

L'existence de plusieurs isoformes et des récepteurs individuels supposés, indique que les peptides dérivés de l'Amélogénine pourraient avoir des fonctions différentes(18)(19).

Le profilage de l'expression génétique, suite aux effets de EMD sur des ostéoblastes primaires a montré un effet significatif sur l'expression de plus de 600 gènes (Tableau 1). Il s'agit d'un profil d'expression génétique similaire, mais pas identique à celui de l'hormone parathyroïde (PTH) (20), une hormone qui régule le métabolisme phosphocalcique et les ostéoclastes/ostéoblastes. Désormais, les Amélogénines ne sont plus identifiées comme étant tissu-spécifique (7).

L'expression de l'Amélogénine a été démontrée dans différentes cellules des os longs, dans leur précurseurs les cellules souches mésenchymateuses, dans certaines couches spécifiques du cartilage hyalin de croissance des épiphyses osseuses(21), dans la pulpe dentaire(22)(23), dans la microglie. Cette expression variée suggère que l'Amélogénine n'a pas uniquement un rôle dans la biominéralisation de l'émail, mais aussi lors du développement, la croissance et la calcification de nombreux tissus squelettiques (19)(24)(25) et ainsi que dans les processus de défense et de réparation (26).

Fonctions régulées par les Amélogénines	Nombres de gènes régulés	
Angiogenèse	17	
Communication cellulaire	25	
Relation à l'adhésion cellulaire	17	
Défense et réparation cellulaire	23	
Croissance et prolifération cellulaire	20	45
Relation avec la prolifération	17	
Relation avec la croissance	5	
Relation avec la maturation cellulaire	3	
Transport moléculaire	39	61
Relation avec la mobilisation du Ca <sup>2+</sup>	22	
Signalisation cellulaire	98	
Migration cellulaire	40	74
Relation avec le cell homing	34	
Croissance et remodelage osseux	19	37
Relation au development osseux	18	

**TABLEAU 1 LES GENES EXPRIMES DANS LES OSTEOLASTES ET REGULES PAR EMD (ADAPTE DE S. P. LYNSTADASS 2009)**

#### 1.4 LES DERIVES DE LA MATRICE AMELAIRE, EMD, EMDOGAIN

Les dérivés de la matrice amélaire (Enamel Matrix Derivative EMD), sous la forme d'un extrait acide de protéines purifiées de la matrice amélaire porcine dont 90 à 95% sont des Amélogénines (Emdogain R ; Straumann AG, Bâle, Suisse), ont été utilisées avec succès pour restaurer le ligament alvéolo-dentaire, le ciment, ainsi que l'os alvéolaire chez des patients atteints d'une perte d'attache épithélio-conjonctive sévère (27)(28). De nombreuses études dont une revue du groupe Cochrane (29) a conclu que l'EMD améliore significativement le niveau de l'attache parodontale et diminue la profondeur de poche mesurée par rapport au lambeau d'assainissement parodontal (30), avec une stabilité clinique à 5 ans après le traitement (31). Les protéines de l'émail joueraient même un rôle dans la formation du ciment et du ligament alvéolo-dentaire, lors du développement normal de l'attache conjonctive de la dent au stade racine de l'odontogenèse (32)(33). Lors de l'application d'Amélogénines à la surface dénudée du ciment dentaire, celles-ci précipitent pour former une matrice extracellulaire stable avec une surface hydrophobe ayant le potentiel de favoriser les interactions avec les cellules des tissus adjacents. Actuellement Emdogain (34) est le seul biomatériau sur le marché ayant le potentiel de déclencher cliniquement une réponse régénérative significative des cellules du ligament alvéolo-dentaire(35)(32).

Le traitement par l'EMD est probablement mimétique de l'odontogenèse et fonctionnerait en redémarrant dans les cellules des programmes endormis du développement afin de régénérer l'appareil d'attache de la dent (22)(36). Les phénomènes de régénération/cicatrisation nécessitent une cascade séquentielle de facteurs de croissance qui vont agir sur les cellules pour reconstituer les tissus. Il est supposé que le mécanisme le plus important pour l'action de l'EMD est d'initier la régénération parodontale par le recrutement de cimentoblastes à la surface de racine dentaire et de les stimuler à former du ciment, qui amènerait dans un second temps une régénération des fibres desmodontales et de l'os alvéolaire. Cependant, de nombreuses études récentes démontrent que les Amélogénines peuvent aussi interagir directement avec d'autres types cellulaires que les cimentoblastes (37), suggérant que ces molécules ont un rôle plus direct dans la régénération des tissus mésenchymateux (33). Des observations cliniques sur d'autres tissus promettent de nouvelles applications pour les Amélogénines (19).

## 1.5 LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES AMELOGENINES

Nous allons à présent décrire les propriétés biologiques des Amélogénines, au travers de trois thèmes que sont les interactions des Amélogénines avec les cellules, leurs rôles biologiques dans la biominéralisation de l'émail et dans les processus de cicatrisation.

### 1.5.1 LES INTERACTIONS DES AMELOGENINES AVEC LES CELLULES DE L'HOTE

L'activité biologique des Amélogénines stimule avec un effet BMP-like et BSP-like les cellules épithéliales et les fibroblastes, ce qui induit la production des facteurs de croissances tels que TGF- $\beta$ , BMP-2, BMP-4, BMP-7,  $\beta$ -FGF, PDGF, VEGF, EGF, IGF(38). Il a été démontré que les molécules d'Amélogénine entière peuvent stimuler une production autocrine de BMP, tandis que des protéines d'Amélogénine plus petites, molécules riche en leucine (Leucine rich amelogenin peptide LRAP) et riche en tyrosine (39) (Tyrosine rich amelogenin peptide TRAP) peuvent stimuler une production autocrine de TGF- $\beta$ . Il a également été démontré que l'EMD augmente la synthèse autocrine de VEGF (40) et PDGF dans les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire (37). Cette étude a aussi montré que l'EMD stimule la production autocrine d'autres facteurs de croissance tels VEGF et des cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) ou la protéine monocyte chimio-attractante 1 (MCP-1). De plus, d'autres études ont montré que LRAP recombinant, en l'absence de facteurs de croissance, joue un rôle dans la signalisation cellulaire (33). Toutes ces observations réunies suggèrent que des molécules spécifiques d'Amélogénine pourraient déclencher une libération autocrine de facteurs de croissance responsables des effets de régénération observés avec l'EMD.

Un large éventail d'études expérimentales tant *in vitro*, qu'*in vivo*, ont démontré que l'EMD et les Amélogénines stimulent la croissance de plusieurs types de cellules mésenchymateuses, dont les fibroblastes, les cémentoblastes, les ostéoblastes, et les cellules souches (41)(42). Ces études montrent aussi que l'EMD et l'Amélogénine améliorent l'expression de marqueurs de maturation tissu-spécifique, tels que la phosphatase alcaline (PAL), le collagène, l'ostéocalcine et l'ostéopontine, dans les tissus osseux (20). Une stimulation secondaire de l'activité des ostéoclastes est aussi démontrée (42) par une augmentation de la sécrétion de protéines telles que IL-6 et l'ostéoprotégérine (OPG). Cependant, un effet cytostatique direct a été observé par l'EMD sur les cellules épithéliales et les ostéoclastes (37)(43)(44). L'activité des ostéoclastes et l'homéostasie des cellules épithéliales sont cliniquement importantes

pour une régénération du desmodonte et la croissance osseuse. D'une part un équilibre entre l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes est nécessaire, et d'autre part l'exclusion des cellules épithéliales est un des impératifs, donnant l'avantage aux tissus de soutien.

Afin de pouvoir comprendre les effets des peptides de l'Amélogénine sur les tissus, il faut étudier les interactions de ces molécules avec différents types cellulaires. Une réponse cellulaire primaire initiée par la liaison de l'Amélogénine à des récepteurs à la surface de la cellule, suivie d'un signal médié par l'adénosine cyclique monophosphate (cAMP) a été observé dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules desmodontales et les cellules du sang (45). La fixation de nanosphères d'EMD a été démontrée avec des ostéoblastes primaires humains, des améloblastes murins (LS-8) (20), et les cellules desmodontales primaires humaines. Dans les ostéoblastes humains, les nanosphères assemblées d'EMD ont été localisées au niveau du complexe protéique d'adaptation clathrine (AP-2), le mécanisme majeur d'endocytose médiée par la clathrine avec des invaginations mantelées des cellules mammifères (Fig. 8). Jusqu'à présent aucun récepteur spécifique de l'Amélogénine n'a pu être identifié (46). Cependant deux membres du système des protéines membranaires associées au lysosome (Lysosomal-associated membrane proteins LAMP) sont impliqués : LAMP-1 interagit avec le peptide court de l'Amélogénine LRAP, tandis que LAMP-3/CD63 se lie aux isoformes plus longs de l'Amélogénine. Toutefois, aucun de ces deux récepteurs n'a d'interaction avec les deux types de molécules d'Amélogénine (46)(47).

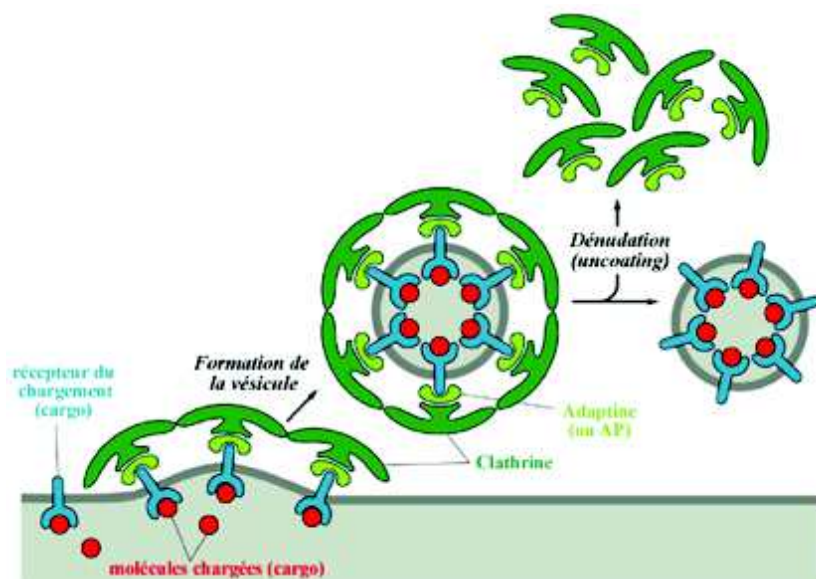


FIGURE 7 : FORMATION DE VESICULES PAR MANTEAU DE CLATHRINE (LAMP)

### 1.5.2. LE ROLE BIOLOGIQUE DES AMELOGENINES DANS LA BIOMINERALISATION DE L'EMAIL

Les Amélogénines sont fortement exprimées dans l'organe de formation de l'émail dentaire. Le domaine N-terminal riche en tyrosine ainsi que le domaine C-terminal hydrophile sont très conservés (12). Ce haut niveau de conservation de la séquence suggère que la structure entière de la molécule d'Amélogénine est fondamentale dans la biominéralisation de l'émail dentaire, et que les motifs des domaines N-terminal et C-terminal sont particulièrement importants (Fig. 7) d'un point de vue fonctionnel. Les Amélogénines sont riches en résidus de proline (30%), qui sont connus pour inhiber la formation de structures secondaires classiques, telles que les feuillets beta et les hélices alpha, ce qui produit une protéine intrinsèquement désordonnée (IDPs). Toutefois, ce désordre permet aux molécules d'Amélogénine de s'auto-assembler en supra-molécules hydrophobes mono-dispersées, appelées nanosphères (17). Dans la matrice amélaire en voie de minéralisation, ces Amélogénines auto-assemblées vont s'attacher aux cristaux d'hydroxyapatite et structurer la matrice amélaire et ainsi moduler la croissance cristalline (48). Une perte graduelle des Amélogénines dans la matrice va se produire dans les heures qui suivent leur sécrétion en raison d'une dégradation protéolytique progressive par MMP20 lors de la phase sécrétoire et KLK4 lors de la phase de maturation (49).

La région C-terminale hydrophile est séparée des nanosphères par clivage, pour la liaison des nanosphères assemblées à l'hydroxyapatite. Au fur et à mesure que la formation de l'émail progresse les parties C-terminales des nanosphères d'Amélogénine vont subir des clivages contrôlés et ainsi moduler leurs propriétés d'adhésion à l'hydroxyapatite (19). Les peptides produits spécifiquement par cette protéolyse deviennent solubles et sont absorbés par les améloblastes post-sécrétoires (Fig. 3). Les nanosphères d'Amélogénine sont ensuite détruites, lorsque toute l'épaisseur de l'émail a été déposée, la majorité des protéines de la matrice amélaire (50) sont retirées par les améloblastes et remplacées par un fluide tissulaire dans lequel les cristaux d'émail immatures, étirés lors de la phase sécrétoire, vont pousser en largeur et en épaisseur pour occuper tout l'espace lors de la phase de maturation (8) (Fig. 1).



### 1.5.3 LE ROLE BIOLOGIQUE DANS LA CICATRISATION DES LESIONS

Une observation clinique a été décrite lors de l'utilisation de l'EMD pour la régénération en chirurgie parodontale. Il s'agit d'une cicatrisation rapide des lésions, ainsi que des symptômes post-opératoires réduits, tels que la douleur ou l'œdème. De nombreuses raisons ont été suggérées pour expliquer ces observations y compris des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens (45) (51).

Inspirés par ces observations cliniques en chirurgie orale, plusieurs chercheurs ont étudié les effets des Amélogénines sur la cicatrisation des lésions aiguës et chroniques de l'épiderme. Une première étude a montré que la quantité de tissu de granulation dans les lésions traitées par l'EMD était augmentée significativement, et que le comblement des lésions ainsi que la ré-épithélialisation des lésions de pleine épaisseur progressaient deux fois plus vite en présence de l'EMD, démontrant ainsi une stimulation de la cicatrisation des lésions épidermiques par les Amélogénines (52). Les mécanismes impliqués dans la cicatrisation de lésions épidermiques assistée par l'EMD doivent encore être élucidés pour une meilleure compréhension de ces effets. Il a été montré que l'application locale d'Amélogénines stimule l'angiogenèse par l'induction de la sécrétion de VEGF, PDGF et MMP-2 (matrix metalloproteinase-2).

Des mécanismes similaires ont été rapportés par des études *in vitro* (37) et soutiennent l'idée que les Amélogénines fonctionnent par une stimulation des cellules mésenchymateuses pour exprimer des facteurs importants pour la cicatrisation, la croissance et la régénération (20). La cicatrisation étonnamment rapide observée dans les lésions de modèles animaux a mené au développement d'une formulation d'Amélogénine pour les lésions épidermiques, basé sur le produit original EMD. Plusieurs études cliniques, notamment sur les ulcères veineux des jambes (veinous leg ulcer VLU) difficiles à guérir, ont validé les observations faites en chirurgie orale, ainsi que celles réalisées sur les modèles animaux. Ces études montrent que les Amélogénines fonctionnent également pour la cicatrisation des VLU et même les VLU difficiles à guérir et installés de longue date. Dans la première étude, des essais cliniques en phase III randomisée ont été réalisés dans plusieurs centres sur l'application d'Amélogénines dans des VLU difficiles à guérir. Les lésions traitées par les Amélogénines ont montré une réduction de la taille d'un facteur trois dans le cas d'ulcères sévères en comparaison avec un groupe témoin traité avec les excipients de

Emdogain sans les Amélogénines sur une période de douze semaines (53). Des différences statistiquement significatives en faveur du groupe traité par les Amélogénines ont aussi été trouvées pour une réduction de la douleur en relation avec l'ulcère et également lorsque le patient change de vêtements. La proportion importante de patients présentant aucun exsudat ou peu d'exsudat au niveau des lésions dans le groupe traité par les Amélogénines suggère qu'il y a une diminution de l'inflammation et une cicatrisation accélérée.

Les résultats d'une étude de suivi de cas ont aussi montré que la cicatrisation bénéfique due à l'Amélogénine était maintenue six mois après la fin du traitement (54)(55). Dans le groupe traité par l'Amélogénine, il y avait aussi un pourcentage significativement plus élevé de patients avec une diminution de la taille de la lésion, et le nombre total de patients avec des lésions complètement cicatrisées était trois fois plus grand par rapport au groupe témoin. De même la douleur, l'inflammation et l'inconfort ont continué à être significativement réduits dans le groupe traité par l'Amélogénine, indiquant que les effets bénéfiques initiaux étaient maintenus même après la fin du traitement. Les observations expérimentales et cliniques sur les effets de l'Amélogénine dans la guérison des plaies sont maintenant reconnus et montre que la thérapeutique avec l'Amélogénine comme un complément aux soins standards est bénéfique aux patients atteint de VLU sévères, à la fois sur le court et le long terme. Les Amélogénines sous la formulation Xelma (Mölnlycke Healthcare, AB, Gothenburg, Sweden) sont maintenant en vente en Europe pour cette indication, mais l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique n'a pas été acceptée à ce jour. De plus, des essais cliniques étudient les effets de Xelma sur les ulcères liés au diabète, les ulcères dus aux radiations de radiothérapie cancéreuse, les ulcères chirurgicaux, et d'autres indications sont en développement (56).

## 1.6 L'APPLICATION CLINIQUE DES AMELOGENINES

La capacité des Amélogénines à s'auto-assembler en nanosphères insolubles, lentement digérées par des protéases matricielles (MMP20 et KLK4)(49) et libérant des peptides biologiquement actifs, semble être la clé de l'application clinique de ces molécules. L'auto-assemblage en nanosphères est contrôlé par des changements de température, pH, force ionique, et de concentration en protéines (17)(57). Ces nanosphères sont insolubles à pH physiologique, et peuvent être dissoutes soit à un pH bas (58) ou un pH élevé. De plus, cette solubilité est influencée par la température (59)(60). La meilleure solubilité pour EMD est obtenue à de basses températures en présence de forces ioniques élevées, en raison des interactions de type hydrophobe (61)(62).

Dans leur usage clinique les Amélogénines sont dissoutes dans un véhicule de propylène glycol alginate (PGA), sous forme d'un gel acide utilisable en seringue (Emdogain). Lorsque l'on applique ce gel à un patient, l'acidité du gel est neutralisée par les fluides biologiques et sous l'effet de la température à 37°C, les Amélogénines sont relarguées, et s'auto-assemblent en nanosphères pour précipiter à la surface des tissus exposés chirurgicalement. Au cours des jours et semaines suivantes l'Amélogénine auto-assemblée est digérée libérant localement et progressivement des composés biologiques actifs, qui induisent des processus de régénération et de croissance.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis plus particulièrement intéressé aux peptides M28D et S11D de l'Amélogénine (Fig. 5), et notamment le peptide M28D dont la séquence présente des caractéristiques similaires aux PAMs (petite taille, caractère cationique du fragment M24R, caractère amphiphile), suggérant une potentielle activité antimicrobienne.

## 2. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS (PAMs)

Les PAMs constituent l'un des systèmes de défense les plus anciens de tous les organismes vivants et présentent un caractère universel. On les retrouve dans les plantes, les vertébrés, les invertébrés, les mammifères, les bactéries et les champignons (4). Les PAMs cationiques sont notamment considérés comme l'une des briques élémentaires du système immunitaire inné. Ces peptides présentent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique, voire antivirale, et peuvent réguler l'inflammation. Plusieurs de ces peptides ou analogues ont fait preuve de leur efficacité dans des études cliniques en ciblant des infections localisées. On peut citer notamment les dérivés de la magainine, et de l'histatine administrés dans une formule topique(63). Certains PAMs perméabilisent les membranes soit par un effet dit de type détergent ou par la formation de pores (64).

