
Étude de la synergie entre certains lipopeptides sur leur activité cytotoxique et leur activité antivirale

Auteur : Detournay, Sarah

Promoteur(s) : Jacques, Philippe

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18243>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**ÉTUDE DE LA SYNERGIE ENTRE CERTAINS
LIPOPEPTIDES SUR LEUR ACTIVITE
CYTOTOXIQUE ET LEUR ACTIVITE
ANTIVIRALE**

SARAH DETOURNAY

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER
BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIE**

ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023

PROMOTEUR : PHILIPPE JACQUES

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech. Le présent document n'engage que son auteur.

**ÉTUDE DE LA SYNERGIE ENTRE CERTAINS
LIPOPEPTIDES SUR LEUR ACTIVITE
CYTOTOXIQUE ET LEUR ACTIVITE
ANTIVIRALE (SUR LE SARS-COV-2).**

SARAH DETOURNAY

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER
BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIE**

ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023

PROMOTEUR : PHILIPPE JACQUES

Remerciements

Pour la réalisation de ce travail, qui représente l'aboutissement de cinq ans d'études à Gembloux Agro-Bio Tech, j'ai eu la chance de bénéficier de l'aide, du soutien et des conseils de nombreuses personnes.

Je remercie tout d'abord mon promoteur le Professeur Philippe Jacques ainsi que le post-doctorant Alexis Hoste qui m'ont permis de réaliser mon travail de fin d'études sur ce projet. Professeur Jacques, je vous remercie également pour le suivi au quotidien lors de la réalisation de ce travail ainsi que les nombreux conseils précis et avisés. Post-doctorant Hoste, je voulais vous remercier car sans vous et vos résultats lors de vos propres recherches, ce projet n'aurait pas vu le jour. De plus je vous remercie pour votre suivi au quotidien, votre disponibilité et votre savoir notamment pour les protocoles.

Bien évidemment, je remercie le Professeur Magali Deleu et le Professeur Garigliany Mutien-Marie pour m'avoir permis d'utiliser vos infrastructures mais aussi certaines matières premières nécessaires à l'élaboration de mon travail de fin d'études. Je vous remercie également pour votre écoute lors de nos entretiens et de vos conseils pertinents pour la bonne continuité de mon projet.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes m'ayant aidé lors de mes laboratoires, Germain pour l'aide apportée lors des préparations des cellules, l'équipe du Professeur Willems pour m'avoir permis d'utiliser leur hotte mais également toutes les personnes travaillant au laboratoire de MIPI.

Enfin, je remercie ma famille et mes ami(e)s qui ont toujours été présents à mes côtés tout au long de mes études et qui sans eux cette expérience n'aurait pas été possible. Je remercie particulièrement mon papa qui a toujours été là pour relire mes travaux et ma maman qui m'a toujours encouragée et poussée à me dépasser.

Résumé

La fengycine, la surfactine et la lichénysine sont des lipopeptides relativement connus pour leurs activités antibactériennes et antifongiques. Cependant, ils possèdent également des activités cytotoxiques et antivirales qui ont été étudiées dans ce travail. De plus, une analyse de la synergie développée entre les lipopeptides et l'action que cela a sur leurs différentes activités ont été étudiées. Il a été montré que la lichénysine est le lipopeptide le plus cytotoxique alors que la fengycine est le moins cytotoxique. Un mélange équimolaire entre la fengycine et la surfactine permet de réduire la cytotoxicité de la surfactine. Néanmoins, les mélanges restent tous légèrement plus cytotoxiques que la fengycine seule. Ces résultats montrent qu'une synergie est développée entre la fengycine et la surfactine. En ce qui concerne l'activité antivirale, la surfactine et la lichénysine ont la capacité de réduire fortement la concentration en ARN viral présente dans un milieu. Cependant, celle-ci est fortement corrélée à la baisse de viabilité des cellules. Un mélange fengycine-surfactine et fengycine-lichénysine permet de distinguer plus fortement l'activité antivirale de l'activité cytotoxique de ces lipopeptides.

Mots clés : lipopeptides, fengycine, surfactine, lichénysine, activité cytotoxique, activité antivirale, synergie, SARS-CoV-2.

Abstract

Fengycin, surfactin and lichenysin are lipopeptides that are relatively well known for their antibacterial and antifungal activities. However, they also possess cytotoxic and antiviral activities, which were studied in this work. In addition, an analysis of the synergy developed between the lipopeptides and the action this has on their different activities was studied. It was shown that lichenysin is the most cytotoxic lipopeptide, while fengycin is the least cytotoxic. An equimolar mixture of fengycin and surfactin reduces the cytotoxicity of surfactin. However, the mixtures are all slightly more cytotoxic than fengycin alone. These results show that a synergy was developed between fengycin and surfactin. As far as antiviral activity is concerned, surfactin and lichenysin have the ability to significantly reduce the concentration of viral RNA present in a medium. However, this is strongly correlated with the fall in cell viability. A mixture of fengycin-surfactin and fengycin-lichenysin makes it possible to distinguish more clearly between the antiviral and cytotoxic activity of these lipopeptides.

Keywords: lipopeptides, fengycin, surfactin, lichenysin, cytotoxic activity, antiviral activity, synergy, SARS-CoV-2.

Table des matières

I.	INTRODUCTION	5
II.	ÉTAT DE L'ART	6
A.	LIPOPEPTIDES.....	6
1.	<i>BIOSYNTHÈSE DES LIPOPEPTIDES</i>	6
2.	<i>BIODIVERSITÉ</i>	7
a)	Surfactines.....	7
b)	Fengycines	7
c)	Iturines.....	8
3.	<i>PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES</i>	8
a)	Activité de surface.....	9
b)	Auto-assemblage.....	9
c)	Complexation ionique.....	9
4.	<i>ACTIVITÉS BIOLOGIQUES</i>	10
a)	Activité antibactérienne et antifongique	10
b)	Cytotoxicité	10
c)	Activité antivirale.....	11
d)	Autres	11
B.	SARS-COV-2.....	11
1.	<i>ORIGINE</i>	11
2.	<i>STRUCTURE ET GÉNOME</i>	12
3.	<i>RÉPLICATION VIRALE</i>	12
C.	ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES LIPOPEPTIDES CONTRE LE SARS-COV-2.....	13
III.	OBJECTIFS.....	14
IV.	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	15
A.	CELLULES	15
B.	LIPOPEPTIDES.....	15
C.	CYTOTOXICITÉ.....	15
D.	INCUCYTE S3.....	16
E.	PRÉTRAITEMENT.....	16
F.	DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE (DLS)	16
G.	RÉPLICATION VIRALE	17
H.	EXTRACTION DE L'ARN ET RT-QPCR.....	17
V.	RÉSULTATS & DISCUSSIONS.....	18
A.	CYTOTOXICITÉ DES FENGYCINE, SURFACTINE ET LICHÉNYSINE.....	18
B.	ANALYSE DE LA CYTOTOXICITÉ DE LA FENGYCINE-SURFACTINE ET DE LA FENGYCINE-LICHÉNYSINE	19
1.	<i>CONCENTRATION DU LIPOPEPTIDE LE PLUS CYTOTOXIQUE FIXE</i>	19
2.	<i>CONCENTRATION TOTALE DES LIPOPEPTIDES FIXE</i>	23
C.	ANALYSE DE LA SYNERGIE.....	27
1.	<i>ANALYSE DES CELLULES DANS UN INCUCYTE S3</i>	27
2.	<i>PRÉTRAITEMENT PAR LA FENGYCINE</i>	29
3.	<i>ANALYSE DES STRUCTURES FORMÉES PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE</i>	31
D.	DISTINCTION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE.....	33
VI.	CONCLUSION	38
VII.	BIBLIOGRAPHIE	39
VIII.	ANNEXES	46

Tables des figures

Figure 1 : a) structure du virion du SRAS-CoV-2 et b) cycle de réplication du SARS-CoV-2 [13].	13
Figure 2 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de fengycine A.	18
Figure 3 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de surfactine.	18
Figure 4 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de lichénysine.....	19
Figure 5 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 60 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.	20
Figure 6 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 65 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.	21
Figure 7 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 70 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.	21
Figure 8 : Graphiques de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est fixe et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.....	22
Figure 9 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en lichénysine est de 40 µg/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.	22
Figure 10 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est A) de 25 µg/mL et B) de 50 µg/mL.....	24
Figure 11 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est de 75 µg/mL.	25
Figure 12 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est fixée.....	25
Figure 13 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est A) de 12,5 µg/mL et B) de 25 µg/mL.....	26
Figure 14 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est de 50 g/mL.	27
Figure 15 : Graphique de l'évolution de l'aire moyenne de cellules durant 72h en présence ou non de fengycine.	28
Figure 16 : Graphiques de l'évolution A) du nombre de cellules et B) de la confluences des cellules durant 72h en présence ou non de fengycine.	29
Figure 17 : Viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine où les courbes représentent en bleu : l'ajout simultané des deux lipopeptides, en brun : le prétraitement des cellules par de la fengycine pendant 1h avant l'ajout de surfactine, en vert : le prétraitement des cellules par de la fengycine pendant 24h avant l'ajout de surfactine. La concentration totale en lipopeptide pour chaque expérience est de 75 µg/mL.....	30
Figure 18 : Graphique représentant les IC50 de la surfactine, de la fengycine-surfactine, du prétraitement par la fengycine de 1h avant l'ajout de surfactine et du prétraitement par la fengycine de 24h avant l'ajout de surfactine. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test).	30
Figure 19 : Graphiques montrant la taille de la distribution pour A) de la fengycine à 75 µg/mL et pour B) de la surfactine à 75 µg/mL en fonction de l'intensité. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon.	32
Figure 20 : Graphiques montrant la taille de la distribution pour une concentration de lipopeptides totales de 75 µg/mL d'un mélange de fengycine et de surfactine au ratio A) 1 : 1	

et **B**) 1 : 2. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon. 32

Figure 21 : Graphique montrant la taille de la distribution pour une concentration de lipopeptides totales de 75 µg/mL d'un mélange de fengycine et de lichénysine au ratio 1 : 1. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon. 33

Figure 22 : **A**) graphique de viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine au ratio 1 : 1 ; **B**) graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de surfactine au ratio 1 : 2 ; **C**) graphiques des IC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 1, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 2 et de la surfactine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test)..... 34

Figure 23 : **A**) graphique de l'activité antivirale de la fengycine et de la surfactine au ratio 1 : 1 ; **B**) graphiques de l'activité antivirale de la fengycine A et de la surfactine au ratio 1 : 2 ; **C**) graphiques des EC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 1, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 2 et de la surfactine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test) 35

Figure 24 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine au ratio 1 : 1 et graphiques des IC50. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test) 36

Figure 25 : Graphiques de la concentration en ARN viral en présence de fengycine A et de lichénysine au ratio 1 : 1 et graphiques des EC50. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test) 37