### 2.1. LA CLASSIFICATION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Les peptides peuvent être classés selon quatre grandes familles selon leur structure (65)(63)(66). Ils sont le plus souvent cationiques, mais peuvent également être anioniques (Tableau 2) :

- les PAMs linéaires dont la structure est une hélice  $\alpha$
- les PAMs contenant un pourcentage élevé en un AA particulier
- les PAMs ayant un ou plusieurs ponts disulfure (lié à la présence de cystéines).
- Les PAMs dérivés de protéines plus grandes.

<b>Peptides cationiques linéaires à hélice alpha</b>	organisme hôte
<b>Cécropine A, andropine, moricine, cérattoxine, mellitine</b>	insectes
<b>Cécropine P1</b>	nématode
<b>Magainine, dermaseptine, bombinine, brévinine-1, esculentine, buforine-II</b>	amphibien
<b>Pleurocidine</b>	Plie rouge (poisson)
<b>Séminalplasmine, BMAP, SMAP, PMAP</b>	Humain, bovin, ovin, porcin,
<b>CAP 18</b>	lapin
<b>LL-37</b>	humain
<b>Peptides cationiques riches en certains acides aminés, sans cystéines</b>	
<b>Peptides riches en proline: abaécine</b>	abeille
<b>Peptides riches en proline et en arginine:</b> <b>1. apidaécine, 2. drosocine, 3. pyrrhocoricine, 4. bacténicines, 5. PR-39</b>	1. abeille, 2. drosophile, 3. punaise, 4. bovin, ovin, caprin, 5. porcin.
<b>Peptides riches en proline et en phénylalanine: prophénine</b>	porcin
<b>Peptides riches en glycine: hyménotaécine</b>	abeille
<b>Ovotides riches en proline et en glycine: coléoptéricine, holotricine</b>	coléoptère
<b>Peptides riches en tryptophane: indolicidine</b>	bovin
<b>Petits polypeptides riches en histidine: histamine</b>	humain et primates

<b>Peptides riches en cystéines et ponts disulfures (cationique ou anioniques)</b>	
<b>Peptides contenant un pont disulfure: brévinine</b>	grenouille
<b>Peptides contenant deux ponts disulfures: 1. protégrine, 2. tacchyplésine</b>	1. porcin, 2. limule
<b>Peptides contenant trois ponts disulfures: 1. défensines alpha, 2.défensines <math>\beta</math>, 3.défensines oméga, 4.défensine A</b>	1.2. mammifères 3.macaques 4.insectes 4.plantes
<b>Peptides contenant plus de trois ponts disulfures: 1. drosomycine, 2. défensines antifongiques</b>	1. drosophile 2. plantes
<b>Peptides anioniques</b>	
<b>Maximilien H5</b>	amphibien
<b>Dermicidine, Enkelytine</b>	humain
<b>petits peptides anioniques</b>	humain, ovin, bovin
<b>Peptides dérivés de peptides plus grands (cationique ou anioniques)</b>	
<b>Lactocidine, dérivée de la Lactoferrine</b>	Lactobacillus acidophilus, lait des mammifères
<b>Casocidine, dérivée d'une caséine</b>	humain
<b>Catestatine, Chromofungine, sécrétolytine, CCB, dérivés des chromogranines</b>	mammifères
<b>Domaines antimicrobiens: de la lactalbumine bovine, l'hémoglobine humaine, le lysozyme, la lactotransferrine, l'ovalbumine</b>	mammifères

TABLEAU 2 : LA CLASSIFICATION DES PAMS SELON LEUR STRUCTURE (SOURCE BROGDEN 2005)

## 2.2. LA STRUCTURE DES PAMs

Les PAMs ont une structure qui leur confère certaines caractéristiques essentielles pour leur action antimicrobienne : leur petite taille, 12 à 50 acides aminés (AA) (67), le caractère amphiphile et généralement cationique pour certains (68)(63)(69). Parmi ces PAMs certains sont dérivés de neuropeptides (70)(71), et d'autres comportent des chaînes latérales aromatiques (72). Des peptides anioniques riches en acide aspartique et glutamique possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes intéressantes.

### 2.2.1. LES CARACTERISTIQUES ET SPECIFICITES DES PAMs

La relation entre la structure des PAMs et leurs activités antimicrobiennes est un sujet très étudié. Cependant les bases moléculaires spécifiques à chaque peptide sont peu connues (68). En fonction de sa séquence, de sa structure, chaque peptide a son propre spectre d'activité. Les facteurs comme la taille, la charge, la séquence en AA, l'hydrophobicité, le caractère amphotère ou encore le degré de structuration sont des facteurs spécifiques à un PAM donné.

La modification d'un de ces paramètres peut entraîner des changements de l'activité antimicrobienne, mais aussi de l'activité hémolytique d'un PAM, c'est le cas notamment pour les hélices- $\alpha$  (73). La présence d'une activité hémolytique est un inconvénient majeur pour l'application thérapeutique.

De la même manière, la composition et l'état de surface de la membrane plasmique des microorganismes vont impliquer qu'un PAM agit contre certains microorganismes. En effet, certaines bactéries ont une résistance naturelle à certains PAMs. On peut citer notamment la structure et la composition du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram -, ou la composition du peptidoglycane chez les bactéries à Gram - et à Gram + qui sont des composantes responsables de la résistance aux PAMs.

### 2.2.1.1. LA CHARGE DES PAMS

Le caractère cationique de la plupart des PAM explique leur rapidité d'action et leur affinité pour les membranes anioniques des bactéries : plus la charge est importante, plus les interactions augmentent. L'augmentation de la charge cationique conduit à une augmentation de l'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif. Toutefois au-delà d'une certaine limite l'augmentation de la charge positive induit au contraire une diminution de l'activité antibactérienne et une augmentation de l'activité hémolytique. Certains PAMs anioniques nécessitent un cofacteur tel que le zinc (65).

### 2.2.1.2. DES PEPTIDES AMPHOTERES

L'ensemble des PAMs ont une structure amphotère/amphiphile c'est à dire qu'ils possèdent à la fois des groupements hydrophiles et hydrophobes qui leur permet d'interagir avec les phospholipides de surface et avec les bicouches lipidiques. Ces interactions permettent l'ancrage ou une pénétration des PAMs (Fig. 8), ce qui peut changer la perméabilité membranaire aux ions et par ce mécanisme permettre la lyse cellulaire. L'augmentation du caractère amphotère peut se faire par l'augmentation du nombre de chaînes aliphatiques, ce qui peut accroître l'activité du peptide sur les membranes anioniques des microorganismes, mais augmenter également les interactions avec les membranes neutres des cellules eucaryotes, avec le risque de rendre un peptide hémolytique (64).

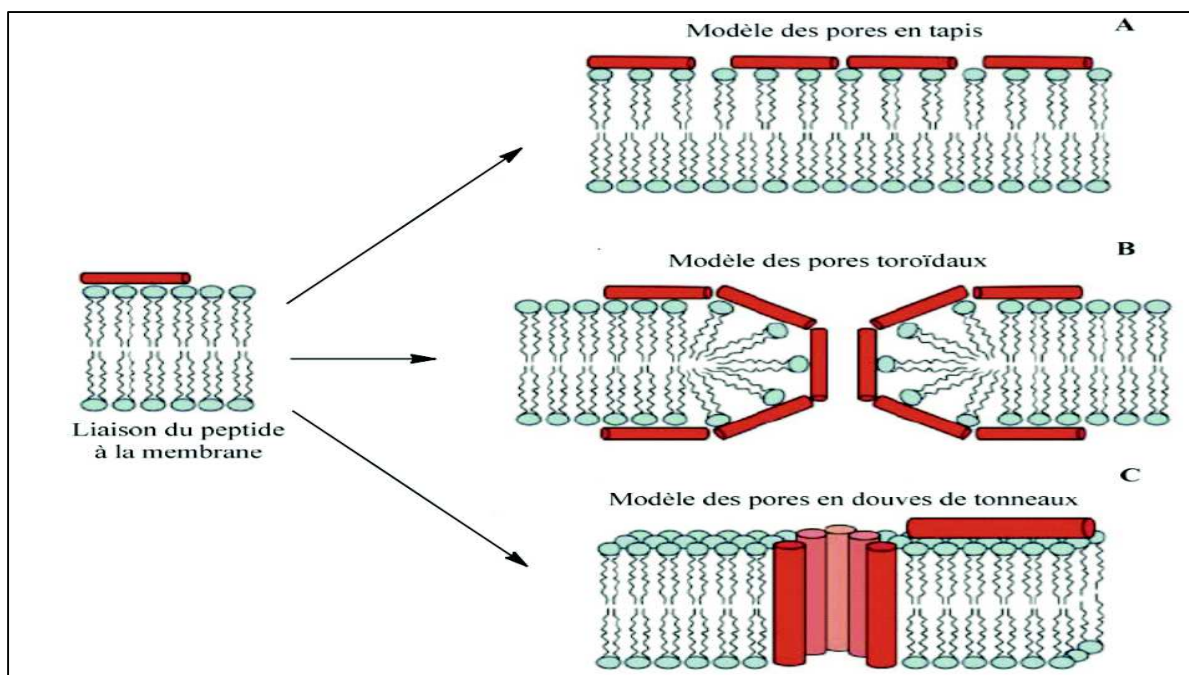


FIGURE 8 : MODELES D'INSERTION DES PAMS DANS LES BICOUCHES LIPIDIQUES (SOURCE SANDERSON 2005)



### 2.2.1.3. LA CONFORMATION DES PEPTIDES

Les PAMs ont souvent une structure désordonnée (74). Lorsque les PAMs se lient à la membrane bactérienne des structures secondaires apparaissent (Fig. 9). Les structures en hélice  $\alpha$  sont fréquemment rencontrées pour les PAMs. Ils vont passer de la forme non structurée à la forme hélicoïdale lorsque les PAMs sont en contact avec la paroi microbienne (75)(76). A l'inverse, les peptides en feuillets  $\beta$ , contenant des ponts disulfures, prennent des conformations beaucoup plus stables, et présentent des domaines hydrophobes et hydrophiles bien distincts et par conséquent une forte capacité d'interaction avec la paroi bactérienne, c'est le cas pour les Défensines (77). Les formes cycliques sont plus rigides que les formes linéaires. Ces conformations rigides cycliques n'étant pas affectées par l'interaction avec la membrane, leur activité peut être liée à une modification de leur structure tertiaire (64). Il a été démontré que des peptides ont la capacité de se lier entre eux, en orientant leur domaine hydrophobe et hydrophile de façon à s'auto-assembler, ce mécanisme a été nommé modèle des pores en tapis ou « carpet-like » (59)(78).

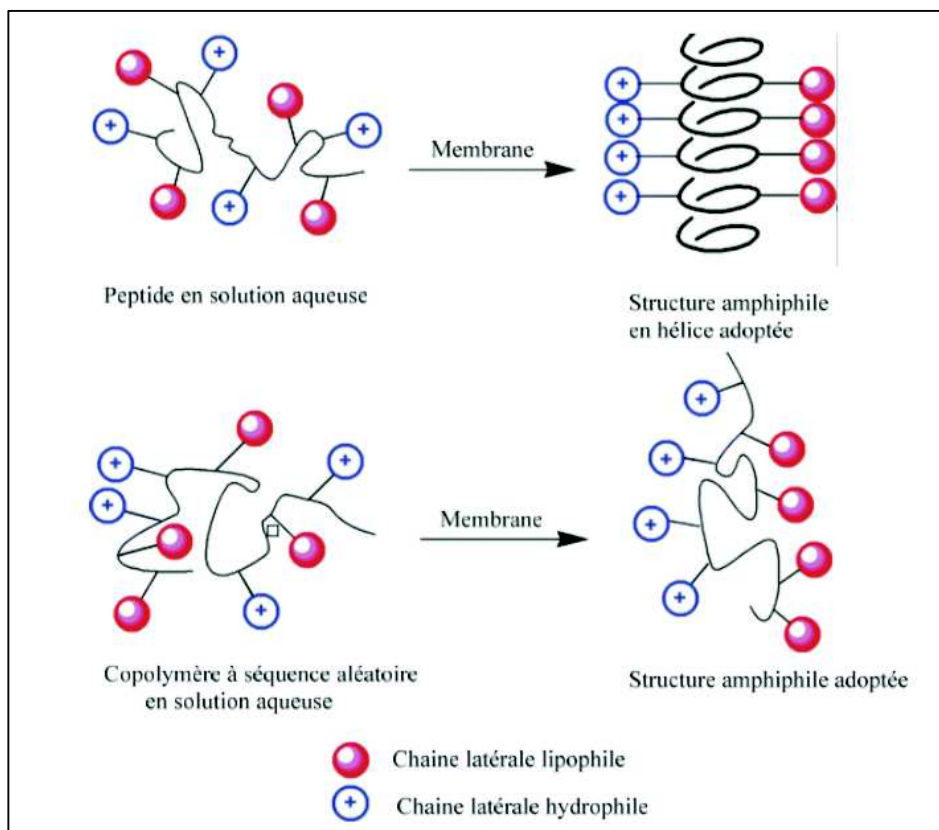


FIGURE 9: CHANGEMENT DE CONFORMATION D'UN PEPTIDE, ET D'UN COPOLYMERE A SEQUENCE ALEATOIRE EN PRESENCE D'UNE MEMBRANE (SOURCE MOWERY 2009)

## 2.4. ACTIVITE BIOLOGIQUE ANTIMICROBIENNE

Les mécanismes d'action antibactérienne des PAMs sont de deux types (76) :

- Les PAMs perméabilisant les membranes : plusieurs mécanismes ont été modélisés, modèles en douves de tonneau, en pores toroïdaux, et en tapis (Fig. 8) (64)
- Les PAMs agissant au niveau intracellulaire

De plus certains PAMs combinent ces deux mécanismes d'action. Concernant les mécanismes d'action antiviraux, de nombreuses hypothèses ont été émises, cependant ils demeurent méconnus. L'aptitude des PAMs à se lier aux membranes est à l'origine de la formation des pores dans les membranes des microorganismes et leur capacité à les traverser afin d'agir au niveau intracellulaire (3) (Fig. 10).

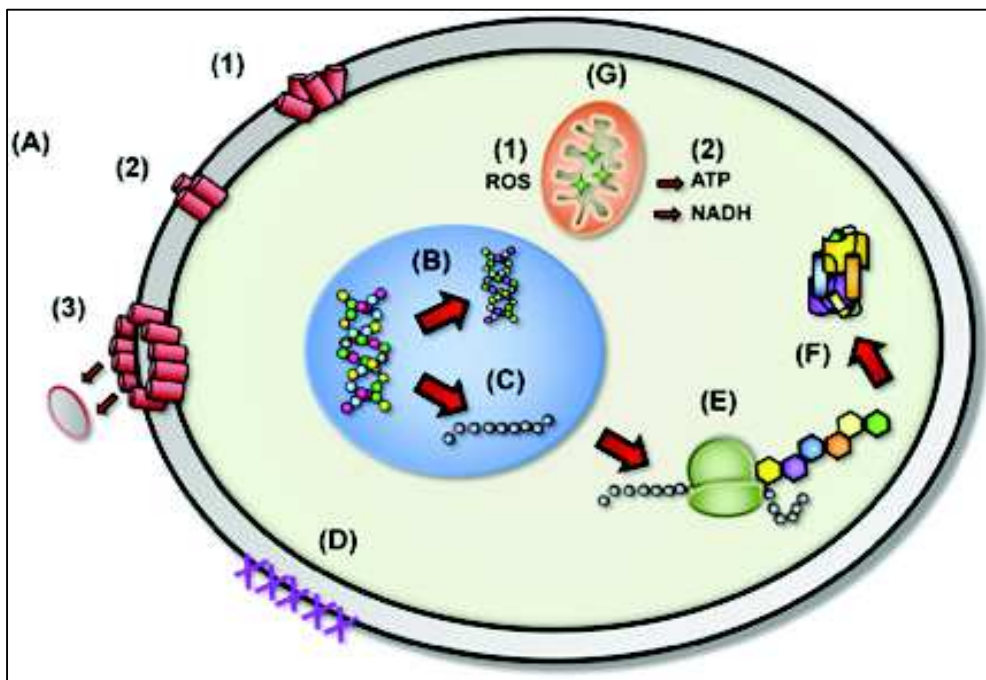


FIGURE 10 : MECANISMES D'ACTION PROPOSES POUR LES PAMS (SOURCE PETERS 2010)

(A) Perméabilisation par une interruption de l'intégrité membranaire : (1) insertion aléatoire dans la membrane, (2) alignement des séquences hydrophobes, (3) formation de pores et éviction de sections membranaires.

(B) Inhibition de la synthèse d'ADN. (C) Blocage de la synthèse d'ARN. (D) Inhibition des enzymes nécessaires à la liaison des protéines membranaires externes. (E) Inhibition des fonctions ribosomales et de synthèse protéique. (F) Blocage des molécules chaperonnes nécessaires au repliement des protéines. (G) Cible mitochondriale : (1) inhibition de la respiration cellulaire et induction de la formation de ROS (2) interruption de l'intégrité membranaire des mitochondries et efflux d'ATP et de NADH

## 2.5. LES RESISTANCES DES MICROORGANISMES AUX PAMs

### 2.5.1 LA RESISTANCE NATURELLE AUX PAMs

Certaines bactéries possèdent des propriétés particulières, leur conférant une résistance innée à certains PAMs en l'absence de contact préalable avec ces derniers. Certains microorganismes ont une composition de la membrane externe qui fournit peu de sites de fixation ou d'interaction avec les PAMs (79)(65)(80).

### 2.5.2. LA RESISTANCE ACQUISE AUX PAMs

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les bactéries pour contrer l'action des PAMs : les changements de structure ou de la perméabilité membranaire. On explique ces phénomènes de résistance acquise aux PAMs par plusieurs mécanismes (80) (81) (82) :

- la modification de la charge nette du peptide ou de la membrane, de la fluidité membranaire, des protéines membranaires
- la production d'enzymes protéolytiques qui dégradent les PAMs
- les mécanismes de résistance efflux-dépendant
- les mécanismes de piégeage du peptide
- la modification des cibles intracellulaires.