Tables des tableaux

Tableau 1 : Calcul des indices de sélectivités (IS).....	37
Tableau 2 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 60 µg/mL.	46
Tableau 3 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 65 µg/mL.	46
Tableau 4 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 70 µg/mL.	47
Tableau 5 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 75 µg/mL.	47
Tableau 6 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de lichénysine est de 40 µg/mL.	48
Tableau 7 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 25 µg/mL.	48
Tableau 8 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 50 µg/mL.	48
Tableau 9 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 75 µg/mL.	49
Tableau 10 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 100 µg/mL.	49
Tableau 11 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 12,5 µg/mL.	49
Tableau 12 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 25 µg/mL.	50
Tableau 13 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 50 µg/mL.	50
Tableau 14 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine au ratio 1 : 1.	50
Tableau 15 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine au ratio 1 : 2.	51
Tableau 16 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine au ratio 1 : 1.	51

I. INTRODUCTION

Les bactéries sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires et notamment des lipopeptides ayant diverses activités. Un lipopeptide est généralement composé d'une fraction hydrophile peptidique et d'une chaîne d'acide gras lipophile. Les lipopeptides sont donc des composés amphiphiles appelés biosurfactants [1-2]. La chaîne d'acide gras peut être de différentes longueurs et peut être β -hydroxylée, β -aminée ou guanylée. Ces molécules tensioactives contiennent plusieurs fonctions physiologiques utilisées dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques ou pétrolières ou encore en agriculture [3]. De plus, la demande de tensioactifs respectueux de l'environnement et biodégradables est en constante augmentation. Les biosurfactants microbiens sont particulièrement intéressants pour leurs propriétés antimicrobiennes, cytotoxiques, antitumorales, immunodépressives et tensioactives [4]. Le mode d'action des lipopeptides est notamment la formation des pores dans les membranes microbiennes, entraînant un déséquilibre des flux ioniques transmembranaires [4]. En raison de leur effet sur les membranes, certains lipopeptides sont également connus pour inactiver des virus à ADN et à ARN enveloppés [5-7]. Cependant, il existe un nombre assez limité de publications distinguant l'activité cytotoxique des lipopeptides de l'activité antivirale.

Néanmoins, cette activité antivirale peut s'avérer particulièrement intéressante. En effet, ces deux dernières décennies ont été rythmées par trois grandes épidémies zoonotiques de bêta-coronavirus [8]. La première fut régie par le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV), la seconde par le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) [9] et enfin le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) [10].

Le coronavirus est un virus issu de l'ordre des *Nidovirales*, du sous-ordre des *Coronavirineae* et de la famille des *Coronaviridae* [11]. Les coronavirus possèdent un génome à simple brin d'ARN de sens positif et leur nom est issu de leur forme particulière. Ce sont des virus entourés de glycoprotéines S formant une structure en « couronne ». Ces glycoprotéines permettent au virus de se lier au récepteur de la cellule hôte et de fusionner aux membranes virales et cellulaires [12]. Le virus peut ensuite exprimer et répliquer son ARN génomique afin d'infecter d'autres cellules [13]. Plusieurs mécanismes de prévention ont vu le jour afin de contenir le virus notamment par la création de vaccin. Cependant, il y a toujours un besoin de nouvelles molécules antivirales contre le SARS-CoV-2 afin de réduire d'avantage la transmission virale et cibler un plus grand nombre d'étape du cycle de répllication du SARS-CoV-2.

Ce travail de fin d'études consiste à analyser la synergie entre certains lipopeptides et le potentiel changement de leur activité cytotoxique et antivirale contre des cellules Vero E6 infectées par le SARS-CoV-2. Ce travail nécessite l'établissement de trois objectifs principaux, à savoir : (1) analyser le comportement cytotoxique des lipopeptides utilisés dans cette étude : la fengycine, la surfactine et la lichénysine ; (2) analyser la synergie et l'activité cytotoxique lorsque les lipopeptides sont mis deux à deux ; (3) analyser l'activité antivirale contre le SARS-CoV-2 des lipopeptides en la distinguant de l'activité cytotoxique.

II. ÉTAT DE L'ART

A. LIPOPEPTIDES

Bacillus sp. est une source remarquable de lipopeptides bioactifs. Les lipopeptides de *Bacillus* sp. sont maintenant divisés en trois familles principales : surfactine, fengycine et iturine [11] auxquelles viennent s'ajouter la kurstakine et la locillomycine moins étudiées. Le mécanisme de synthèse des lipopeptides permet une grande diversité au sein même de chaque famille. Cette diversité implique que leurs propriétés s'en trouvent plus ou moins accentuées.

1. BIOSYNTHÈSE DES LIPOPEPTIDES

Les lipopeptides sont, pour la plupart, cyclisés ou partiellement cyclisés. Les lipopeptides cycliques (LPC) ne sont pas synthétisés par voie ribosomale mais par des synthétases peptidiques non ribosomales (NRPS) à l'aide de polykétides synthases (PKS) dans le cas de l'iturine ou de la locillomycine. Ce sont des protéines multi-enzymatiques constituées de modules répétés divisibles en domaines portant chacun une activité enzymatique particulière [14]. Chaque module incorpore un acide aminé spécifique dans un squelette peptidique. L'ordre des modules est généralement corrélé à la séquence peptidique du produit [15]. Les modules sont divisés en modules d'initiation et d'allongement contenant chacun plusieurs activités responsables de la biosynthèse des lipopeptides.

Les modèles d'initiation sont constitués d'un domaine d'adénylation (A), d'un domaine de thiolation (T ou PCP) et d'un domaine de condensation (C). Le domaine A est responsable de la reconnaissance et de l'adénylation des acides aminés. Plusieurs domaines A possèdent une faible spécificité et permettent une diversité au sein de chaque famille de lipopeptides. Le domaine T permet la thioestérification de l'acide aminé, activé par le domaine A. Il sert donc à fixer l'acide aminé sur la synthétase de manière covalente par un lien thioester. Enfin, le domaine C crée une liaison peptidique entre le peptide et les acides aminés des modules adjacents. Les modules d'élongation contiennent les domaines A, T et C. Le dernier module est fini par un domaine thioestérase (TE). Ce domaine est nécessaire à la libération du peptide ainsi que sa cyclisation. Cependant, certains modules possèdent des domaines secondaires. Il est possible de retrouver un domaine d'épimérisation (E) qui transforme les acides aminés L en leur isomère D. Il existe aussi un domaine de cyclisation (Cy) qui forme des cycles au sein des peptides non ribosomiaux ou encore un domaine de réduction (R) qui réduit l'acide aminé fixé sur le domaine T voisin. Enfin, il existe encore trois autres domaines secondaires, le domaine d'oxydation (Ox), le domaine de méthylation (M) et le domaine de formylation (F) [15-19].

La biosynthèse des lipopeptides d'iturine nécessite l'aide d'une synthase de polykétide (PKS) afin d'ajouter un acide gras au groupement peptidique formé par NRPS. Les PKS ont la particularité d'activer des acides carboxyliques de petite taille (acétate ou malonate). Les domaines AL, ACP, KS et AMT sont responsables des dernières étapes de la biosynthèse de l'iturine. Le domaine acétyltransférase (AT) reconnaît l'acide carboxylique et l'active. Le domaine kétosynthase (KS) quant à lui, condense le substrat sur la chaîne. Le domaine AMT est

responsable du transfert d'une amine à la position β de la chaîne acyle croissante. Enfin, le domaine AL (acyl-CoA ligase) active et libère l'acide gras [14].

2. **BIODIVERSITÉ**

Comme dit précédemment, les lipopeptides de *Bacillus* sp. peuvent être divisés en trois grandes familles : surfactine, fengycine et iturine. Une certaine biodiversité peut apparaître au sein de chaque famille notamment due à la faible spécificité du domaine d'adénylation, du substrat présent dans le milieu de culture, de la taille et de l'isomérisation de la chaîne d'acide gras.

a) **Surfactines**

La surfactine est isolée par Arima et al. en 1968 comme étant un biosurfactant produit par *Bacillus* [20]. La surfactine est un heptapeptide cyclique fermé avec une chaîne d'acide gras β -hydroxy [21]. Cette structure implique à la surfactine d'être amphiphile lui conférant une activité tensioactive ainsi que plusieurs activités biologiques. Sa conformation en « selle de cheval » lorsqu'elle se trouve en solution accentue ces activités. La biosynthèse des surfactines est catalysée par un grand complexe multienzymatique non ribosomal composé de quatre blocs de construction modulaires : SrfAA, SrfAB, SrfAC, SrfAD [21].

La séquence typique de la surfactine est L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu [23]. Il existe cependant des homologues qui se différencient par leur séquence peptidique mais faisant toujours partie de la famille des surfactines. On y retrouve la lichenysine qui possède un résidu glutamine en position 1 à la place de l'acide glutamique. La pumilacidine a un résidu leucine en position 4 et un résidu isoleucine en position 7 au lieu d'un résidu valine et d'un résidu leucine. Des variants peuvent être naturellement obtenus par des souches spécifiques, par la non spécificité du domaine A, par une non cyclisation ou encore par une linéarisation du lipopeptide [23-24]. Outre les modifications de la chaîne peptidique, il est possible d'avoir une variation de la longueur de la chaîne d'acide gras allant de 12 à 17 atomes de carbone et de son isomérisation *n*, *iso* ou *anteiso* [14].

b) **Fengycines**

Les fengycines ou plipastatines sont des lipodécapéptides cycliques contenant un acide gras β -hydroxylé avec une chaîne latérale de 14 à 19 atomes de carbone. La fengycine est synthétisée de manière non ribosomique par 5 fengycines synthétases : FenC, FenD, FenE, FenA et FenB. Chaque enzyme possède un ou plusieurs modules, eux-mêmes divisés en plusieurs domaines [25]. Les trois premières enzymes contiennent chacune deux modules. FenC contient FenC1 et FenC2 qui activent respectivement l'acide glutamique et l'ornithine [26]. L'enzyme FenD contient FenD1 et FenD2 qui permettent d'activer respectivement L-Tyr et L-Thr. L'acide aminé L-Thr est ensuite converti en D-*allo*-Thr [27]. FenE contient fenE1 qui active un nouvel acide glutamique et fenE2 qui est, quant à lui, moins spécifique et permettant la formation de deux fengycines différentes. FenE2 peut activer de la valine et créer de la fengycine B ou il peut activer de l'alanine pour créer de la fengycine A [28]. L'enzyme FenA contient quant à elle trois

modules : FenA1, FenA2 et FenA3. Ils permettent d'activer respectivement une proline, une glutamine et une tyrosine [14]. Enfin, FenB est impliquée dans l'activation du dernier acide aminé, isoleucine, et dans la libération de la molécule de fengycine. Il est aussi responsable de la formation d'une liaison ester entre le troisième et le dernier acide aminé permettant la formation d'un cycle lactone [29].