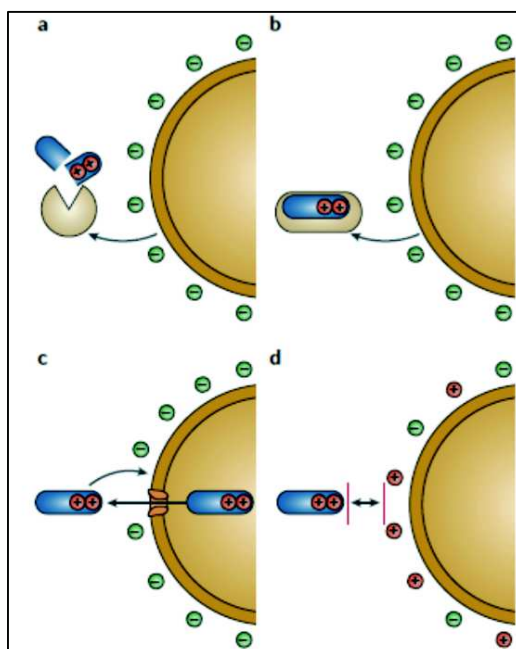


FIGURE 11 : MECANISMES DE RESISTANCE ACQUISE AUX PAMs (SOURCE PESCHEL 2006)

a) La dégradation protéolytique ; b) Les mécanismes de piégeage du peptide ; c) Le transport actif utilisant les pompes à efflux ; d) Les altérations de la charge du peptide ou de la membrane des microorganismes

## 2.6. AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PAMs / HDPs

Actuellement les PAMs sont qualifiés plutôt de peptides de défense de l'hôte HDPs /IDRs, car leur capacités immuno-modulatrices (83) semblent surpasser leur effet cytotoxique direct qui peut être souvent diminué en conditions physiologiques (salinité (84), concentration en glycosaminoglycanes et protéines sériques). Les HDPs modulerait l'immunité et la fonction des cellules immunitaires. Ainsi les HDPs sont des protéines multi-facettes (Fig 18 et 19) avec une variété de fonctions (85)(86)(87):

### **Fonctions d'immuno-modulation directe(88)(89) :**

- Chimiotactisme
- Angiogénique
- Altération du relargage de cytokines et chimiokines
- Altération de l'expression de molécules co-stimulatrices
- Anti-endotoxine
- Altération de la production de ROS et NO (90)
- Activation des leucocytes
- Déclenche la dégranulation mastocytaire

### **Fonctions d'immuno-modulation indirecte :**

- Adjuvants aux mécanismes de vaccination, présentation d'antigène, modulation de l'immunité adaptative (91)(92)
- Accélération de la cicatrisation des lésions (inflammation, recrutement cellulaire, tissu de granulation néoformé (angiogenèse) et tissus de soutiens, contraction de la lésion et réorganisation de la matrice extracellulaire)(93)
- Vecteurs de médicament (protéines capable de pénétrer la cellule CPP) (94)
- Amélioration de la clairance des infections microbiennes, anti-sepsis
- Modulation de l'inflammation, altération sélective de la réponse (pro- et anti-)
- Réponse asymétrique des lymphocytes T auxiliaires
- Altération de la différenciation cellulaire

### **Les effets cytotoxiques directs, agents de défense anti-infectieux (79)**

- Antibactérien, un espoir notamment pour traiter les infections à BMR (95)
- Antiviral (96)
- Antifongique (97)(98)
- Antiparasite (99)(100)
- Anti-cancer (101)(102)

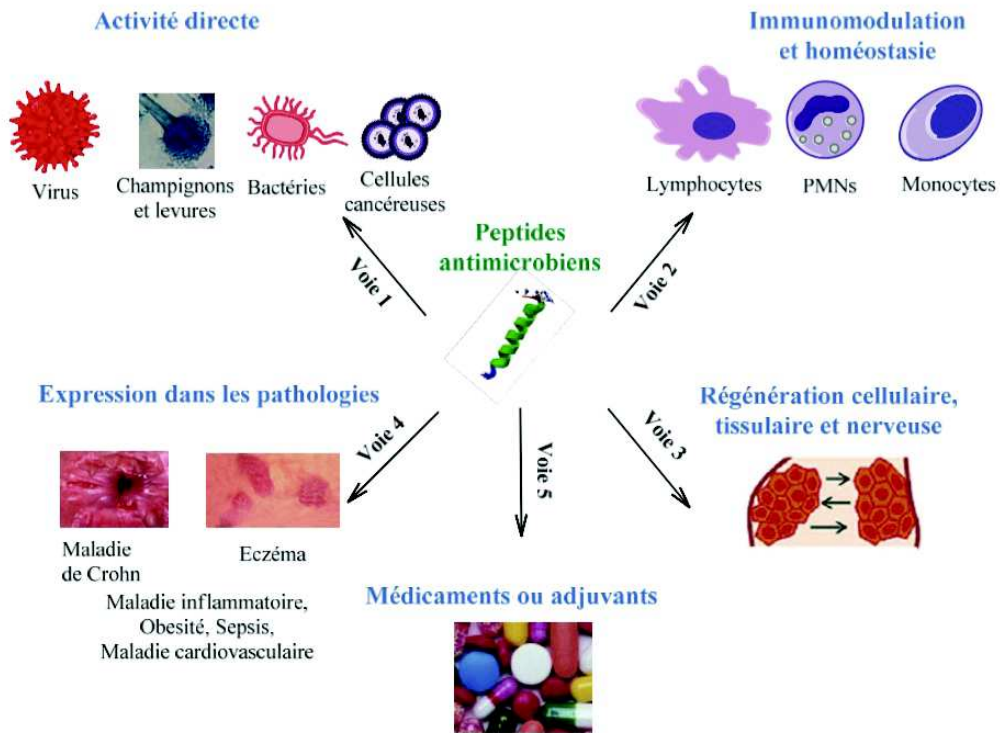


FIGURE 12 : LES PRINCIPALES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HDPS (ATINDEHOU 2012 ADAPTE DE YEUNG 2011)

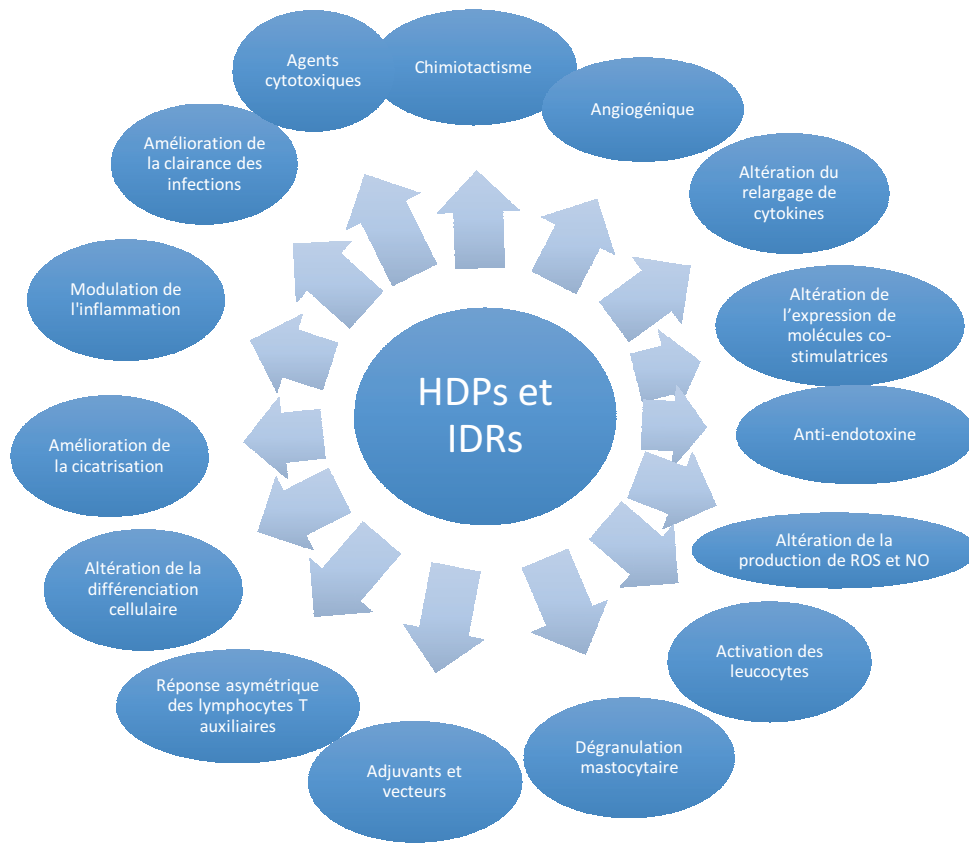


FIGURE 13 : LES FONCTIONS DES HDPS ET IDRS DANS L'IMMUNO-MODULATION (ADAPTE DE HILCHIE 2013)

---

## PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL

### MATERIELS ET METHODES

#### 1 PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

##### 1.1. PEPTIDES SYNTHETIQUES D'AMELOGENINE

Les peptides utilisés dans cette étude ont été synthétisés à l'Institut de génétique et biologie moléculaire et cellulaire, IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964 pour le lot 1 et par Protéogenix pour le lot 2.

##### 1.1.1. PROTOCOLE DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE SELON

##### MERRIFIELD

La synthèse est réalisée du côté C-terminal vers le côté N-terminal, le premier résidu est fixé sur une résine et son groupement amine est protégé par du Fmoc (9Fluorenylmethyloxycarbonyl), la chaîne peptidique est formée par un enchaînement de quatre étapes :

- la libération de l'extrémité -NH<sub>2</sub> de l'acide aminé initial par la pipéridine (beta-élimination de Fmoc)
- l'activation du groupement acide de l'acide aminé suivant par de l'HOBT (hydroxybenzotriazole) et du DIEA (diisopropyléthylamine), l'HOBT se fixe sur la fonction acide et forme un ester actif
- le couplage de l'acide aminé 1 avec l'acide aminé suivant, est réalisé par l'ester de l'acide aminé 1 qui réagit avec la chaîne en cours de synthèse et se fixe à l'acide aminé suivant en relarguant l'HOBT.
- la libération des acides aminés non réactifs pour éviter les synthèses parasites (le capping est réalisé par l'ajout d'anhydride acétique qui provoque la substitution du HOBT par un groupement méthyl).

Lorsque la synthèse du peptide est complète trois étapes finalisent le procédé :

- la déprotection des groupements latéraux et du groupement amine terminal par une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) () et libération du peptide de la résine
- la récupération des peptides par précipitation dans l'éther à froid (-20°C)
- la centrifugation (3X 15 minutes à 3800rpm) le culot est séché pendant une nuit à température ambiante puis repris dans une solution aqueuse TFA 0,1%, ACN 50% (v/v/v) (acétonitrile)
- la lyophilisation des peptides en une poudre, conservée à -20°C pour un stockage de courte durée (inférieure à deux mois) et -80°C en cas de stockage de longue durée, afin de préserver le peptide de toute dégradation et assurer sa stabilité.

## 2. METHODES DE PURIFICATION

La chromatographie représente un vaste ensemble de techniques utilisées afin d'isoler les composants d'un mélange, qu'ils soient sous forme de gaz ou de liquides. Cette séparation a pour but, soit d'isoler les différentes espèces présentes, c'est de la chromatographie analytique, et/ou de les préparer, il s'agit alors de la chromatographie préparative.

### 2.1. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE DE PHASE INVERSE (RP-HPLC)

La chromatographie liquide haute performance de phase inverse (RP-HPLC) : est une méthode de séparation physico-chimique rapide résolutive de type chromatographie de partage.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide injecté à haute pression, c'est la phase mobile, à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire solide de très fine granulométrie. La chromatographie de phase inverse signifie que la phase mobile est significativement plus polaire (hydrophile) que la phase stationnaire, contrairement



à la chromatographie de phase normale où la phase mobile est significativement plus apolaire (hydrophobe). La séparation est basée sur les interactions hydrophiles/hydrophobes entre chaque soluté et la phase stationnaire. Ainsi, plus un soluté est polaire plus il sera rapidement entraîné par la phase mobile polaire et donc élué de la colonne. À l'inverse, plus un soluté est apolaire plus il sera retenu par la phase stationnaire de la colonne et donc élué plus tardivement. Les différents composants du mélange à purifier sont élués du moins hydrophobe au plus hydrophobe donc selon leur polarité par un gradient d'éluant. L'éluion est suivie grâce à une mesure de l'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda$  choisie en fonction de l'échantillon. On observe des pics lorsqu'un composant a été élué de la colonne. Pour les protéines on utilisera  $\lambda=280$  nm (domaine d'absorption des noyaux aromatiques des acides aminés Y, F, W) et pour les peptides  $\lambda=214$  nm (domaine d'absorption de la liaison peptidique).

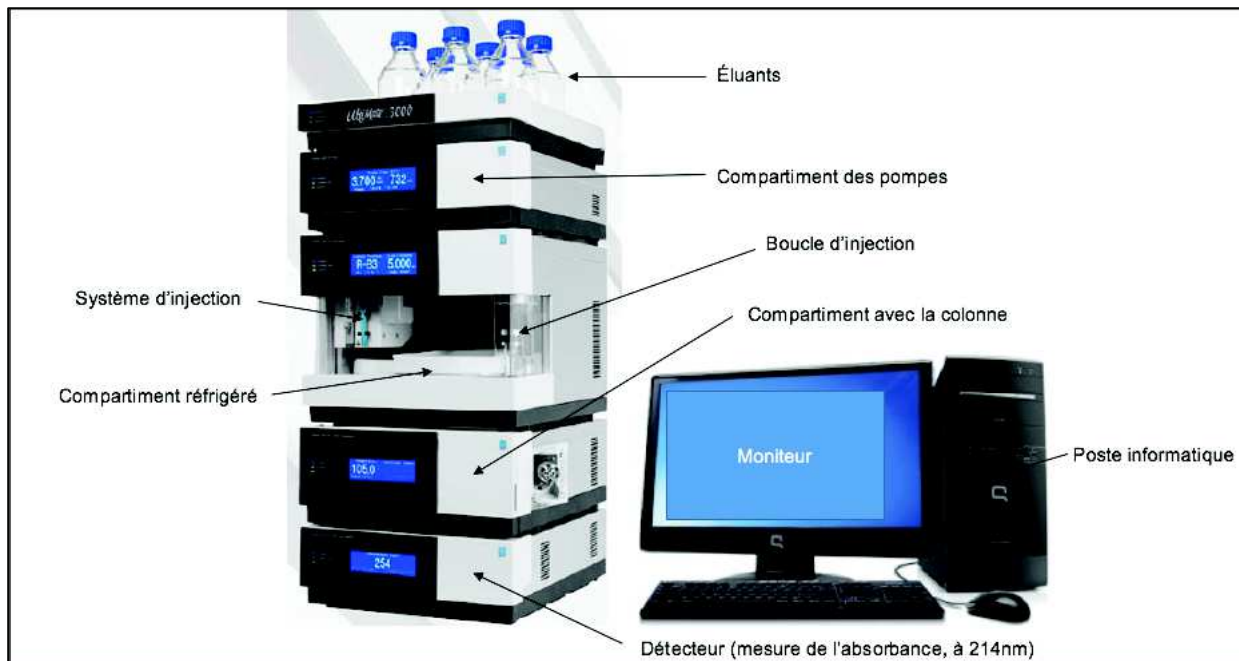


FIGURE 14: ILLUSTRATION RP NANO-HPLC ULTIMATE 3000 DIONEX (SOURCE PERSONNELLE)



### 2.2.1. PROTOCOLE : RP-HPLC APPLIQUE AUX PEPTIDES

L'appareil utilisé est une Nano-HPLC, modèle Ultimate 3000 (marque Dionex), avec une colonne (C18 Vydac 218 TP, 4,6 x 250 nm ; taille des particules 3-20 micromètres, taille des pores 300 Angstrom) (Fig. 21). La phase mobile, est un gradient de mélange d'une solution A aqueuse TFA 0,1%, H<sub>2</sub>O 99.99% (v/v) et d'une solution B organique, ACN 70%, TFA 0,09%, H<sub>2</sub>O 29.91% (v/v/v) qui varie en fonction du temps. La phase stationnaire correspond à des grains de silice auxquels ont été greffés des chaînes de 18 atomes de carbone (octadécylsilyl). Ce sont ces chaînes qui confèrent une hydrophobicité relative aux grains de silice. L'appareil injecte 100 µL de l'échantillon dilué puis élue la colonne avec 100% de la solution tampon A pendant 7 min, puis réalise le mélange des solutions A et B avec un gradient croissant, jusqu'à atteindre 100% de la solution B à 47 min. Après 10 min de lavage avec 100% de la solution B, la colonne est régénérée pour une prochaine chromatographie par le passage de 100% de la solution A pendant 10 min. On enregistre l'absorbance à 214 nm, longueur d'onde d'absorption des liaisons peptidiques. On observe des pics correspondants aux différentes formes des peptides présents dans le mélange analysé.

Les échantillons à analyser et purifier sont deux peptides synthétiques dérivés de l'Amélogénine humaine (M28D, et S11D), que l'on a préalablement pesé avec une balance de précision pour obtenir 1 mg de chacun. Les échantillons sont dissous dans 1 mL d'eau Milli-Q. On obtient ainsi deux solutions M28D et S11D à 1 mg/mL. Chaque échantillon a ensuite été dilué, en prélevant 15 µL de solution M28D puis de S11D + 85 µL de la solution A (eau purifiée 99,9% + TFA 0,1%). Par la suite on a réalisé cette même expérience mais en utilisant 100 µL des solutions à 1 mg/mL pour obtenir une plus grande quantité de matériel.

### 3. METHODES DE CARACTERISATION STRUCTURALE DES PEPTIDES

#### 3.1. LE SEQUENÇAGE AUTOMATIQUE

Le but des techniques de séquençage est de déterminer la séquence polypeptidique, afin de connaître le nombre de chaînes, l'ordre et la nature chimique des résidus d'acides aminés. La séquence d'une protéine ou d'un peptide correspond à sa structure primaire. Le séquençage automatique permet aussi déterminer la pureté d'un échantillon à partir d'une quantité donnée d'un peptide.

La réaction d'Edman est une méthode récurrente d'identification des résidus présents dans la séquence, commençant par l'extrémité N-terminale et utilisant du phénylthiocyanate PITC. Le séquenceur utilisé est un Procise Protein Sequencer (Applied Biosystems) associé avec un détecteur UV (Perkin Elmer modèle séries 2000) et à un programmateur de gradient composé de 2 pompes pour HPLC (140 C Microgradient system de Applied Biosystems) piloté par les logiciels Procise 2.1 et Sequence pro 2.1 pour l'exploitation des résultats.

##### 4.1.1. PROTOCOLE : SEQUENÇAGE AUTOMATIQUE

Les peptides sont mis en solution aqueuse de TFA 0,1%, on dépose 10 pmoles sur un filtre en fibre de verre traité préalablement au Biobrène (Biobrène plus Applied Biosystem 473A). Les différentes étapes sont réalisées automatiquement, les réactifs et solvants sont pulsés par un gaz vecteur, l'Argon.

- L'étape de couplage :

Le PITC réagit avec l'acide aminé N-terminal de la séquence en présence de N-méthyl pipéridine pour former un phénylthiocarbamyl-amino acide (PTC-aa) à pH 8 et 45°C. Le pH basique permet de capter un proton du groupement amine et favoriser l'interaction avec le PITC.

- L'étape de clivage :

Le clivage a lieu en milieu acide en présence de TFA anhydre à 45°C qui attaque le PTC-aa du côté N-terminal et provoque la rupture de la liaison peptidique ce qui entraîne sa cyclisation en un anilinothiozolino-aa (ATZ-aa). L'ATZ-aa est alors clivé du reste du peptide par le chlorure de butyl et produit le peptide n-1.

- L'étape de conversion :

L'ATZ-aa instable est transformé en phénylthiohydantoïne-amino acide (PTH-aa) plus stable grâce à une solution aqueuse TFA 25% (v/v) à 65°C. Le PTH-aa est séché et resuspendu en solution aqueuse ACN 20% (v/v). Ce PTH-aa est alors injecté sur une colonne RP-HPLC, détection à  $\lambda=269$  nm. L'élution des PTH-aa est obtenue par élution par les solutions aqueuses A (tétrahydrofurane 3,5%, Premix 2% (v/v/v)) et B (ACN 88% propanol 12% (v/v/v)) (Fig. 22).

- L'étape de chromatographie inverse :

Un chromatogramme est réalisé pour chaque PTH-aa (un cycle de ces trois étapes) et le temps d'élution comparé au chromatogramme des PTH-aa standard permet de déterminer un acide aminé donné. En comparant les chromatogrammes des cycles successifs on peut déterminer n premier acides aminés N-terminaux de la séquence à analyser.