Les fengycines sont produites sous la forme d'un mélange d'isoformes dont la composition en acides aminés de la fraction peptidique varie ainsi que la longueur et la ramification de l'acide gras β -hydroxylé. Les conditions de culture de la souche peuvent aussi impacter la quantité et la structure des lipopeptides produits [30].

c) Iturines

La famille des iturines est constituée de lipoheptapeptides liés à un acide gras β -aminé lié à une chaîne carbonée de 14 à 17 atomes de carbone [31]. Il existe différents homologues de lipopeptides au sein de la famille des iturines mais qui conservent deux caractéristiques. Tous les composés de la famille des iturines possèdent une séquence chirale LDDLLDL avec les trois mêmes premiers acides aminés : Asn, Tyr et Asn. Les iturines, les mycosubtilines et les bacillomycines font partie de la famille des iturines [32]. Ce sont les quatre derniers acides aminés ainsi que l'opéron codant pour le lipopeptide qui détermineront quelle sorte d'iturine est produite. En outre, la classification de chaque molécule dépendra également de la longueur de la chaîne d'acides gras [33].

Comme dit précédemment, les iturines ont besoin de l'aide de polykétides synthases (PKS) afin d'être synthétisées par NRPS. Cependant, les opérons changeront en fonction du lipopeptide produit. L'opéron codant pour l'iturine A est composé de quatre gènes : ituD, ituA, ituB et ituC. Le gène ituD est spécifique à l'iturine A car il code pour une malonyl coenzyme A transacylase putative [32]. L'opéron codant la mycosubtiline est synthétisé par fenF, mycA, mycB et mycC [34]. Quatre gènes sont nécessaires pour coder l'opéron de la bacillomycine, bamD, bamA, bamB et bamC [35].

3. PROPRIÉTÉS PHYSICOCIMIQUES

En raison de leur structure amphiphile, les lipopeptides possèdent des propriétés physico-chimiques intéressantes. Ils sont avant tout connus pour être des biosurfactants capables de diminuer la tension superficielle et interfaciale. Ils sont aussi capables de s'adsorber à la surface des membranes perturbant la cellule cible. Ces tensioactifs peuvent être utilisés comme émulsifiant, dispersant ou encore agent moussant [36].

Les lipopeptides possèdent une grande diversité structurale. En fonction de la longueur de leur chaîne hydrophobe, de leur charge ou encore de leur forme cyclique ou linéaire, les lipopeptides n'auront pas tous les mêmes propriétés avec la même intensité.

a) Activité de surface

Les tensioactifs sont des substances capables de s'adsorber et modifier les conditions prévalant aux interfaces [37]. L'efficacité d'un tensioactif est déterminée par sa capacité à abaisser la tension superficielle mesurée comme étant l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour amener une molécule de la phase brute à la surface. La tension superficielle est en corrélation avec la concentration micellaire critique (CMC) qui est donc la concentration minimale pour initier la formation de micelles. La CMC est fortement influencée par le pH, la température, le type de charge présent sur le tensioactif mais aussi la solubilité et le comportement physico-chimique de celui-ci [38-39].

Les biosurfactants sont globalement plus efficaces que les surfactants chimiques car ils réduisent la tension superficielle à une CMC plus faible. Le lipopeptide est capable de réduire la force intermoléculaire entre les molécules [40]. Il est possible d'observer une forte variabilité dans le pouvoir tensioactif des lipopeptides au sein même des familles. En effet, la longueur et la ramification des chaînes alkyles influencent la tension de surface. La tension superficielle a tendance à diminuer plus fortement avec l'hydrophobicité de la chaîne alkyle [39]. La position et la charge des acides aminés influencent aussi le pouvoir tensioactif des lipopeptides.

Les lipopeptides sont aussi capables de s'adsorber à la surface de certains solides [40-41] ou à la surface de leurs bactéries productrices entraînant une modification de leur hydrophobicité [42].

b) Auto-assemblage

En plus de s'organiser en micelle, les lipopeptides sont capables de s'auto-assembler dans les milieux aqueux pour former des nanostructures supramoléculaires. Un auto-assemblage est possible grâce aux propriétés amphiphiles des lipopeptides et des interactions entre les unités peptidiques [43]. La capacité d'agrégation des lipopeptides peut être déterminée par la concentration critique d'agrégation (CAC) qui est donc la concentration minimale nécessaire pour que les lipopeptides s'agrègent [44]. On parle donc de CMC pour indiquer la concentration au-dessus de laquelle les lipopeptides peuvent s'auto-assembler en micelles sphériques et de CAC lorsque les lipopeptides peuvent s'auto-assembler en toutes autres structures que des micelles (par exemple en nanofibrilles).

L'augmentation de la longueur de la chaîne acyle des lipopeptides a tendance à diminuer la capacité d'agrégation des lipopeptides. La charge portée par la tête amphiphile influence aussi les valeurs de CAC des lipopeptides [45].

c) Complexation ionique

En fonction des acides aminés constituant les lipopeptides, ceux-ci peuvent développer une charge. Cette charge implique que les lipopeptides sont capables de lier des ions. Cette capacité est généralement recherchée pour décontaminer les sols ou les eaux pollués de métaux lourds.

Le biosurfactant a la capacité de former des micelles de charge opposée à l'ion métallique. La coordination du métal avec le tensioactif modifie la charge ionique et la conformation moléculaire ce qui induit un changement de phase. Le métal lourd est ainsi récupéré du milieu grâce à la formation de ce micelle. La formation de ces complexes permet aussi d'augmenter la capacité d'auto-assemblage des lipopeptides [39,45-47].

4. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Les lipopeptides sont capables d'interagir avec les membranes biologiques. Les interactions sont généralement dues à une interaction lipides-lipides. Suite à ces interactions, la membrane est perturbée et la formation de pore peut se produire. Suite à ça, il peut y avoir une fuite du cytosol ou la mort cellulaire [48].

a) *Activité antibactérienne et antifongique*

Les activités antibactériennes ou antifongiques sont de bons moyens de se rendre compte de cette activité biologique développée par les lipopeptides. La fengycine est relativement connue pour son activité antifongique notamment contre le *Fusarium graminearum* ou encore le *Rhizopus stolonifer*. La fengycine est capable d'interagir avec les stérols et les molécules phospholipides dans la membrane des cellules fongiques altérant ainsi la membrane et la perméabilisant [49-50]. En plus de leur activité individuelle sur certains pathogènes ou champignons, il est possible de développer une synergie entre les lipopeptides. La surfactine et la fengycine présentent un effet inhibiteur de la croissance de *Phytophthora infestans* [51]. L'iturine est un antifongique *in vitro* et *in vivo* remarquable mais son activité antibactérienne est relativement limitée. La fongibilité des iturines repose sur leurs propriétés de perméabilisation membranaire. Cependant, cette perméabilisation résulte de la perturbation osmotique due à la formation de pores conducteurs d'ions. Des traits structurels tels que la longueur de la chaîne d'acide gras, la présence d'un asparagine en position 1 ou un résidu de tyrosine en position 2 sont importants pour l'activité antifongiques [52].

La surfactine possède quant à elle une large gamme d'activité antibactérienne due à sa capacité à perturber et perméabiliser les membranes. L'activité antibactérienne a tendance à augmenter lorsque le lipopeptide possède une chaîne carbonée de 10 à 12 carbones. La polymixine possède également une activité bactéricide. Elle est capable de se lier aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négatives par interaction électrostatique. Cette interaction conduit à une inhibition de la synthèse de la membrane externe [53].

b) *Cytotoxicité*

Étant donné que les lipopeptides sont capables d'affecter les membranes cellulaires, ils peuvent devenir toxiques pour les cellules à des concentrations élevées. Sa toxicité est donc directement liée à sa capacité à pénétrer dans la membrane à de faibles concentrations [54].

La diversité des structures des lipopeptides a aussi un rôle dans leur capacité à être cytotoxique ou non. En effet, la surfactine a tendance à être plus cytotoxique si sa chaîne d'acides gras est grande. Cela est dû au fait que la taille de la chaîne d'acides gras se rapproche de la taille des chaînes acyles présentes sur la membrane [55]. La forme cyclique des lipopeptides pour certains analogues de surfactine est nécessaire pour conserver l'activité d'hémolyse. Les charges auraient aussi un impact sur la capacité hémolytique des lipopeptides mais dans une moindre mesure que la forme de la molécule [54].

c) *Activité antivirale*

Le lipopeptide le plus connu pour une activité antivirale est la surfactine. La surfactine est capable d'inactiver une large gamme de virus enveloppés tels que l'herpès simplex virus 1 (HSV-1) et HSV-2, le virus de la maladie de Newcastle ou encore le parvovirus porcin [56]. Plusieurs paramètres vont intervenir dans sa capacité à inactiver les virus. Tout d'abord, la concentration de la surfactine joue un rôle. À forte concentration, la surfactine aura tendance à désintégrer l'enveloppe lipidique du virion. Cependant, à plus faible concentration, la surfactine agit plutôt comme un inhibiteur de fusion membranaire grâce à son insertion dans la membrane virale [5]. De plus, la composition de l'enveloppe virale va impacter la capacité du lipopeptide à s'y insérer. Le nombre d'atomes de carbone présents sur la chaîne d'acides gras et la charge de la fraction peptidique influencent aussi l'activité antivirale de la surfactine [6,57-58].

d) *Autres*

Les lipopeptides possèdent encore de nombreuses activités telle qu'induire la résistance systémique des plantes. Cette capacité est fortement liée à la structure des lipopeptides. Les lipopeptides portant une plus longue chaîne carbonée et ayant une forme cyclique ont tendance à induire plus fortement la résistance de la plante [59-60].

Ils peuvent également avoir une activité anti-inflammatoire en inhibant sélectivement un ou plusieurs gènes responsables de l'inflammation [61]. Certains lipopeptides sont aussi dotés d'une activité immunomodulatrice [62] ou encore jouent un rôle dans la formation de biofilm [63].

B. SARS-COV-2

Le SARS-CoV-2 a provoqué une pandémie dont l'impact économique est sans précédent. Son émergence signe la troisième épidémie zoonotique d'une sorte de coronavirus touchant la population humaine.

1. ORIGINE

Le coronavirus est un virus à ARN faisant partie de la famille des *Coronaviridae* et de la sous-famille des *Coronavirinae*. Il a été signalé pour la première fois à Wuhan, en Chine en décembre

2019 [10]. Le SARS-CoV-2 s'est rapidement propagé à l'échelle mondiale causant une pandémie aux répercussions dévastatrices.

Le covid-19 serait issu d'une émergence d'un coronavirus animal (sarbecovirus, RaTG13, STT182, BANAL-103, coronavirus de *Manis javanica*) ayant subi des mutations. De nombreux coronavirus possèdent un pourcentage d'identité nucléotidique fort soulignant un ancêtre commun. Des hôtes intermédiaires (chauve-souris, pangolin, souris, chien, chat,...) sont nécessaires à l'évolution des coronavirus en SARS-CoV-2. De plus, ce sont des contacts répétés homme-animal qui ont rendu le SARS-CoV-2 transmissible à l'humain [64-66].