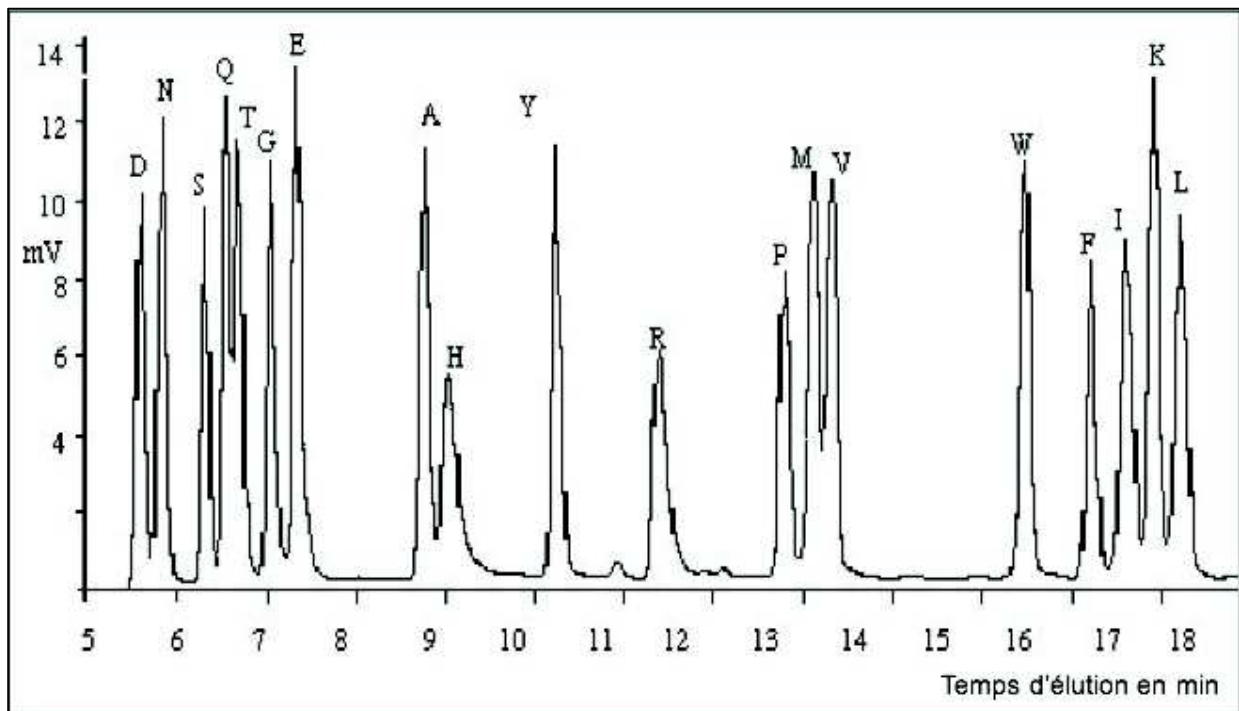


FIGURE 15: TEMPS D'ELUTION DES PTH-AAS STANDARDS (SOURCE PERSONNELLE)

### 3.2. LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse (Mass Spectrometry MS) est une technique physique d'analyse, qui a pour but de détecter et identifier des molécules grâce à la mesure de leur masse. La SM peut ainsi déterminer la signature élémentaire ou isotopique d'un échantillon et caractériser une structure chimique. Cette technique est utile dans quasiment tous les domaines scientifiques ; physique, astrophysique, chimie, chimie organique, dosages, biologie, médecine.

#### 3.2.1. PRINCIPE DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La SM va séparer physiquement des molécules chargées par ionisation en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/q$ ) ou masse/valence ( $m/z$ ).

#### 3.2.2. DESCRIPTION D'UN SPECTROMETRE DE MASSE

Le spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation qui produit des ions en phase gazeuse, d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ), d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique qui réalise le traitement du signal obtenu. Le résultat est un spectre de masse représentant les rapports  $m/z$ , où  $m$  est la masse et  $z$  la valence (ou  $m/q$ ,  $q$  est la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées. Le spectromètre de masse comporte quatre parties élémentaires.

(1) Le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque) ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse, chromatographie capillaire).

(2) La source d'ionisation : consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour l'étude des ions positifs, soit en mode négatif pour l'étude des ions négatifs. La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

(3) L'analyseur : sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge.

## 4. METHODES DE CARACTERISATION BIOLOGIQUES DES PEPTIDES ACTIFS

### 4.1. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

#### 4.1.1 PRECULTURE

La préculture est la mise en culture de microorganismes afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance, étape préalable et nécessaire à la réalisation de tests antimicrobiens. Une préculture de la souche que l'on souhaite tester est réalisée en prélevant une colonie que l'on met dans 5 ml d'un bouillon de culture adapté au microorganisme sous agitation à 37°C pendant 18 h dans un incubateur (de type Falcon, Becton Dickinson). Un milieu de culture adapté au microorganisme est utilisé pour multiplier des cellules de bactéries, levures ou mycètes afin de les étudier.

Culture et préculture bactérienne :

- Bouillon de culture MH (Mueller Hinton broth, Merck, Darmstadt, Germany) : utilisé pour *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*
- Bouillon de culture Sabouraud : utilisé pour les levures et champignons, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*
- Bouillon de culture BHI (brain heart infusion) : utilisé pour les bactéries anaérobies comme *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia*

#### 4.1.2. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

- Préparation de la solution de peptide à tester

Le peptide est pesé à l'aide d'une balance de précision, une solution mère pour chaque peptide synthétique est préparée à 1 mM. Cette solution mère est diluée à différentes concentrations pour les tests antimicrobiens sur plaque de 96 puits (Falcon).

- Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)

La CMI est la plus petite concentration de peptide pour laquelle il n'y a pas de croissance détectable de bactéries. Une gamme de concentration décroissante allant de 100 µM à 10 µM est utilisée. La détection des bactéries est réalisée par lecture de la densité optique (DO) à 620 nm.

#### 4.1.3. PROTOCOLE : TESTS ANTIBACTERIENS

Le test antibactérien est réalisé grâce à une suspension de microorganismes dont la densité optique à 620 nm est  $DO = 0,001$ . Dans chaque puits on dépose 90  $\mu\text{L}$  de cette suspension et 10  $\mu\text{L}$  de la solution de peptide à tester 10 fois concentré. Le contrôle positif de culture correspond à 90  $\mu\text{l}$  de suspension et 10  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q, un contrôle négatif correspond à 90  $\mu\text{l}$  de suspension et 10  $\mu\text{L}$  d'un cocktails d'antibiotiques T+C (tétracycline+céfotaxime) efficaces concentré 10 fois. Le contrôle du milieu comportera 90  $\mu\text{l}$  de milieu stérile approprié sans microorganisme et 10  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q.

Chaque concentration de peptide est testée en triplicata. Les plaques de 96 puits sont enveloppées de parafilm, puis mises sous agitation à 37°C pendant 18 h dans un incubateur.

Les précultures et tests antibactériens avec des bactéries anaérobies sont placés dans une boîte hermétique dont l'atmosphère est contrôlée par un réactif (Anaerogen 2,5L, Atmosphere Generation Systems) qui élimine l'oxygène.

#### 4.1.4. PROTOCOLE : TESTS ANTIFONGIQUES

Le test antifongique est réalisé en présence d'une suspension de levures ou champignons, dont la densité optique à 620nm est  $DO = 0,001$ . On dépose 90  $\mu\text{L}$  de cette suspension et 10  $\mu\text{L}$  de la solution de peptide à tester 10 fois concentré dans le puits. Le contrôle positif de culture correspond à 90  $\mu\text{l}$  de suspension et 10  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q, un contrôle négatif correspond à 90  $\mu\text{l}$  de suspension et 10  $\mu\text{L}$  d'un d'antifongique efficace (Voriconazole 10 fois la MIC). concentré 10 fois et le contrôle du milieu comportera 90  $\mu\text{l}$  de milieu stérile sans microorganisme et 10  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q.

Chaque concentration de peptide est testée est réalisé en triplicata. Les plaques 96 puits sont enveloppées de para-film, puis mises sous agitation à 41°C pendant 18h dans un incubateur étuve fermé dédié à la culture des champignons.

### 5.1.5. ÉTUDE DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES COMBINAISONS PEPTIDE-ANTIBIOTIQUE

Les tests de synergie sont l'étude de la cinématique du couple peptide-antibiotique afin de déterminer s'il y a une amélioration du pouvoir antimicrobien lorsque l'on utilise le quart de la CMI du peptide et le quart de la CMI de l'antibiotique. Le but de ce test est de déterminer si le M28D étudié dans ce travail permet de diminuer les doses d'antibiotiques pour prévenir les résistances et réduire les effets secondaires indésirables des antibiotiques. L'effet de la combinaison du peptide et de l'antibiotique est déterminé par le calcul de l'indice CFI (concentration fractionnaire inhibitrice). C'est le rapport des concentrations inhibitrices obtenues pour un antibiotique lors de la combinaison avec un autre antibiotique (peptide dans notre cas) à la CMI du microorganisme à l'antibiotique pris séparément.

En notant l'antibiotique A et le peptide P, nous pouvons écrire:				
$CFI_A = \frac{CMI_A \text{ en présence de } P}{CMI_A} \quad CFI_P = \frac{CMI_P \text{ en présence de } A}{CMI_P}$				
Effet	Synergie	Additive	Indifférent	Antagonisme
Indice CFI	$\leq 0.5$	$0,5 < CFI < 1$	$1 < CFI < 2$	$\geq 2$

FIGURE 16 : CORRELATION INDICE CFI ET EFFET (SOURCE PERSONNELLE)

Effet synergique : si l'effet de la combinaison est supérieur à la somme des effets de chaque constituant.

Effet additif : si l'effet de la combinaison est égal à la somme des effets de chacun des constituants.

Effet indifférent : si l'effet de la combinaison peptide-antibiotique est égal à l'effet du plus actif des composés

Effet antagonisme : si l'effet de la combinaison est plus faible que l'effet du constituant le plus actif de la combinaison.

## 5. METHODES INFORMATIQUES

Des outils informatiques permettent de calculer et prédire une structure ou conformation selon la séquence en acides aminés sur le portail EXPASY (<http://expasy.org>). Les séquences protéiques et leurs points de clivage ont été cherchés dans la banque de données UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>).

- Détermination du Poids Moléculaire, PM en Da (<http://expasy.org/protparam/>) et. ([http://expasy.org/peptide mass](http://expasy.org/peptide_mass))
- Détermination de la conformation par prédiction de structure secondaire ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html))
- Détermination de la capacité à adopter une conformation en hélice amphipatique (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>)



## LES RESULTATS EXPERIMENTAUX

### 1 INTRODUCTION : LES RESULTATS PRELIMINAIRES A L'ETUDE

Une série d'expériences préliminaires a été réalisée dans notre laboratoire de recherche en 2013 par Marin Vincent, dans le cadre de son travail de mémoire du master M2 d'Ingénierie de la Santé et Sciences du Médicament de l'Université de Lorraine. Ces tests antimicrobiens portent sur deux peptides endogènes de l'Amélogénine humaine localisés dans le domaine C-terminal : M28D (MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKREEVD) et S11D (STD KTKREEVD), Ils ont été testés contre des bactéries Gram-positif (*Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*), des levures (*Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis*) et un champignon filamenteux (*Aspergillus fumigatus*). Les peptides utilisés dans cette étude préliminaire, M28D et S11D ont été synthétisés à l'Institut de génétique et biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964 Illkirch-Graffenstaden, FRANCE) et seront nommés les lots 1.

Microorganismes	Concentration du Peptide (µM)			
	M28D			S11D
	115	230	460	460
<i>M. luteus</i>	71	83	98	66
<i>S. aureus</i>	NT	48	NT	NT
<i>A. fumigatus</i>	NT	95	NT	NT
<i>C. albicans</i>	NT	65	NT	NT
<i>C. glabrata</i>	NT	55	NT	NT
<i>C. tropicalis</i>	NT	48	NT	NT
	<b>Inhibition de la croissance (%)</b>			

TABLEAU 3 : POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE MICROORGANISMES PAR M28D ET S11D LOTS 1

NT non testé\_(Marin Vincent, Master 2013)

Ces résultats (Tableau 3) indiquent une inhibition de la croissance des microorganismes de 80 à 100% à partir de 230 µM de M28D pour *Micrococcus luteus* et *Aspergillus fumigatus*. Une inhibition plus faible à 230 µM de M28D pour *Staphylococcus aureus* (48 %), et plusieurs espèces de *Candida* (*Candida albicans* 65%, *Candida glabrata* 55%, *Candida tropicalis* 48%) a été caractérisée.

Une nouvelle commande de peptide M28D synthétisé par Protéogenix (Schiltigheim, FRANCE) que l'on nommera le lot 2 a été utilisée pour les expériences suivantes.

Ces premiers résultats nous ont incités à continuer l'analyse des activités antimicrobiennes de M28D en élargissant le choix des souches microbiennes testées à des souches de la cavité orale connues comme pathogènes dans les pulpopathies, parodontopathies et d'autres infections. Il s'agit de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia*.

Une analyse au séquenceur a permis de calculer une pureté à 46% pour le lot 1 et 60% pour lot 2 des peptides M28D et 50% des peptides S11D, ce qui nous a permis de calculer la molarité de nos solutions à tester.

## 2 NOUVEAUX TESTS ANTIMICROBIENS

### 2.1. EXPERIENCE AVEC M28D LOT 1

Dans un premier temps j'ai cherché à reproduire les résultats préliminaires afin de confirmer le potentiel des propriétés antimicrobiennes du M28D lot 1 sur *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Ensuite j'ai examiné les effets de M28D sur la croissance de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia*. Les résultats ont été réunis dans des tableaux ci-après.

Microorganismes	Concentration du Peptide M28D <u>lot 1</u> (µM)								
	540	405	270	200	135	100	67,5	50	33,75
<i>M. luteus</i>	NT	98	94	NT	34	NT	0	NT	0
<i>S. aureus</i>	NT	30	13	NT	0	NT	0		0
<i>P. gingivalis</i>	40	35	27	0	0	0	0	0	0
<i>F. nucleatum</i>	70	50	10	0	0	0	0	0	0
<i>P. micra</i>	70	10	0	0	NT	0	0	0	0
<i>P. intermedia</i>	70	10	5	0	NT	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	NT	10	10	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>A. fumigatus</i>	NT	20	15	NT	0	NT	NT	NT	NT
	<b>Inhibition de la croissance (%)</b>								

TABLEAU 4: NOUVEAUX TESTS ANTIMICROBIENS AVEC M28D (LOT 1),

NT NON TESTE

Les tests que nous avons réalisés sur *Micrococcus luteus* ont montré une inhibition >90% pour le lot 1 de M28D à 270 µM et 405 µM, et plus faible 34% à 135 µM. Les tests sur *Staphylococcus aureus* ont montré avec le lot 1 une inhibition de 30% à partir de 405 µM et non significative à 270 µM. Les tests sur *Candida albicans* n'ont pas pu établir une inhibition significative. Une inhibition de la croissance a pu être caractérisée à 540 µM de M28D pour le lot 1, de 40% pour *Porphyromonas gingivalis*, de 70% pour *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia* (Tableau 4).

J'ai confirmé l'effet d'inhibition du M28D lot 1 sur la croissance de *Micrococcus luteus*. Cependant l'inhibition sur *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, et *Aspergillus fumigatus* n'a pu être reproduite aux mêmes concentrations par rapport au résultats préliminaires (Tableau 3). *Staphylococcus aureus* a nécessité une concentration plus élevée en M28D lot 1 dans ces nouveaux tests et une inhibition moindre à été déterminée.

## 2.2. EXPERIENCE AVEC M28D LOT 2

Le peptide M28D lot 2 synthétisé par Protéogenix (Schiltigheim, FRANCE), a été testé sur *Micrococcus luteus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia*. Je me suis limité à ces microorganismes ayant montré une sensibilité à des concentrations élevées de M28D lot 1.

Microorganismes	Concentration du Peptide M28D <u>lot 2</u> (µM)							
	240	200	180	150	100	90	60	50
<i>M. luteus</i>	100	NT	85	63	NT	30	20	NT
<i>P. gingivalis</i>	NT	0	NT	NT	0	NT	NT	0
<i>F. nucleatum</i>	NT	0	NT	NT	0	NT	NT	0
<i>P. micra</i>	NT	0	NT	NT	0	NT	NT	0
<i>P. intermedia</i>	NT	0	NT	NT	0	NT	NT	0
0	Inhibition de la croissance (%)							

TABLEAU 5 : NOUVEAUX TESTS ANTIMICROBIENS AVEC M28D (LOT 2)

NT non testé

Les tests avec le lot 2 de M28D ont montré une inhibition de 85% à partir de 180 µM sur *Micrococcus luteus* (Tableau 5).

Le lot 2 été testé à 50, 100 et 200 µM de M28D lot 2, nous nous sommes limités à ces concentrations car au-delà il y a des risques de cytotoxicité pour les cellules eucaryotes, et un coût élevé en peptide. Nous avons testé des espèces buccales connues comme pathogènes (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia*) mais aucune inhibition n'a pu être établie à des concentrations pertinentes (<200µM).

### 2.3. EXPERIENCE AVEC S11D LOT 1

Des nouveaux tests antimicrobiens ont été effectués avec S11D lot 1 synthétisé à l'IGBMC (CNRS UMR 7104 - Inserm U 964 Illkirch-Graffenstaden, FRANCE)

	Concentration du Peptide S11D <u>lot 1</u> (µM)			
Microorganismes	405	270	135	67,5
<i>M. luteus</i>	13	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0
	Inhibition de la croissance (%)			

TABLEAU 6 : NOUVEAUX TESTS ANTIMICROBIENS AVEC S11D (LOT 1)

Une inhibition de la croissance de *Micrococcus luteus* peu significative (13%) est évaluée à 405 µM de S11D lot 1. De plus, à des concentrations inférieures le peptide S11D n'a montré aucune inhibition de *Micrococcus luteus*. Les tests de S11D lot 1 sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, se sont révélés négatifs et aucune inhibition n'a été constatée.

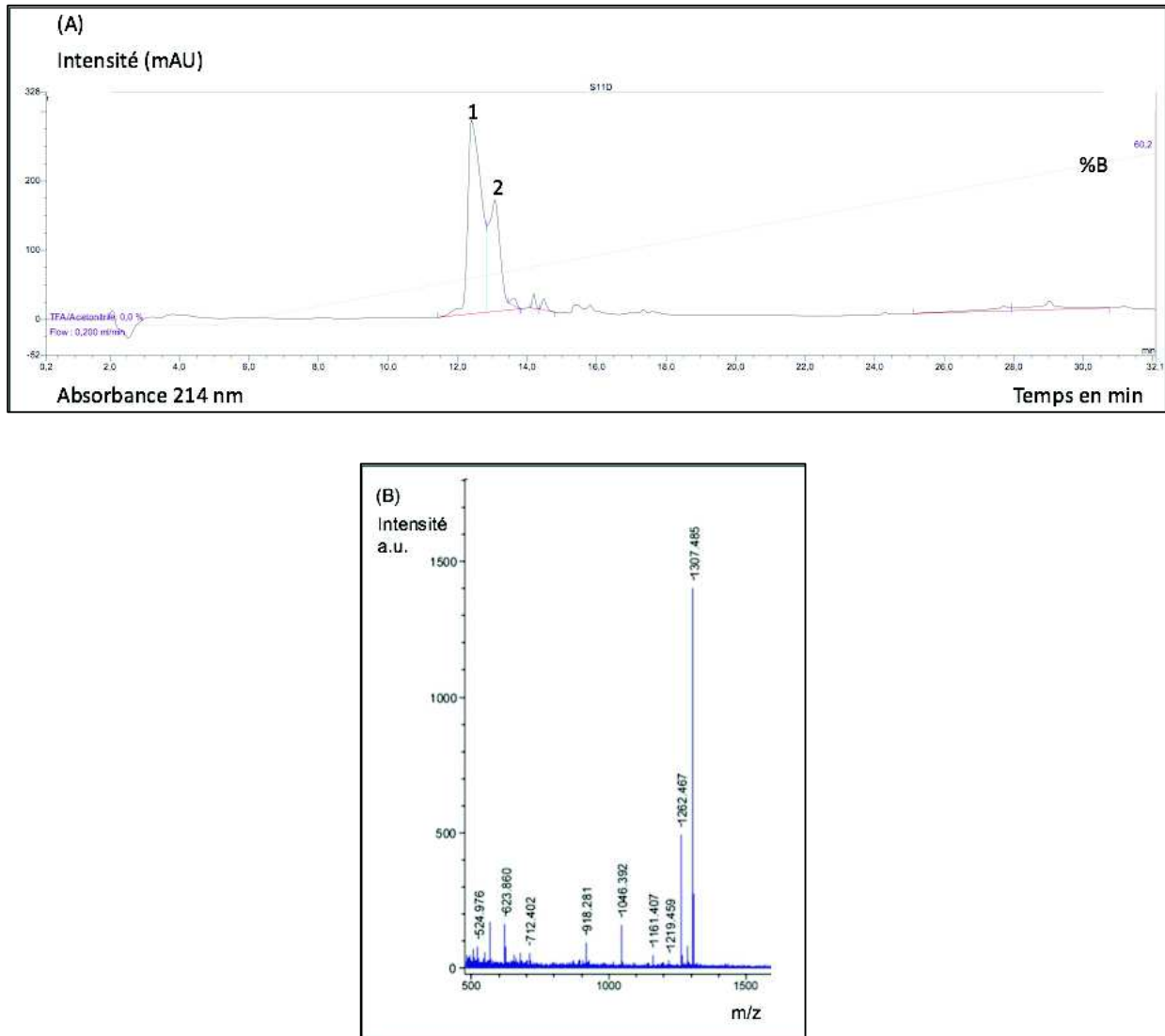
En conclusion, nous n'avons pas obtenu d'inhibition significative de la croissance microbienne pour M28D (lots 1 et 2) pour les nouvelles souches microbiennes à des concentrations pertinentes pour un usage clinique. Seul *Micrococcus luteus* s'est montré sensible au M28D (lots 1 et 2), avec une inhibition de 20% à partir de 60 µM de M28D lot 2. Les tests antimicrobiens avec S11D lot 1 n'ont montré aucune inhibition sur *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* à des concentrations pertinentes. Ces résultats nous ont incité à vérifier l'intégrité des peptides.

### 3 CONTROLE ANALYTIQUE DES PEPTIDES M28D ET S11D

Le contrôle de l'intégrité des peptides M28D et S11D lots 1, à été réalisé par chromatographie liquide haute performance de phase inverse HPLC-RP à 214 nm suivant les conditions expérimentales décrites dans la partie Matériels et Méthodes. J'ai introduit 100 µL d'une solution aqueuse TFA 0,1% à 1 mg/mL de peptide. Les différents pics ont été collectés toutes les minutes de 12 à 36 min pour une analyse de spectrométrie de masse par la technique MALDI-TOF.

### 3.1. CAS DE S11D LOT 1

L'analyse de l'intégrité du peptide S11D lot 1 est basée sur le chromatogramme suivant et un spectre de masse des pics collectés (Fig. 24)



**FIGURE 17 : FIGURE ANALYSE DE L'INTEGRITE DU PEPTIDE S11D LOT 1**

- (A) S11D par HPLC-RP (colonne C18 Vydac 218 TP, 4,6 x 250 nm ; taille des particules 3-20 micromètres, taille des pores 300 Angstrom). Axe des ordonnées : Absorption à 214 nm ; Axes des abscisses : temps en minutes, (---) gradient d'éluion : pourcentage de la solution B
- (B) Analyse MALDI-TOF des pics de S11D ; a.u. (arbitrary unit)

Le poids moléculaire (PM) théorique attendu pour le peptide S11D est de 1307,38 Da, nous avons mesuré un PM expérimental de 1307,485 Da, le peptide S11D (STDKTKREEVD) est donc majoritairement intègre et correspond au pic 1 du chromatogramme (Fig. (B)). Le pic 2 correspond à un mélange de S11D intègre à 70%

en intensité, et des formes dégradées dont un peptide avec un PM de 1262,457 Da que nous n'avons pas réussi à identifier et représente 20% du pic en intensité.

### 3.2. CAS DE M28D LOT 1

L'analyse du M28D lot 1 est basée sur le chromatogramme suivant et un spectre de masses pour le pic majoritaire d'une intensité de 400 mAU (Fig. 25 (A)).

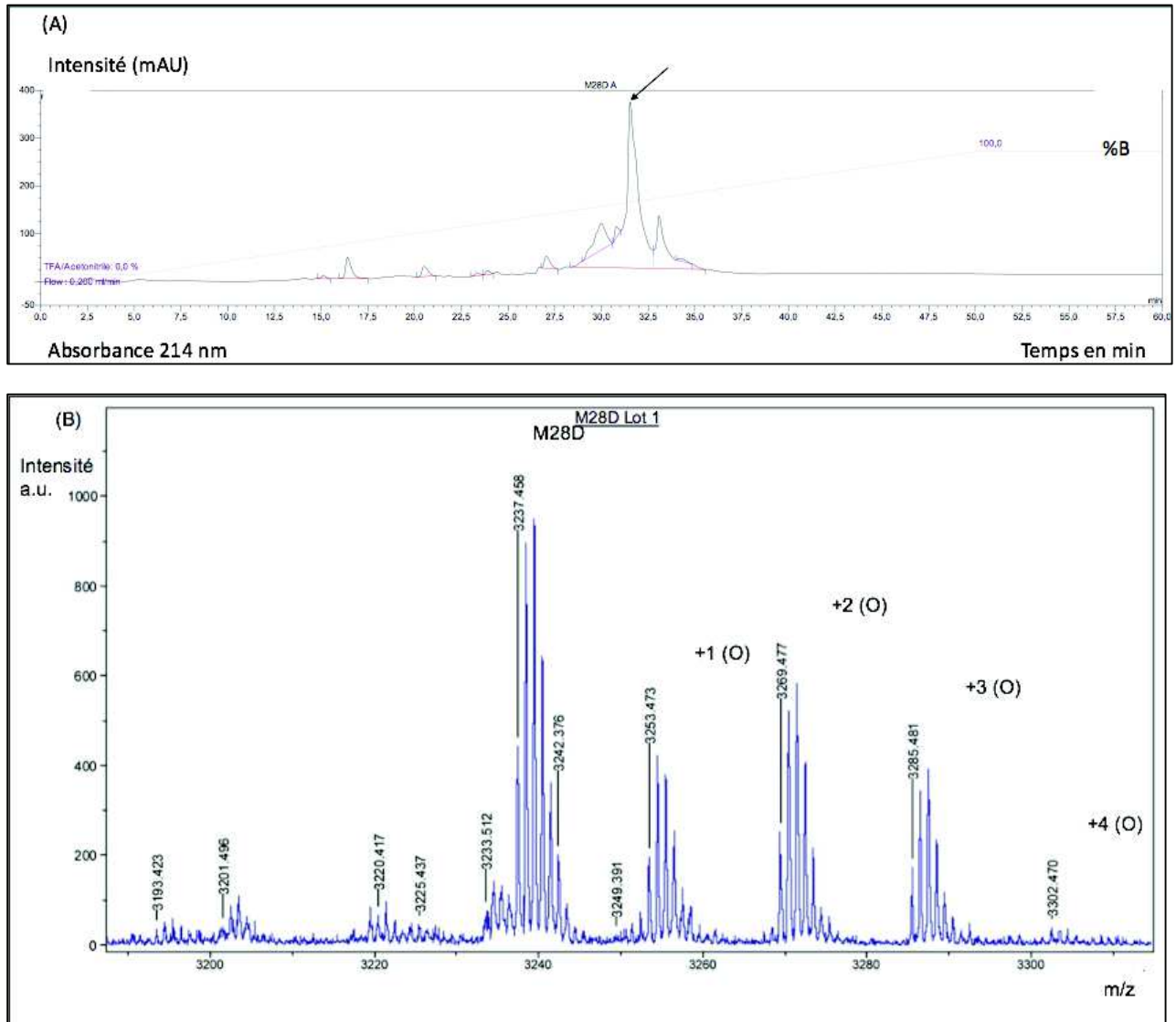


FIGURE 18 : FIGURE ANALYSE DE L'INTEGRITE DU PEPTIDE M28D LOT 1

(A) HPLC-RP colonne (C18 Vydac 218 TP, 4,6 x 250 nm ; taille des particules 3-20 micromètres, taille des pores 300 Angstrom), Axe des ordonnées : Absorption à 214 nm ; Axes des abscisses : temps en minutes, (---) gradient d'éluion : pourcentage de la solution B

(B) Analyse MALDI-TOF M28D du pic majoritaire. a.u. (arbitrary unit)

On retrouve le peptide M28D intègre correspondant au pic majoritaire, indiqué par une flèche (Fig. 25 (A)) car le PM attendu du M28D =3238,72 Da est sensiblement identique au PM mesuré 3237,58 Da élué à 29,9 min, ainsi que des formes oxydées, jusqu'à quatre oxydations. Les trois premières oxydations se produisent sur M1, M7 et W16 (+1 (o) 3253,473 Da, +2 (o) 3269,477 Da, +3 (o)3285,481 Da) et la quatrième oxydation possible est minoritaire (+4 (o) 3302,470 Da) et correspondrait à une fonction sulfoxyde sur un résidu M ou W.

En conclusion, S11D est majoritairement pur, M28D est majoritairement pur mais oxydé. L'état d'oxydation pourrait jouer un rôle dans l'activité biologique. Ces oxydations peuvent également induire une difficulté de solubilisation totale pour nos expériences, ce qui peut empêcher le peptide d'interagir avec les membranes. Un autre problème pourrait être que les peptides captent de l'eau pendant leur stockage. Cela provoquerai une mauvaise corrélation entre la pesée et la quantité réelle de peptides. Cependant, nous avons respecté les conditions d'usage ; les échantillons ont été stockés sous forme lyophilisé dans un flacon à l'abri de l'humidité et de la lumière ou toute source de chaleur excessive.



#### 4. ETUDE RELATION STRUCTURE FONCTION

Afin d'expliquer les données que j'ai recueillies, j'ai analysé les caractéristiques des peptides S11D et M28D. La plupart des PAMs sont cationiques et structurés en hélice- $\alpha$ -amphipatique. Cependant il existe des PAMs anioniques et des PAMs structurés en feuillets- $\beta$ . Les caractéristiques structurales importantes pour un peptide antimicrobien sont donc de présenter une **structure primaire cationique et amphipatique** qui permet l'interaction électrostatique avec les phospholipides la membrane microbienne et la pénétration dans la bicouche lipidique. Une **structure secondaire qui adopte généralement une conformation en hélice** en présence de membranes biologiques. Enfin une **longueur supérieure à 18 résidus** permet au peptide de traverser entièrement la bicouche lipidique, des **peptides plus courts capables de s'assembler** peuvent arriver à cette taille critique

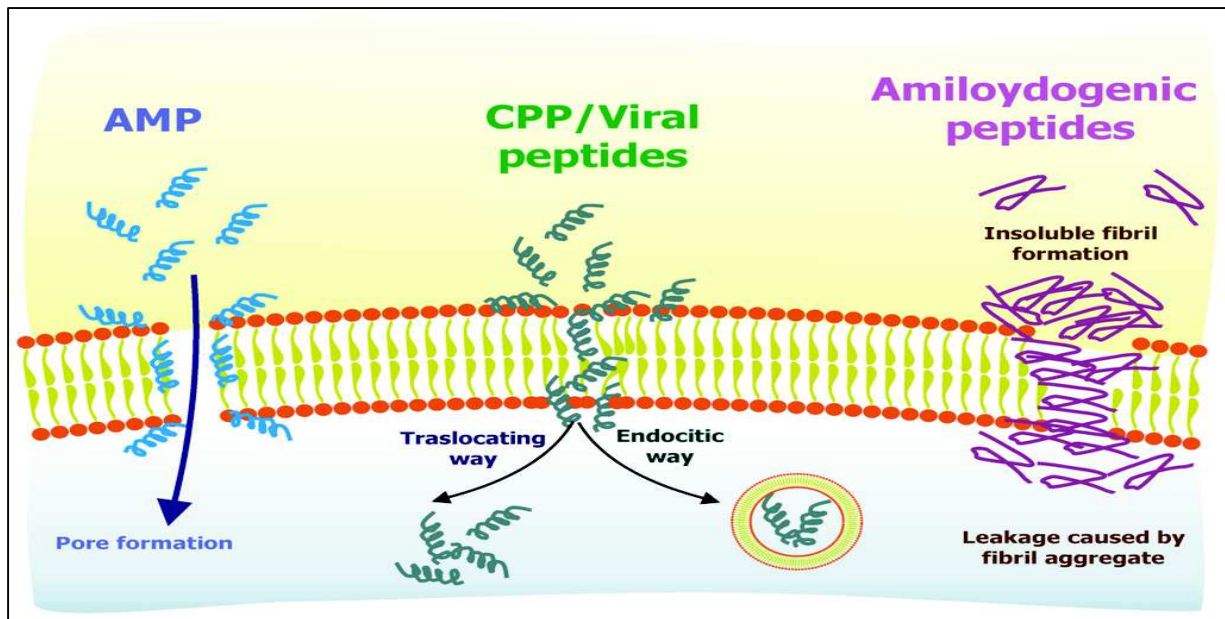


FIGURE 19 : INTERACTIONS PEPTIDES/LIPIDES (GALDIERO 2013)

Par ailleurs les modifications post-transcriptionnelles (oxydation, phosphorylation, glycosylation, cyclisation) peuvent fortement influencer l'activité. Dans le cas des peptides synthétiques il s'agit exclusivement des oxydations et cyclisations. Nous avons étudié la structure primaire et cherché à évaluer l'aptitude de la séquence S11D et M28D à se structurer en hélice-alpha.

#### 4.1 CAS DE S11D (STDKTKREEVD)

##### 4.1.1. CHARGE LONGUEUR, HYDROPHOBICITE DU S11D

Le peptide S11D possède trois charges positives (+3 ; 2K, 1R), et quatre charges négatives (-4 ; 2D, 2E), sa charge globale est donc de -1, ce qui en fait un peptide anionique. De plus sa longueur de 11 résidus est inférieure à la taille critique pour traverser les membranes microbiennes. Cependant les données de la littérature indiquent qu'il y aurait une structure secondaire comportant des feuillets- $\beta$  et des coudes, et serait capable de s'auto-assembler en des nanostructures qui s'apparentent à des disques de 54.9 nm (16).

La séquence de S11D correspond à la partie C-terminale du M28D et ne comporte aucun acide aminé hydrophobe, et n'a donc pas de caractère amphiphile

Finalement, ce peptide anionique n'est pas amphiphile et possède peu de possibilités d'interaction avec les membranes lipidiques. La longueur de 11 résidus ne lui permet pas de traverser les bicouches lipidiques. L'ensemble des ces paramètres pourrait expliquer l'absence d'activité antimicrobienne du S11D dans nos tests les plus récents.

## 4.1.2. PROJECTION EN HELICE DE S11D

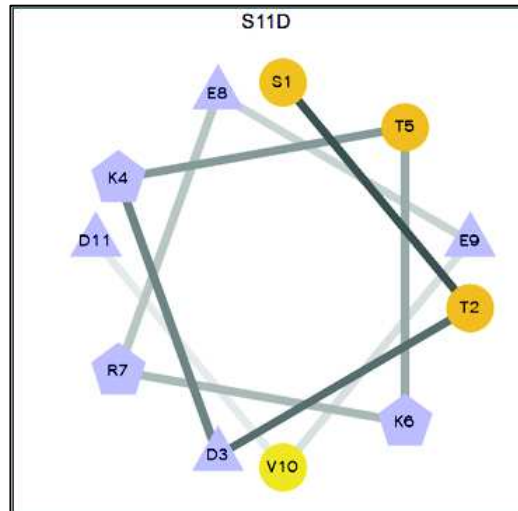


FIGURE 20 : PROJECTION DE LA SEQUENCE DE S11D SUR UNE HELICE (HELICAL WHEEL PROJECTION RZ-LAB)

## STDKTKREEVD

*Les résidus hydrophiles bleus (E et D, et triangles sont chargés négativement), (K, R et H, les pentagones sont chargés positivement) ; Les résidus neutres sont représentés par des cercles oranges (T, S et A)*

Le peptide S11D possède de nombreux résidus polaires distribués autour de la projection en hélice qui lui donnent un caractère hydrophile et l'absence de caractère hydrophobe et amphiphile réduit son aptitude à interagir avec les bicouches lipidiques (Fig. 20).

## 4.2 CAS DE M28D (MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKREEVD)

## 4.2.1. CHARGE LONGUEUR, HYDROPHOBICITE DE M28D

Le peptide M28D est anionique de par sa richesse en acides aminés potentiellement chargés avec 6 charges négatives (3D et 3E), et 3 charges positives (2K et 1R), et possède une charge globale de -3. La longueur de 28 résidus est supérieure à la taille critique de 18 résidus et est donc suffisante pour traverser une bicouche lipidique. Enfin, la séquence M28D possède à la fois des résidus hydrophiles et hydrophobes, permettant un caractère amphiphile.

## 4.2.2. PROJECTION EN HELICE AMPHIPHATIQUE DE M28D

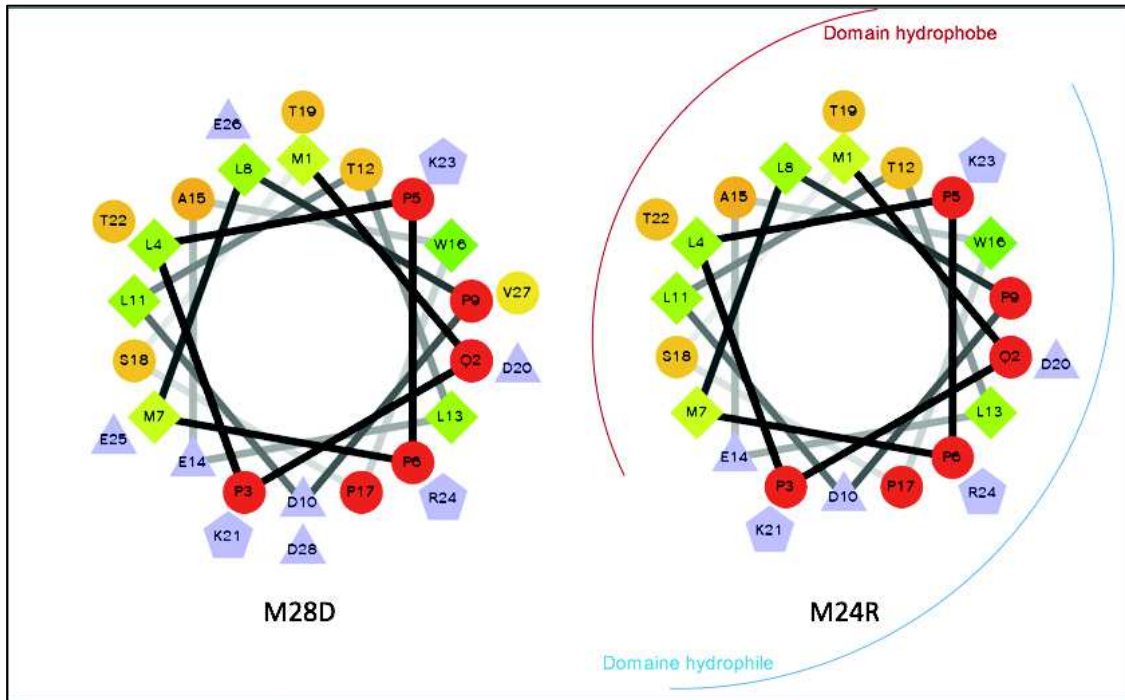


FIGURE 21 : PROJECTION DE LA SEQUENCE DE M28D ET M22T SUR UNE HELICE (HELICAL WHEEL PROJECTION RZ-LAB)

Les résidus hydrophiles bleus (E,D triangles, chargés négativement), (KRH pentagones chargé positivement) ; Les résidus hydrophobes vert (LMW représenté par des carrés)

Les résidus neutres représenté par des cerles oranges (TSA) et rouges (PQ)

M28D : MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKREEVD

M24R : MQPLPPMLPD LTLEAWPSTD KTKR

La répartition des charges autour de la projection en hélice explique la grande solubilité du M28D, cependant on ne distingue pas exactement deux domaines, l'un hydrophobe et l'un hydrophile, séparés. Le peptide M24R correspond au M28D tronqué de 4 résidus C-terminaux. Le M24R posséderait un domaine hydrophobe à gauche de la figure avec les carrés verts et un domaine hydrophile à droite avec les triangles et pentagones en bleu propice aux interactions avec les bicouches lipidiques (Fig. 21). De plus le peptide M28D possède la capacité d'auto-assemblage selon les données de la littérature, tout comme la protéine entière en nanostructures, tels que des disques fin de diamètre 54,4 nm (16).

En conclusion, cette analyse des prédictions de structure secondaire montre un caractère amphiphile qui explique la capacité d'interaction du peptide M28D avec les membranes et sa capacité d'auto-assemblage en nanostructures pourrait également jouer un rôle dans les propriétés du peptide. Cette dernière propriété est importante pour le mécanisme de type pore en tapis décrit pour les activités antimicrobiennes (Fig. 8).

## 5. ETUDE SUR L'ADMINISTRATION DES ANTIBIOTIQUES ASSOCIE AU M28D

Des tests antimicrobiens de M28D lot 2 ont été réalisés en triplicata sur *Micrococcus luteus*, en présence d'amoxicilline, l'antibiotique couramment utilisé en odontologie en première intention.

M28D ( $\mu\text{M}$ )	Amoxicilline ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition de la croissance (%)	CFI <sub>A</sub>	CFI <sub>P</sub>	CFI <sub>A</sub> +CFI <sub>P</sub>
CMI <sub>P</sub> 240	0	100			
120	0	63			
60	0	18			
20	0	0			
0	CMI <sub>A</sub> 0,025	99			
0	0,01	43			
60	0,01	89	0,4	0,25	0,5< <b>0,65</b> <1 Additif
20	0,01	82	<b>0,4</b>	<b>0,08</b>	<b>0,48&lt;0,5 Synergique</b>

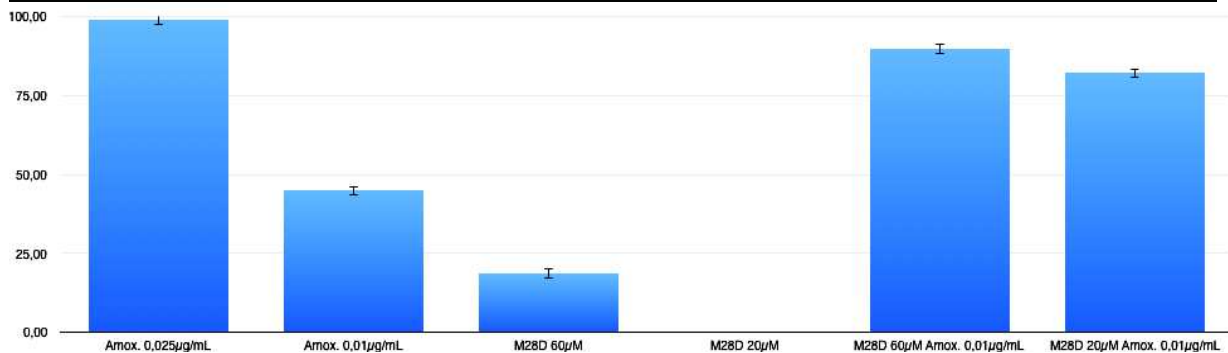


TABLEAU 7 : TAUX D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *M. LUTEUS*, COUPLE AMOXICILLINE/M28D

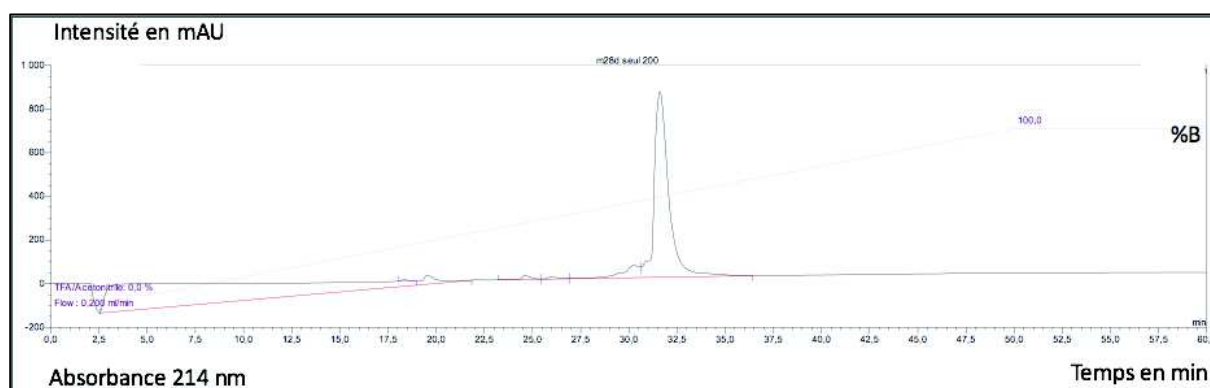
M28D lot 2 (A pour amoxicilline en  $\mu\text{g/mL}$ , M28D et  $\mu\text{M}$ )

L'amoxicilline agit sur la membrane bactérienne et interrompt le processus de transpeptidation qui lie les peptidoglycanes de la membrane bactérienne. Le test du couple peptide/antibiotique sur *Micrococcus luteus* a permis de diminuer par un facteur 2,5 la quantité d'amoxicilline par rapport à la CMI, ainsi que la quantité de M28D par les facteur 4 et 12. Ces observations suggèrent une capacité de pénétration de la membrane de *Micrococcus luteus* par le M28D améliorant de façon synergique l'effet antibiotique de l'amoxicilline.

## 6. TESTS DE STABILITE DU PEPTIDE M28D

### 6.1 STABILITE DE M28D EN CONDITIONS DE VARIATIONS DE PH ET DE TEMPERATURE

Les échantillons ont été testés par chromatographie liquide haute performance de phase inverse HPLC-RP à 214 nm afin de vérifier leur intégrité par rapport à un échantillon témoin à 200 µg/mL de M28D, les chromatogrammes se sont montrés sensiblement identiques avec un pic très précis correspondant au M28D, avec des valeurs similaires au témoin à 900 mAU, à 25°C et pH 7 (Fig. 22).



**FIGURE 22 : CHROMATOGRAMME DU M28D LOT 2 SEUL ;TEMOIN A TEMPERATURE AMBIANTE**

(Chromatogramme identique pour M28D 37°, 41°C ; et 25°C à pH 6,8 et 7,4 pendant 12 h)

Le peptide s'est montré stable à la variation de pH à 6,8 et à 7,4 pendant 12 h à 25°C. M28D s'est également révélé stable à température physiologique 37°C pendant 12 h ainsi qu'à 41°C pendant 12 h (condition de fièvre). Les échantillons ont été préparés à la concentration de 200 µg/mL de M28D à pH 6,8 et 7,4 (buffer ; TRIS-HCl ; étalonné à l'aide d'un pH-mètre), et pH 7, et incubé à 37°C et 40°C et à température ambiante 25°C pour les variations de pH.

## 6.2 STABILITE DE M28D EN PRESENCE D'ALBUMINE

La stabilité de M28D a été testée en présence de 20 µg d'albumine sérum humaine (HSA) pour 200 µg de M28D pour voir si HSA se liait au M28D. Un échantillon comportant uniquement 20 µg d'HSA à également été testé (Fig. 30 (A)). Le chromatogramme a montré des pics d'albumine et M28D bien distincts (Fig. 30 (B)) correspondant aux les temps d'éluion des deux composants des chromatogrammes témoins, albumine seule (Fig. 30 (A)) et M28D seul (Fig. 29). Le pic d'HSA est indiqué par une flèche sur les deux chromatogrammes suivants.

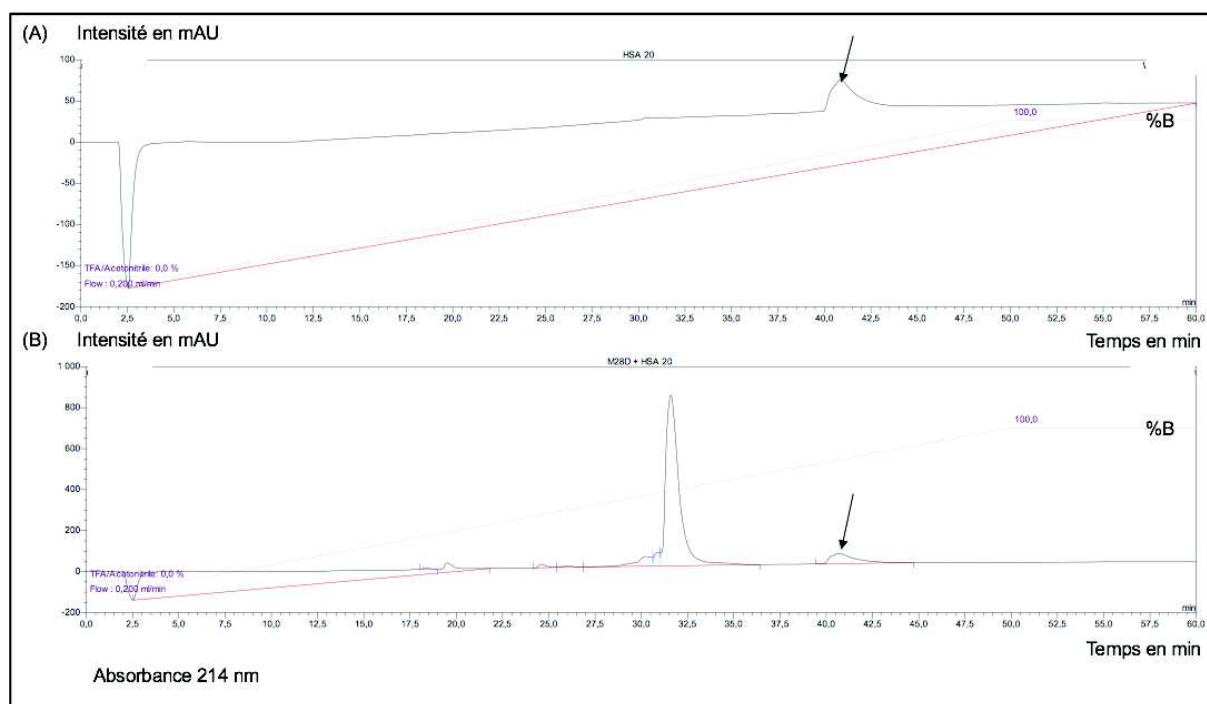
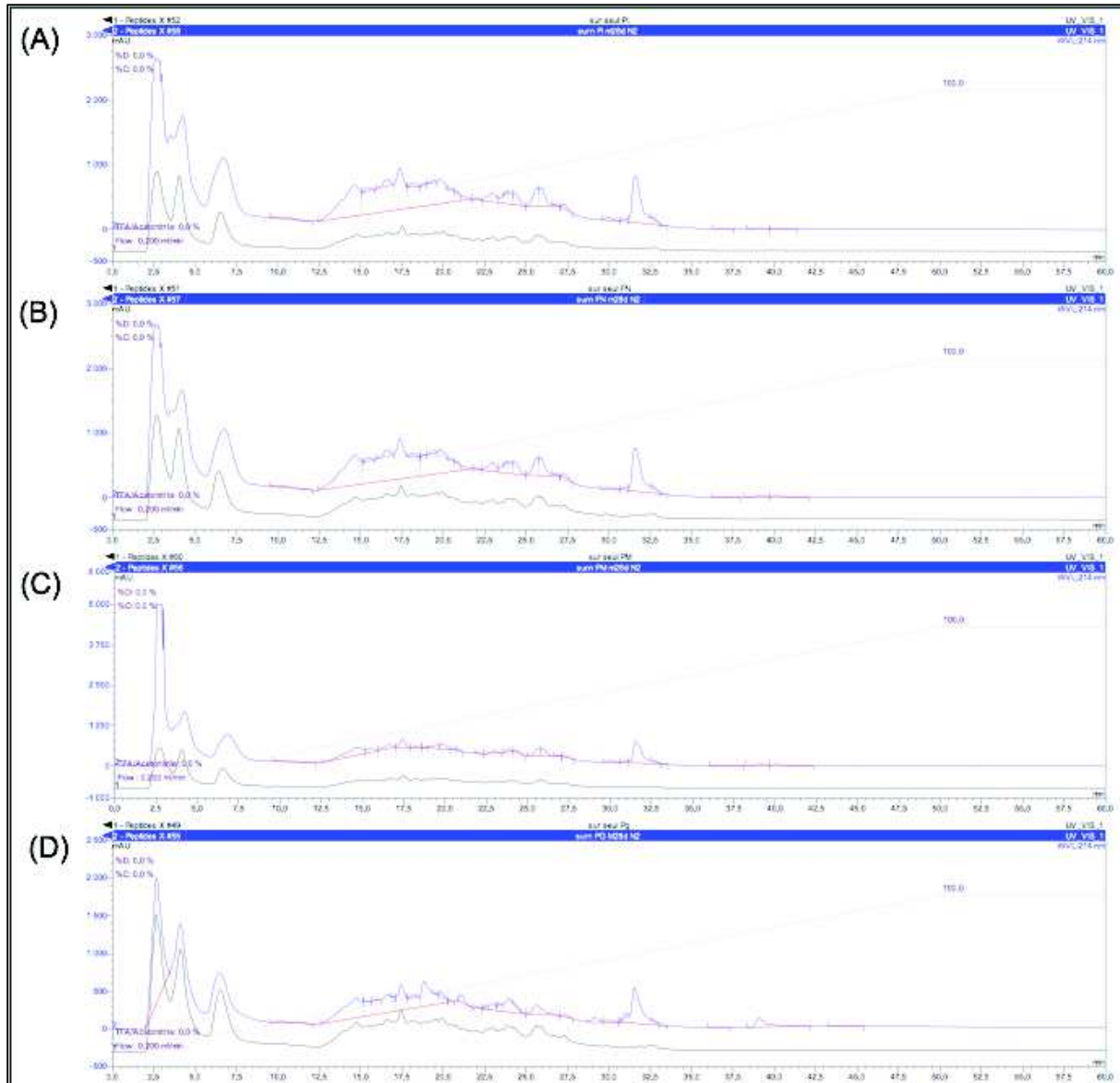


FIGURE 23 : CHROMATOGRAMMES (A) ALBUMINE SEULE, (B) M28D EN PRESENCE D'ALBUMINE

## 7.3. STABILITE DE M28D EN PRESENCE DES SURNAGEANTS BACTERIENS

Des tests de dégradation par les surnageants bactériens ont également été réalisés en présence de surnageants de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra* et *Prevotella intermedia* afin de savoir si ces bactéries étaient capables de dégrader M28D par sécrétion d'enzymes protéolytiques. Les échantillons de M28D lot 2 incubés pendant 24 h dans les surnageants bactériens ont été analysés par RP-HPLC, ainsi que les surnageants bactériens seuls (Fig. 24).





**FIGURE 24 : CHROMATOGRAMMES DE M28D EN PRESENCE DES SURNAGEANTS BACTERIENS COMPARES AVEC LES SURNAGEANTS CORRESPONDANTS**

(A) *Prevotella intermedia*, (B) *Fusobacterium nucleatum*, (C) *Parviromonas micra*, (D) *Porphyromonas gingivalis*

La Figure 24 (A) et (B) montre que le M28D lot 2 n'a pas subi de dégradation protéolytique avec une hauteur et largeur du pic semblable au contrôle (850 mAU ; Fig.22). Le chromatogramme figure 24 (C) montre une diminution du pic de M28D à 750 mAU et une largeur similaire. Le chromatogramme Figure 24 (D) montre un pic diminué correspondant au M28D d'une hauteur de 500 mAU mais plus large. Ce dernier surnageant correspond à celui de *Porphyromonas gingivalis*, et il semblerait qu'une dégradation protéolytique partielle explique la modification du pic de M28D.

En conclusion M28D semble être résistant à la dégradation dans les différentes conditions de températures, de pH physiologiques ainsi qu'à plusieurs surnageants bactériens. D'autre part il ne semble pas y avoir de liaison entre le M28D et l'albumine humaine, qui peut agir comme un transporteur de protéines en captant diverses molécules.

## DISCUSSION

L'Amélogénine fait partie de la grande famille des protéines de la matrice extracellulaire (ECM), protéines multifonctionnelles dont les rôles sont très variés. Les protéines ECM interviennent dans les processus cellulaires, lors de l'organogenèse, mais aussi dans la fonction et l'homéostasie tissulaire, ainsi que la régénération (26). Ces protéines ECM sont à l'origine des structures des organismes multicellulaires, allant des tissus osseux (103), en passant par les tissus conjonctifs et même le plasma sanguin. Les protéines ECM sont aussi associées à des pathologies inflammatoires et auto-immunes ce qui semble montrer leur implication dans les phénomènes d'immunité (104).

L'expression de l'Amélogénine a été détectée principalement dans les tissus minéralisés, os cartilages, mais également dans des tissus mous tels le cerveau au niveau des cellules gliales, des troncs des nerfs périphériques, mais également autour des vaisseaux sanguin vraisemblablement dans les péricytes, dans les cellules de la pulpe dentaire (odontoblastes et cellules souches), dans des cellules de la moelle des os longs, dans les macrophages, les ostéoblastes, les ostéoclastes, et évidemment les améloblastes au cours de l'amélogenèse (19). L'Amélogénine pourrait avoir un effet régulateur sur le recrutement et la différenciation des monocytes de la moelle vers les ostéoclastes. Cette expression dans des localisations différentes suggère des fonctions supplémentaires pour les Amélogénines et leurs peptides dérivés qui complèteraient un rôle dans l'homéostasie tissulaire.

L'Amélogénine est une protéine avec de multiples facettes et ses nombreux points de clivage protéolytique suggèrent une grande variété de peptides endogènes dont les activités restent à découvrir. Avant le début de notre étude aucune activité antimicrobienne des Amélogénines n'avait été démontré dans la littérature.

## M28D LE FRAGMENT C-TERMINAL DE L'AMELOGENINE ET AAMPs

Mes résultats expérimentaux ont confirmé une activité antimicrobienne pour le fragment M28D situé à l'extrémité C-terminale de l'Amélogénine. J'ai montré une **action antimicrobienne de M28D sur *Micrococcus luteus* ainsi qu'un pouvoir synergique du couple M28D/amoxicilline** sur ce même microorganisme. Le peptide M28D comporte des caractéristiques qui le classent dans la famille des peptides antimicrobiens anioniques (AAMPs). Ces AAMPs ont généralement un large spectre d'activité et peuvent être induits ou bien exprimés de façon constitutive. Pour certains AAMPs, l'activité antimicrobienne apparaît comme une fonction secondaire car les activités biologiques plus évidentes constituent la fonction primaire (105). Par exemple l'enkélytine (PEAP209-237 phosphorylé) est une AAMP, dérivée de la pro-enképhaline par clivage protéolytique (106).

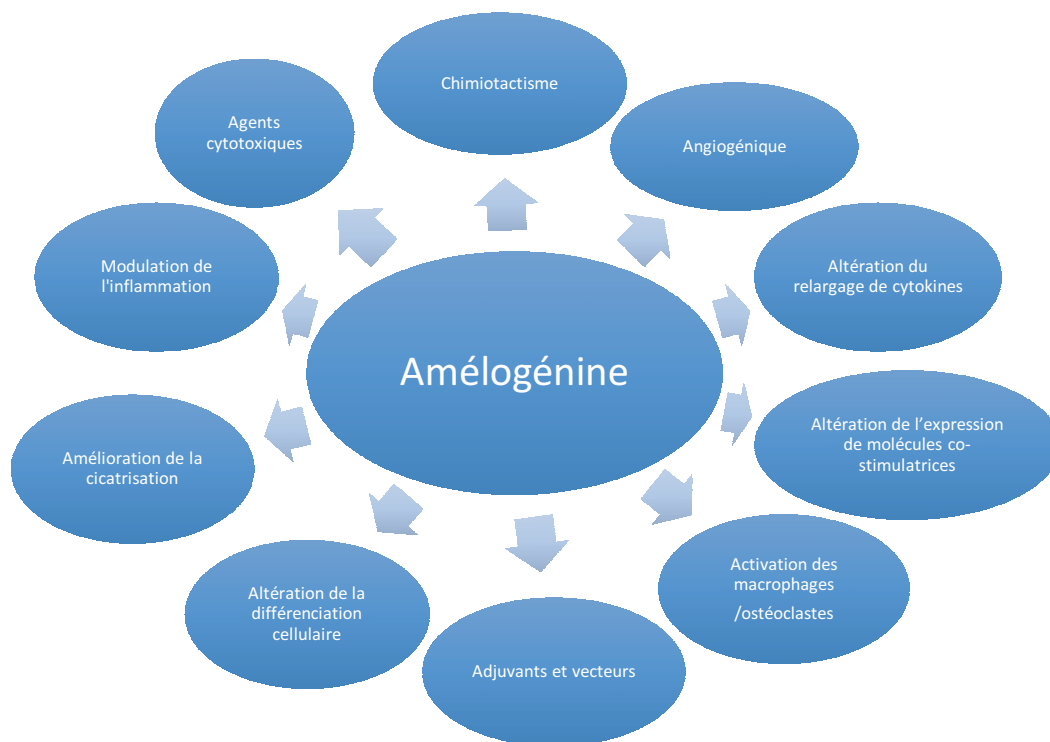
L'interaction membrane-peptide semble être le facteur clé pour l'activité, facilité par une structure amphiphile en hélice. Certains AAMPs nécessitent des cofacteurs ou ions métalliques comme le zinc pour former des ponts salins cationiques avec les composants chargés négativement des membranes microbiennes, facilitant l'insertion du peptide. Malheureusement, dans de nombreux cas les mécanismes d'action sous-jacents qui permettent l'activité des ces AAMPs ne sont pas élucidés.

Le M28D réunit de très nombreuses caractéristiques des AAMPs mais présente une activité antimicrobienne relativement faible qui pourrait être liée à sa synthèse chimique, qui ne permet pas de réaliser les modifications post-traductionnelles qui se produisent dans la cellule, ou à l'oxydation de la poudre de synthèse au cours du stockage induisant des difficultés de solubilisation. Une autre hypothèse pourrait être l'absence d'un cofacteur comme le calcium, ou un ion métallique essentiel pour l'activité qui pour certains AAMPs comme le zinc.

Le M28D, fragment endogène de l'Amélogénine humaine joue un rôle de modulation de l'adhésion de la protéine entière aux cristaux d'émail lors de l'amélogénèse. Par ailleurs, ses capacités d'interaction avec les membranes des cellules microbiennes et des cellules de l'hôte, ainsi qu'une activité antimicrobienne suggère un possible rôle d'IDR. Cette hypothèse peut être reliée avec les données de la littérature rapportant que les Amélogénines comme les IDR peuvent avoir des effets de régulation positive et négative de l'inflammation (87).

De nombreux PAMs se révèlent être multifonctionnels (Fig. 12, 13) et l'Amélogénine se caractérise aussi par un grand nombre de fonctions biologiques (Fig. 25) qui vont de l'organogenèse cranio-faciale (croissance et la maturation des os long au niveau des cartilages de croissance) à la biominéralisation de l'émail dentaire et aux processus de réparation et cicatrisation. Sa présence au niveau de tissus mous tels que la névroglie dans le cerveau à proximité des cellules gliales suppose un rôle dans l'homéostasie tissulaire. L'Amélogénine a également été détectée dans les macrophages avec un possible rôle de régulateur immunitaire(19). Ces propriétés du M28D sont à replacer dans le contexte de l'ensembles des recherches menées sur les Amélogénines, ainsi que l'EMD dont le constituant majeur sont les Amélogénines.

Dans le domaine de l'odontologie, les Amélogénines ont de potentielles applications cliniques selon la littérature tels que la reminéralisation des lésions carieuses initiales, la thérapeutique pulpaire et la régénération dentinaire, en implantologie dentaire, la régénération osseuse et parodontale ainsi que la traumatologie dentaire.



**FIGURE 25: FONCTIONS DES AMELOGENINES**

## LA REMINERALISATION DES LESIONS CARIEUSES INITIALES

L'odontogénèse est un modèle reconnu du développement épithélio-mésenchymateux d'un organe, ainsi qu'un modèle de biominéralisation. Les Amélogénines et autres protéines de la matrice sont à l'origine de plusieurs structures minéralisées et tissus biocéramiques, que sont l'émail, la dentine et le ciment. Ces protéines matricielles influencent la minéralisation de l'organe dentaire, avec pour conséquence dans certains cas des malformations comme l'amélogénèse imparfaite ou la dentinogénèse imparfaite.

L'émail est le seul dérivé ectodermique à se bio-minéraliser et qui par ses caractéristiques montre les stratégies du vivant à produire un organe qui doit durer le temps d'une vie dans des conditions de stress (alimentation, environnement aqueux riche en bactéries). L'amélogénèse est dépendante de la capacité d'auto-assemblage des Amélogénines et autres protéines non-Amélogénines de la matrice amélaire qui permet de fabriquer un échafaudage qui structure et dirige la phase de minéralisation. Les interactions entre les odontoblastes et protéines de la matrice servent à contrôler finement et en continu la mise en place de la matrice et le processus de minéralisation. Il a été démontré que l'utilisation d'une matrice artificielle créée par nanotechnologie est possible, à l'aide de peptides amphiphiles capables de s'auto-assembler en nanofibres (hydrogels à base d'Amélogénines ou de peptides de synthèse chimique), de promouvoir la prolifération cellulaire et dont la surface peut présenter une signalisation qui dirige la différenciation des odontoblastes (107). **Ce processus de bioingénierie basé sur les Amélogénines pourrait être utilisé pour la régénération de l'émail, une alternative biomimétique aux matériaux conventionnels utilisés en chirurgie dentaire (108).**

## LA THERAPEUTIQUE PULPAIRE ET LA REGENERATION DENTINAIRE

L'Amélogénine participe à la maturation et la croissance des cellules de la pulpe dentaire lors de l'odontogenèse (109). Cette information est intéressante du point de vue de la dentine secondaire et tertiaire. A l'heure actuelle, le traitement standard consiste en un coiffage à l'hydroxyde de calcium (alternatives MTA ou Biodentine). Des expériences animales (porc, rat et chien) ont comparé les effets de EMD à ceux de l'hydroxyde de calcium dans les coiffages directs (110), suggèrent que l'Amélogénine protégerait le tissu pulpaire, d'une inflammation excessive et de modifications dégénératives irréversibles (111). L'étude histopathologique de ces cas a démontré que le traitement par l'Amélogénine favorise la croissance des cellules endothéliales et la néovascularisation des capillaires dans la pulpe ainsi qu'une formation significativement plus importante de dentine réactionnelle.

Une étude clinique, randomisée en double aveugle, sur des pulpotomies expérimentales de dents saines dont l'avulsion était programmée puis traités par coiffage pulpaire direct, a démontré que les coiffages avec EMD présentaient moins de douleurs post-opératoires que ceux réalisés avec hydroxyde de calcium. De plus, une augmentation significative de la formation de dentine tertiaire, d'un pont dentinaire, et une inflammation moins importante ont été observés (112). Cependant, cette étude relève que EMD dans sa formulation présente (Emdogain) n'est pas utilisable en endodontie, car le gel ne permet pas d'étanchéfier, ni obturer le système canalaire ou soutenir un matériau de restauration (paramètres indispensables afin d'éviter la recontamination microbienne). Néanmoins les Amélogénines ont le potentiel pour servir de **matériau bioactif de régénération dentinaire dans les traitements de coiffage pulpaire, lorsque le tissu pulpaire est sain et non contaminé.**

## AMELOGENINE : REGENERATION OSSEUSE ET PARODONTALE

Dans une revue systématique (RS) sur l'efficacité de EMD (seul ou combiné avec des membranes) à promouvoir la régénération osseuse des tissus durs dans les défauts intra-osseux, un total de 20 études in vitro avec des analyses histomorphométriques ont été évaluées (113). Les principaux résultats de cette SR était que les traitements EMD améliorent significativement la régénération osseuse en comparaison avec les lambeaux d'assainissement (débridement parodontal). Cependant **EMD n'est pas plus efficace que la régénération tissulaire guidée (RTG) pour le traitement des défauts intra-osseux des mâchoires, il n'y avait pas non plus d'avantages à combiner EMD et RTG car les deux traitements séparés ont des performances équivalentes.** De plus, l'administration de EMD était plus efficace dans les défauts avec des parois de support, et moins efficace dans les défauts sans parois. Cela reflète les propriétés mécaniques de la formulation EMD en gel conçu pour une utilisation dans les défauts osseux étroits, et non pas de fournir une stabilité primaire dans la lésion. Cette SR suggère aussi que EMD n'est pas ostéoconducteur tout seul, puisque qu'EMD est incapable d'induire la formation d'os dans des capsules en titane. Les différents effets d'ostéoinduction et d'ostéoconduction répertoriés pour EMD sont probablement médiés par les cellules osseuses qui sont stimulées et secrètent des facteurs de croissance et de minéralisation (113). Le **potentiel des Amélogénines pour la régénération osseuse est indéniable** tant au niveau des os maxillaire et mandibulaire que les autres os, mais les indications pour l'instant sont restreintes en raisons de la formulation en gel. Le **développement de nouveaux produits basé sur l'Amélogénine est nécessaire pour une utilisation dans la cicatrisation de défauts osseux ayant une taille critique et sans supports**, cela est intéressant pour la chirurgie orthopédique par exemple, ou les comblements osseux en chirurgie orale (18)(107).

## LA REGENERATION OSSEUSE ET LIGAMENTAIRE

Des études *in vitro* par puce à ADN basées sur des cellules primaires osseuses humaines ont démontré que l'Amélogénine peut induire un profil d'expression dans les cellules osseuses similaire à celui d'un os en croissance. Il a aussi été montré que l'Amélogénine stimule la transcription du gène de la sialoprotéine osseuse (bone sialoprotein BSP) dans les ostéoblastes. BSP est un marqueur phénotypique précoce de différenciation des ostéoblastes et cémentoblastes, son expression est un prérequis pour la calcification osseuse (114).

D'autres études ont aussi confirmé que les Amélogénines stimulent l'expression de facteurs de croissance et active des cascades de transduction intracellulaires similaires à celles de BMP et TGF- $\beta$ . Des études sur le rat ont démontré que EMD utilisé sur des défauts des os longs (tel le fémur) peut induire la formation d'os trabéculaire, utile pour la thérapeutique (39). En ingénierie tissulaire, des matrices artificielles organiques pour les ligaments cruciformes ensemencé par des cellules ont étudié les effets des Amélogénines (115). EMD administré avant ensemencement cellulaire a un effet d'inhibition sur l'adhésion cellulaire sur la matrice du ligament artificiel. Lorsque EMD est administré après l'ensemencement de la matrice avec les cellules synoviales, les résultats ont montré une augmentation significative de la prolifération et de la croissance.

Ces observations suggèrent que EMD pourrait être utilisé pour **accélérer la colonisation de la matrice, et ensuite l'induction tissulaire *in situ***. EMD conviens pour des **le modèle post-opératoire, après ensemencement cellulaire du ligament artificiel**. Une étude récente montre l'intérêt de l'EMD également dans le **traitement des ruptures de ligaments naturels** (116).



## IMPLANTOLOGIE DENTAIRE

Les traitements en implantologie dentaire ont évolué, les considérations mécaniques sont désormais couplées à une amélioration du temps de cicatrisation, ainsi qu'à l'intégration biologique et esthétique. En raison du taux élevé de succès des implants, des cas plus périlleux et plus complexes sont traités. Pour assurer le succès de ces traitements plus difficiles, des nouvelles stratégies ont été développées pour améliorer les performances des implants, notamment le temps avant la mise en charge de l'implant et l'ostéointégration. L'Amélogénine est un bon candidat pour la stimulation de la croissance osseuse et la minéralisation à la surface des implants en raison de sa capacité à stimuler de la croissance osseuse péri-implantaire.

Cependant, aucune étude n'a pour l'instant pu démontrer un effet significatif des Amélogénines sur les performances mécaniques des implants, analysées par des tests biomécaniques de dépose par torque croissant (117). Une étude animale sur des fémurs de rat a démontré une amélioration de l'ostéointégration des implants recouverts de EMD (118). Le domaine de l'implantologie orale progresse rapidement vers des surfaces biologiquement actives, avec une architecture et nanostructure ostéoinductives. Le rôle potentiel des Amélogénines en implantologie est incertain, cependant le traitement de patients atteint de péri-implantite, justifie des recherches approfondies. Comme cela a été le cas avec l'ingénierie tissulaire des ligaments (115), il semble que le développement de revêtement de surface basé sur les Amélogénines ne soit pas la meilleure solution, puisque cela peut entraver l'adhésion cellulaire au biomatériau (119).

**Des méthodes alternatives pour délivrer l'Amélogénine doivent être développées, car les effets de stimulation de croissance osseuse de l'Amélogénine peuvent être complémentaires à l'ostéointégration du titane des implants dentaires tout comme les vis et plaques en titane utilisées en chirurgie orthopédique (18).**

## TRAITEMENT DES TRAUMATISMES DENTAIRE

Une autre possibilité intéressante pour l'application des Amélogénines est leur utilisation dans les procédures de réimplantations de dents expulsés (120). Des rapports préliminaires de cas et des études expérimentales animales suggèrent que EMD pourrait être utilisé comme un revêtement radiculaire pour la réimplantation de dents avulsées (121). Une étude clinique utilisant EMD pour traiter des dents toutes préalablement ankylosées ou bien exarticulées, il a été rapporté que EMD seul ne pouvait guérir ou prévenir l'ankylose (122).

Une autre étude clinique, cependant, a évalué 22 cas d'incisives permanentes expulsées et réimplantées avec EMD, et a montré une baisse significative de l'inflammation et de la résorption radiculaire de ces dents traitées comparé à un groupe contrôle (123). De même, une étude utilisant un protocole pour la réimplantation de dents expulsés, appelée thérapie anti-résorptive (anti-resorptive therapy ART) qui associe glucocorticoïdes et EMD avant la procédure de réimplantation dentaire, a rapporté que sur des dents expulsées et qui n'avaient pas été conservé en milieu physiologique pendant une longue période, trois des huit dents on cicatrisé avec un desmodonte fonctionnel (124).

Il semble plausible que **l'Amélogénine stimulerait la régénération de l'appareil d'attache de la dent même dans des cas où la dent a été gardée pendant un longue période hors de la cavité orale**. Cependant **un traitement additionnel est nécessaire pour assurer un résultat stable et prédictif, des nouveaux protocoles qui combinent l'Amélogénine avec des médicaments anti-inflammatoires et antibiotiques doivent être élaborés et testés** avant que le potentiel des Amélogénines puisse être exploité pleinement en traumatologie dentaire (18).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De nombreuses stratégies et traitement régénératifs ont été suggérés pour résoudre les pertes critiques de tissus tel que l'os, les ligaments ou la peau. L'Amélogénine sous la forme EMD est le premier produit sur le marché entièrement basé sur la biomimétique, induisant une régénération parodontale à la fois dans l'architecture et dans la fonction. Les effets cliniques observés des Amélogénines ont généré beaucoup d'intérêt, mais le contenu de EMD correspond aussi aux protéines non Amélogénines. En effet, il faut comprendre comment ces molécules pluripotentes interagissent avec les mécanismes cellulaires et moléculaires complexes qui gouvernent la cicatrisation, la régénération et la croissance. Les découvertes suggèrent que les Amélogénines fonctionnent sur au moins deux niveaux. Au premier niveau ils agissent comme un système auto-assemblé de relargage d'Amélogénine qui assure une libération durable même après une application unique. Le second niveau correspond aux peptides et produits de dégradation actifs de signalisation qui interagissent directement avec les cellules. Ce mécanisme de signalisation induit une cascade d'expression de facteurs de croissance qui initie et maintient les processus anaboliques. La forte conservation des Amélogénines au cours de l'évolution laisse entendre une fonction de base pour ces molécules. Les Amélogénines sont exprimées plus largement dans le corps qu'on ne le pensait (organogénèse cranio-faciale, os en croissance, l'odontogénèse, névroglie, péricytes et les macrophages), et qu'ils pourraient être utiles dans grande diversité d'applications en médecine régénérative avec une possible régulation de l'immunité.

Nous avons démontré une **action antimicrobienne modérée pour le fragment M28D** suggérant le lien entre protéines de la matrice extracellulaire et le système immunitaire. Par ailleurs, le peptide M28D s'est montré stable en présence de fluides biologiques et de plusieurs microorganismes L'application des protéines dérivées de la matrice amélaire sous la forme **Emdogain a fixé un standard moderne pour la thérapeutique de régénération parodontale**. Des expériences récentes montrent que les Amélogénines ont le **potentiel régénératif pour une utilisation clinique étendue en raison de leurs propriétés biologiques** (coiffages pulpaire, régénération osseuse, la cicatrisation en implantologie, traumatologie de dents expulsées, cicatrisation des plaies et ligaments).

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* mars 2012;18(3):268-81.
2. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The Negative Impact of Antibiotic Resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 16 déc 2015;
3. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? Madhani HD, éditeur. *PLoS Pathog.* 28 oct 2010;6(10):e1001067.
4. Phoenix D, Dennison SR, Harris F. Antimicrobial peptides. Weinheim: Wiley-VCH; 2013. 231 p.
5. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* févr 2009;24(2):202-8.
6. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 30 juin 1999;126(3):270-99.
7. Nanci A, TenCate AR. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2013. 379 p.
8. Fehrenbach MJ, Popowics T. Illustrated dental embryology, histology, and anatomy. 4. ed. Riverport Lane, Md: Elsevier; 2014. 335 p.
9. Kioussi C, éditeur. *Odontogenesis: methods and protocols.* New York: Humana Press; 2012. 194 p. (Methods in molecular biology).
10. Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Catalano-Sherman J, Young MF, Fisher LW. The enamelin (tuftelin) gene. *Int J Dev Biol.* févr 1995;39(1):135-43.
11. Hatakeyama J, Fukumoto S, Nakamura T, Haruyama N, Suzuki S, Hatakeyama Y, et al. Synergistic Roles of Amelogenin and Ameloblastin. *J Dent Res.* 1 avr 2009;88(4):318-22.
12. Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol.* janv 1995;40(1):1-14.

13. Sire J-Y, Delgado S, Fromentin D, Girondot M. Amelogenin: lessons from evolution. *Arch Oral Biol.* févr 2005;50(2):205-12.
14. Assaraf-Weill N, Gasse B, Al-Hashimi N, Delgado S, Sire J-Y, Davit-BéAl T. Conservation of Amelogenin Gene Expression During Tetrapod Evolution: AMELOGENIN GENE EXPRESSION IN *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* juin 2013;320(4):200-9.
15. Magrane M, Consortium U. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database.* 29 mars 2011;2011(0):bar009-bar009.
16. Khan F, Li W, Habelitz S. Biophysical characterization of synthetic amelogenin C-terminal peptides: Amelogenin C-terminal peptides. *Eur J Oral Sci.* avr 2012;120(2):113-22.
17. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch T, et al. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol.* avr 1994;112(2):103-9.
18. Lyngstadaas S, Wohlfahrt J, Brookes S, Paine M, Snead M, Reseland J. Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. *Orthod Craniofac Res.* août 2009;12(3):243-53.
19. Goldberg M. Amelogenins multifaceted proteins for dental and bone formation and repair [Internet]. [Sharjah, U.A.E.]: Bentham Science Publishers; 2010 [cité 20 nov 2015]. Disponible sur: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=864285>
20. Reseland JE, Reppe S, Larsen AM, Berner HS, Reinholt FP, Gautvik KM, et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci.* mai 2006;114 Suppl 1:205-11; discussion 254-6, 381-2.
21. Haze A, Taylor AL, Blumenfeld A, Rosenfeld E, Leiser Y, Dafni L, et al. Amelogenin expression in long bone and cartilage cells and in bone marrow progenitor cells. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol.* mai 2007;290(5):455-60.
22. Nakamura Y, Hammarström L, Lundberg E, Ekdahl H, Matsumoto K, Gestrelus S, et al. Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp. *Adv Dent Res.* août 2001;15:105-7.
23. Ye L, Le TQ, Zhu L, Butcher K, Schneider RA, Li W, et al. Amelogenins in human

developing and mature dental pulp. J Dent Res. 2006;85(9):814-8.

24. Yoo H-I, Lee G-H, Lee S-Y, Kang J-H, Moon J-S, Kim M-S, et al. Expression of amelogenin and effects of cyclosporin A in developing hair follicles in rats. J Anat. 1 oct 2015;

25. Okada M, Tazawa I, Nakajima K, Yaoita Y. Expression of the *Amelogenin* Gene in the Skin of *Xenopus tropicalis*. Zoolog Sci. mars 2013;30(3):154-9.

26. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 24 juill 2008;454(7203):428-35.

27. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. J Clin Periodontol. sept 1997;24(9 Pt 2):693-6.

28. Heijl L, Heden G, Svärdröm G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. J Clin Periodontol. sept 1997;24(9 Pt 2):705-14.

29. Esposito M, Coulthard P, Thomsen P, Worthington HV. Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a Cochrane systematic review. J Dent Educ. août 2004;68(8):834-44.

30. Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol. 2009;2(4):247-66.

31. Heden G, Wennström JL. Five-year follow-up of regenerative periodontal therapy with enamel matrix derivative at sites with angular bone defects. J Periodontol. févr 2006;77(2):295-301.

32. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. J Clin Periodontol. sept 1997;24(9 Pt 2):658-68.

33. Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. J Biol Chem. 29 déc 2000;275(52):41263-72.

34. Gestrelis S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. J

Clin Periodontol. sept 1997;24(9 Pt 2):678-84.

35. Nakamura Y, Hammarström L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J.* mai 2002;35(5):407-17.

36. Spahr A, Hammarström L. Response of dental follicular cells to the exposure of denuded enamel matrix in rat molars. *Eur J Oral Sci.* oct 1999;107(5):360-7.

37. Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol.* févr 2001;28(2):181-8.

38. Wyganowska-Świątkowska M, Urbaniak P, Nohawica M, Kotwicka M, Jankun J. Enamel matrix proteins exhibit growth factor activity: A review of evidence at the cellular and molecular levels. *Exp Ther Med [Internet].* 7 avr 2015 [cité 29 mars 2016]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2414>

39. Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, et al. Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- $\beta$ . *J Dent Res.* juin 2005;84(6):510-4.

40. Amin HD, Olsen I, Knowles J, Dard M, Donos N. A tyrosine-rich amelogenin peptide promotes neovasculogenesis in vitro and ex vivo. *Acta Biomater.* mai 2014;10(5):1930-9.

41. Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 29 févr 2008;367(1):1-6.

42. He J, Jiang J, Safavi KE, Spångberg LS., Zhu Q. Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* févr 2004;97(2):239-45.

43. Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodontal Res.* oct 2000;35(5):291-300.

44. Nishiguchi M, Yuasa K, Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Hasegawa T, et al. Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-

CSF and fibronectin expression in osteoblasts. *Arch Oral Biol.* mars 2007;52(3):237-43.

45. Myhre AE, Lyngstadaas SP, Dahle MK, Stuestøl JF, Foster SJ, Thiemermann C, et al. Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood. *J Periodontal Res.* juin 2006;41(3):208-13.

46. Tompkins K, George A, Veis A. Characterization of a mouse amelogenin [A-4]/M59 cell surface receptor. *Bone.* févr 2006;38(2):172-80.

47. Xu L, Harada H, Taniguchi A. The effects of LAMP1 and LAMP3 on M180 amelogenin uptake, localization and amelogenin mRNA induction by amelogenin protein. *J Biochem (Tokyo).* oct 2008;144(4):531-7.

48. Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS, Thrane PS, Prydz HP. A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel in vivo. *EMBO J.* 1 nov 1995;14(21):5224-9.

49. Nagano T, Kakegawa A, Yamakoshi Y, Tsuchiya S, Hu JC-C, Gomi K, et al. Mmp-20 and Klk4 Cleavage Site Preferences for Amelogenin Sequences. *J Dent Res.* 1 sept 2009;88(9):823-8.

50. Nanci A, Smith CE. Les protéines de l'émail dentaire-Etude immunocytochimique de l'amélogénèse. 1988 [cité 1 déc 2015]; Disponible sur: <http://ipubli-inserm.demo.inist.fr/handle/10608/3746>

51. Spahr A, Lyngstadaas SP, Boeckh C, Andersson C, Podbielski A, Haller B. Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of periodontal pathogens in vitro. *J Clin Periodontol.* janv 2002;29(1):62-72.

52. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* févr 2004;12(1):100-8.

53. Vowden P, Romanelli M, Price P. Effect of amelogenin extracellular matrix protein and compression on hard-to-heal venous leg ulcers. *J Wound Care.* mai 2007;16(5):189-95.

54. Romanelli M, Kaha E, Stege H, Wnorowski JW, Vowden P, Majamaa H, et al. Effect of amelogenin extracellular matrix protein and compression on hard-to-heal venous leg ulcers:



follow-up data. *J Wound Care*. janv 2008;17(1):17-8, 20-3.

55. Romanelli M, Dini V, Vowden P, Agren MS. Amelogenin, an extracellular matrix protein, in the treatment of venous leg ulcers and other hard-to-heal wounds: experimental and clinical evidence. *Clin Interv Aging*. 2008;3(2):263-72.

56. Turner NJ, Badylak SF. The Use of Biologic Scaffolds in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds. *Adv Wound Care*. août 2015;4(8):490-500.

57. Dehsorkhi A, Castelletto V, Hamley IW. Self-assembling amphiphilic peptides: SELF-ASSEMBLING PEPTIDES. *J Pept Sci*. juill 2014;20(7):453-67.

58. Apicella A, Heunemann P, Bolisetty S, Marascio M, Gemperli Graf A, Garamszegi L, et al. The Influence of Arginine on the Response of Enamel Matrix Derivative (EMD) Proteins to Thermal Stress: Towards Improving the Stability of EMD-Based Products. Engel E, éditeur. *PLOS ONE*. 15 déc 2015;10(12):e0144641.

59. Miravet JF, Escuder B, Segarra-Maset MD, Tena-Solsona M, Hamley IW, Dehsorkhi A, et al. Self-assembly of a peptide amphiphile: transition from nanotape fibrils to micelles. *Soft Matter*. 2013;9(13):3558.

60. Tan J, Leung W, Moradian-Oldak J, Zeichner-David M, Fincham AG. Quantitative analysis of amelogenin solubility. *J Dent Res*. juin 1998;77(6):1388-96.

61. van Oss CJ. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. oct 1997;2(5):503-12.

62. Van Oss C., Good R., Chaudhury M. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in « hydrophobic interactions » between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interface Sci*. juin 1986;111(2):378-90.

63. Andrès E, Dimarcq J-L. Peptides antimicrobiens cationiques: de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. Mise à jour. *Médecine Mal Infect*. avr 2007;37(4):194-9.

64. Yount NY, Yeaman MR. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann N Y Acad Sci*. janv 2013;1277:127-38.

65. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. mars 2005;3(3):238-50.

66. Aslam R, Marban C, Corazzol C, Jehl F, Delalande F, Van Dorselaer A, et al. Cateslytin, a chromogranin A derived peptide is active against *Staphylococcus aureus* and resistant to degradation by its proteases. *PloS One*. 2013;8(7):e68993.
67. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* mars 2009;30(3):131-41.
68. Powers J-PS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. nov 2003;24(11):1681-91.
69. Park Y-K, Hahm K-S. Antimicrobial Peptides (AMPs): Peptide Structure and Mode of Action. *J Biochem Mol Biol*. 30 sept 2005;38(5):507-16.
70. Hamasaki MY, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Cunha DMG, Koike MK, Machado MCC, et al. « Neuropeptides in the brain defense against distant organ damage ». *J Neuroimmunol*. janv 2016;290:33-5.
71. Kowalska K, Carr DB, Lipkowski AW. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci*. juill 2002;71(7):747-50.
72. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* sept 2006;1758(9):1184-202.
73. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. févr 2010;1(2):143-52.
74. Yacoub HA, Al-Maghrabi OA, Ahmed ES, Uversky VN. Abundance and functional roles of intrinsic disorder in the antimicrobial peptides of the NK-lysin family. *J Biomol Struct Dyn*. 9 mars 2016;1-86.
75. Mowery BP, Lindner AH, Weisblum B, Stahl SS, Gellman SH. Structure–activity Relationships among Random Nylon-3 Copolymers That Mimic Antibacterial Host-Defense Peptides. *J Am Chem Soc*. 22 juill 2009;131(28):9735-45.
76. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* déc 1999;1462(1-2):11-28.

77. Taylor K, Barran PE, Dorin JR. Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers*. 2008;90(1):1-7.
78. Chen C, Pan F, Zhang S, Hu J, Cao M, Wang J, et al. Antibacterial Activities of Short Designer Peptides: a Link between Propensity for Nanostructuring and Capacity for Membrane Destabilization. *Biomacromolecules*. 8 févr 2010;11(2):402-11.
79. Zasloff M. Antimicrobial Peptides: Do They Have a Future as Therapeutics? In: Harder J, Schröder J-M, éditeurs. *Antimicrobial Peptides* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 17 mars 2016]. p. 147-54. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24199-9\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24199-9_10)
80. Yeaman MR. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*. 1 mars 2003;55(1):27-55.
81. Cole JN, Nizet V. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. *Microbiol Spectr*. févr 2016;4(1).
82. Miller AA, Miller PF, éditeurs. *Emerging trends in antibacterial discovery: answering the call to arms*. Norfolk: Caister Academic Press; 2011. 460 p.
83. Mansour SC, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc*. mai 2015;21(5):323-9.
84. Yu H-Y, Tu C-H, Yip B-S, Chen H-L, Cheng H-T, Huang K-C, et al. Easy Strategy To Increase Salt Resistance of Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2011;55(10):4918-21.
85. Brogden KA, Bates AM, Fischer CL. Antimicrobial Peptides in Host Defense: Functions Beyond Antimicrobial Activity. In: Harder J, Schröder J-M, éditeurs. *Antimicrobial Peptides* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 17 mars 2016]. p. 129-46. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24199-9\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24199-9_9)
86. Yeung ATY, Gellatly SL, Hancock REW. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci*. juill 2011;68(13):2161-76.
87. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host

defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol.* 14 nov 2013;9(12):761-8.

88. North JR, Takenaka S, Rozek A, Kielczewska A, Opal S, Morici LA, et al. A novel approach for emerging and antibiotic resistant infections: Innate defense regulators as an agnostic therapy. *J Biotechnol.* 22 mars 2016;

89. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 16 mars 2012;10(4):243-54.

90. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):455-62.

91. Nicholls EF, Madera L, Hancock REW. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2010;1213:46-61.

92. Wuerth K, Hancock REW. New insights into cathelicidin modulation of adaptive immunity. *Eur J Immunol.* oct 2011;41(10):2817-9.

93. Mayer ML, Easton DM, Hancock REW. Fine tuning host responses in the face of infection: emerging roles and clinical applications of host defence peptides. In: Wang G, éditeur. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies* [Internet]. Wallingford: CABI; 2010 [cité 6 avr 2016]. p. 195-220. Disponible sur: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20103329302>

94. Splith K, Neundorff I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur Biophys J.* avr 2011;40(4):387-97.

95. Afacan NJ, Yeung ATY, Pena OM, Hancock REW. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des.* 2012;18(6):807-19.

96. Gwyer Findlay E, Currie SM, Davidson DJ. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* oct 2013;27(5):479-93.

97. Ryan LK, Freeman KB, Masso-Silva JA, Falkovsky K, Aloyouny A, Markowitz K, et al. Activity of Potent and Selective Host Defense Peptide Mimetics in Mouse Models of Oral Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juill 2014;58(7):3820-7.

98. Hiemstra PS, Amatngalim GD, van der Does AM, Taube C. Antimicrobial peptides and

innate lung defenses: Role in infectious and non-infectious lung diseases and therapeutic applications. *Chest*. 22 oct 2015;

99. Mor A. Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities: Antiparasitic peptides. *FEBS J*. nov 2009;276(22):6474-82.

100. Marr AK, Cen S, Hancock REW, McMaster WR. Identification of Synthetic and Natural Host Defense Peptides with Leishmanicidal Activity. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2016;60(4):2484-91.

101. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*. août 2006;15(8):933-46.

102. Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, et al. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. févr 2016;64(1):33-46.

103. Ravindran S, George A. Multifunctional ECM proteins in bone and teeth. *Exp Cell Res*. juill 2014;325(2):148-54.

104. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 15 déc 2010;123(24):4195-200.

105. Anionic Antimicrobial Peptides. In: *Antimicrobial Peptides* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013 [cité 4 mars 2016]. p. 83-113. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527652853.ch3>

106. Goumon Y, Lugardon K, Kieffer B, Lefèvre JF, Van Dorsselaer A, Aunis D, et al. Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem*. 6 nov 1998;273(45):29847-56.

107. Fan Y, Wen ZT, Liao S, Lallier T, Hagan JL, Twomley JT, et al. Novel amelogenin-releasing hydrogel for remineralization of enamel artificial caries. *J Bioact Compat Polym*. 1 nov 2012;27(6):585-603.

108. Bagheri G H, Sadr A, Espigares J, Hariri I, Nakashima S, Hamba H, et al. Study on the influence of leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) on the remineralization of enamel defects

via micro-focus x-ray computed tomography and nanoindentation. *Biomed Mater Bristol Engl*. juin 2015;10(3):035007.

109. Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res*. févr 2002;81(2):103-8.

110. Igarashi R, Sahara T, Shimizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2003;52(2):227-36.

111. Orhan EO, Maden M, Senguüven B. Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation: Pulp capping: PRP & enamel matrix derivative. *Int Endod J*. avr 2012;45(4):317-25.

112. Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X, Yamashita A. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod*. mars 2003;29(3):176-9.

113. Rathe F, Junker R, Chesnutt BM, Jansen JA. The Effect of Enamel Matrix Derivative (Emdogain®) on Bone Formation: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. sept 2009;15(3):215-24.

114. Shimizu E, Saito R, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, et al. Amelogenin stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor 2 response element and transforming growth factor-beta1 activation element in the promoter of the BSP gene. *J Periodontol*. sept 2005;76(9):1482-9.

115. Messenger MP, Raif EM, Seedhom BB, Brookes SJ. The potential use of enamel matrix derivative for in situ anterior cruciate ligament tissue engineering: a translational in vitro investigation. *Tissue Eng*. août 2007;13(8):2041-51.

116. Hanhan S, Ejzenberg A, Goren K, Saba F, Suki Y, Sharon S, et al. Skeletal ligament healing using the recombinant human amelogenin protein. *J Cell Mol Med*. mai 2016;20(5):815-24.

117. Franke Stenport V, Johansson CB. Enamel matrix derivative and titanium implants. *J Clin Periodontol*. avr 2003;30(4):359-63.

118. Shimizu-Ishiura M, Tanaka S, Lee W-S, Debari K, Sasaki T. Effects of enamel matrix derivative to titanium implantation in rat femurs. *J Biomed Mater Res.* mai 2002;60(2):269-76.
119. Birang R, Shahabooei M, Mashhadiabbas F, Atabaki M, Naghsh N, Kavosh K, et al. Effect of enamel matrix derivative on bone formation around intraosseous titanium implant: An experimental study in canine model. *Dent Res J.* nov 2012;9(6):790-6.
120. Araújo M, Hayacibara R, Sonohara M, Cardaropoli G, Lindhe J. Effect of enamel matrix proteins (Emdogain') on healing after re-implantation of « periodontally compromised » roots. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* oct 2003;30(10):855-61.
121. Kenny DJ, Barrett EJ, Johnston DH, Sigal MJ, Tenenbaum HC. Clinical management of avulsed permanent incisors using Emdogain: initial report of an investigation. *J Can Dent Assoc.* janv 2000;66(1):21.
122. Schjøtt M, Andreasen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol.* févr 2005;21(1):46-50.
123. Barrett EJ, Kenny DJ, Tenenbaum HC, Sigal MJ, Johnston DH. Replantation of permanent incisors in children using Emdogain. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol.* oct 2005;21(5):269-75.
124. Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol.* avr 2005;21(2):93-101.

Takeda (Alain) - Les activités antimicrobiennes des peptides M28D et S11D dérivés de l'Amélogénine : relation structure-fonction et signification en odontologie

(Thèse : 3<sup>ème</sup> cycle Sci. odontol. : Strasbourg : 2016 ; N°24)

N°43.22.16.24

Résumé :

La fréquence accrue de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques causant des intoxications alimentaires et maladies nosocomiales incite sans cesse à chercher de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le domaine de l'odontologie de nombreuses pathologies très courantes sont causées par des infections microbiennes et l'un des espoirs pour traiter les patients pourrait être l'utilisation des peptides antimicrobiens (PAMs). L'intérêt des PAMs est leur large spectre d'activité, l'absence de toxicité pour l'hôte et leurs propriétés immuno-modulatrices.

Nous nous intéressons dans cette étude à deux peptides endogènes de l'Amélogénine humaine, M28D et S11D. Nous nous proposons d'approfondir l'étude des propriétés antimicrobiennes de ces peptides synthétiques dérivés de l'Amélogénine par des tests antimicrobiens, en élargissant les souches microbiennes testées et de définir les paramètres structuraux des peptides qui sont importants pour l'expression des activités antimicrobiennes.

Cette étude repose sur des expériences de biochimie, de microbiologie et nous discuterons des différents aspects des propriétés biologiques de l'Amélogénine dans le contexte de l'odontologie. Nous avons montré une activité antimicrobienne modérée de M28D sur *Micrococcus luteus* ainsi qu'un pouvoir synergique du couple M28D/amoxicilline sur ce même microorganisme. Par ailleurs, le peptide M28D s'est montré stable en présence de fluides biologiques de plusieurs microorganismes et en conditions de pH et de températures physiologiques.

Rubrique de classement : Recherche Expérimentale en Odontologie

Mots clés : Amélogénine, PAMs peptides antimicrobiens, odontologie, microbiologie

Me SH : Amelogenin, AMPs antimicrobial peptides, odontology, microbiology

Jury :

Président : Professeur MEYER Florent

Assesseurs : Docteur METZ-BOUTIGUE Marie-Hélène

Docteur HUCK Olivier

Docteur FIORETTI Florence

Coordonnées de l'auteur :

Adresse postale : A. TAKEDA

8 RUE MARCEL WEINUM 67100 STRASBOURG

Adresse de messagerie : alain.takeda@hotmail.fr