2. STRUCTURE ET GÉNOME

Une caractéristique première des CoVs est que ce sont des ARN à sens positif monobrin possédant une protéine nucléocapside (N). Le génome est emballé par une enveloppe associée à trois protéines structurelles. La première protéine est la protéine membranaire (M), la seconde est la protéine spike (S) et la dernière est la protéine d'enveloppe (E). En plus de ces quatre protéines structurelles, le SARS-CoV-2 contient seize protéines non structurelles [67].

3. RÉPLICATION VIRALE

L'entrée du coronavirus dans les cellules hôtes est médiée par la protéine spike qui se lie à l'enzyme humaine de conversion de l'angiotensine A (ACE2) à la surface de la cellule. Cette liaison permet au SARS-CoV-2 d'injecter son génome par endosomes ou par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule. Le génome est ensuite libéré dans le cytoplasme et traduit par les ribosomes de l'hôte en deux polyprotéines pp1a et pp1ab. Ces polyprotéines sont clivées protéolytiquement par les protéases virales en seize protéines non structurelles (nsp1-16). Un complexe de réplication-transcription (RTC) est ensuite formé grâce à certaines de ces protéines non structurelles (nsp2-11). Les autres protéines servent à la réplication/transcription du génome viral à l'intérieur du complexe. Au centre du complexe RTC se trouve nsp12, qui possède le site actif de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. Les protéines nsp7 et nsp8 sont nécessaires à l'activation du site et forment ainsi un complexe RdRp. Les autres protéines non structurelles viennent s'ajouter à ce complexe pour former le complexe RTC. Le brin d'ARN positif est d'abord répliqué en brin d'ARN négatif, celui-ci est utilisé soit pour répliquer un nouveau brin d'ARN positif soit pour la transcription des ARNm sous-génomiques. Des protéines structurelles (S,M,E et N) et des protéines accessoires peuvent être créées grâce à la traduction de ces ARNm sous-génomiques. La protéine nucléocapside s'attache au brin d'ARN positif. Quant aux autres protéines structurelles, elles pénètrent dans le réticulum endoplasmique (RE). Le tout se déplace vers l'appareil de Golgi où les virions s'assemblent, mûrissent et bourgeonnent sous la forme de petites vésicules. Les vésicules sont ensuite libérées dans la région extracellulaire par exocytose de la membrane cellulaire hôte. Les virions peuvent infecter de nouvelles cellules [9,13,67-68].

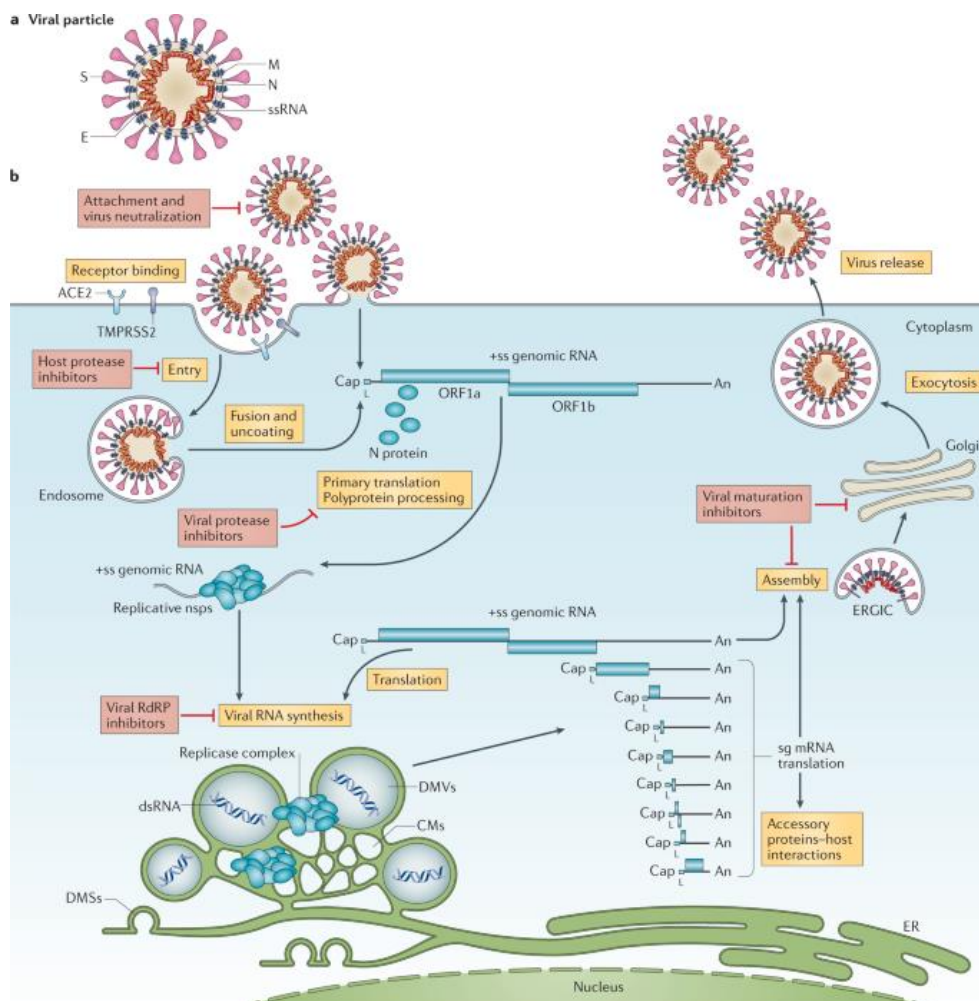


Figure 1 : a) structure du virion du SRAS-CoV-2 et b) cycle de réplication du SARS-CoV-2 [13].

C. ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES LIPOPEPTIDES CONTRE LE SARS-COV-2

À ce jour, plusieurs traitements contre le SARS-CoV-2 ont été développés étant pour la plupart des vaccins à micro ARN [69-71]. Cependant, d'autres composés plus naturels ont aussi été testés contre le SARS-CoV-2 et notamment quelques lipopeptides.

La surfactine aurait potentiellement une activité antivirale contre le SARS-CoV-2. Elle serait capable de bloquer la réplication virale. Cependant, la surfactine doit être mélangée avec le covid-19 avant d'être inoculée sur les cellules. La surfactine aurait un effet perturbateur direct sur l'enveloppe du virion mais serait aussi capable de se lier à la protéine spike et de l'inhiber [5,72-74].

La ferrocine A est capable de se lier à la douzième protéine non structurale (nsp12) formée par le SARS-CoV-2 et qui est nécessaire à la réplication virale. En effet, la nsp12 nécessaire au fonctionnement de la polymérase d'ARN, la liaison entre celle-ci et le lipopeptide inhibe et empêche la réplication de l'ARN viral [75].

III. OBJECTIFS

Les objectifs de cette étude se diviseront en trois axes. Tout d'abord, il est nécessaire d'analyser le comportement cytotoxique des lipopeptides utilisés dans cette étude : la fengycine, la surfactine et la lichénysine.

Le deuxième axe portera sur la synergie entre les lipopeptides. Ce TFE se concentrera uniquement sur le mélange fengycine-surfactine et le mélange fengycine-lichénysine. Cette étude essayera de comprendre l'action de la fengycine sur ces deux lipopeptides. De plus, elle essayera d'identifier si un certain rapport molaire est nécessaire entre les deux pour développer cette synergie.

Pour en finir, le dernier axe se concentrera sur la distinction entre l'activité cytotoxique et l'activité antivirale. L'activité antivirale des lipopeptides est déterminée dans ce cas-ci contre le SARS-CoV-2.

En vue de réussir ces objectifs, différentes étapes devront être entreprises. Premièrement, un test de cytotoxicité pour chaque lipopeptide est effectué. Une détermination de leur IC50 permettra d'avoir une idée de leur cytotoxicité. L'IC50 représente la concentration pour laquelle 50 % des cellules sont encore en vie.

Deuxièmement, différents tests de cytotoxicité sont effectués pour déterminer la différence de cytotoxicité entre les lipopeptides seuls et lorsque les mélanges fengycine-surfactine et fengycine-lichénysine sont faits. Pour cela, différents ratios molaires sont fixés ainsi que la concentration de la surfactine ou de la lichénysine dans les mélanges. Les concentrations sont établies aux alentours de l'IC50 préalablement trouvées auparavant.

Troisièmement, la concentration totale en lipopeptides est maintenant fixée. Les concentrations en fengycine, surfactine et en lichénysine sont déterminées par les ratios molaires.

Quatrièmement, il faut essayer de déterminer comment les lipopeptides réagissent entre eux. Pour cela, les tests de cytotoxicité seuls ne permettent pas de mieux comprendre l'interaction entre les lipopeptides. Un test de prétraitement ainsi qu'une analyse des cellules et des structures formées par les lipopeptides sont entrepris.

Enfin, un test de réplication antivirale du SARS-Cov-2 est effectué en parallèle d'un test cytotoxique. Les deux sont nécessaires pour voir si la réduction de la concentration en ARN viral est due à l'activité antivirale des lipopeptides ou si c'est dû à la perte de viabilité des cellules.

IV. MATÉRIELS & MÉTHODES

A. CELLULES

Les cellules sont des cellules épithéliales rénales de *Chlorocebus* sp. (Vero E6). Elles sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) à haute glycémie avec glutamine stable et pyruvate de sodium. Ce milieu est complété par 2% de sérum de bovin foetal décomposé (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂.

B. LIPOPEPTIDES

La fengycine utilisée est issue d'un stock généreusement donné par le Professeur Magali Deleu. Celle-ci est composée d'un mix de fengycine A, B, C et D. Elle contient cependant en majorité de la fengycine A. La masse molaire calculée pour cette fengycine est de 1491,55 g/mol. La surfactine provient de l'entreprise japonaise Kaneka et contient aussi un mix de surfactine. Sa masse molaire est de 1018,76 g/mol. Enfin, la lichénysine a été produite et purifiée par le post-doctorant Alexis Hoste. La lichénysine étant purifiée, il n'y a qu'un seul isoforme. La chaîne carbonée est constituée de 14 carbones et la lichénysine possède une isoleucine en position 7 ce qui lui confère une masse molaire de 1035,70 g/mol.

Les lipopeptides sont dissous et conservés dans des solutions de diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 20 g/L.

C. CYTOTOXICITÉ

Afin de déterminer l'activité cytotoxique des lipopeptides, il faut évaluer la viabilité des cellules. Celle-ci est déterminée à l'aide du test de viabilité cellulaire CyQUANT™ XTT (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fournisseur.

Pour commencer, les expériences sont effectuées dans des plaques 96 puits nunclon delta-treated. Les puits sont remplis par 100 µL d'une solution contenant 200 000 cellules Vero E6/mL, 50 µL de milieu DMEM et 50 µL du mélange de lipopeptides. Les différents mélanges de lipopeptides sont au préalable faits dans des eppendorfs avec les concentrations voulues. Les concentrations utilisées dans les expériences se retrouvent dans les annexes aux tableaux 2 à 16.

Les plaques 96 puits sont ensuite incubées pendant 72h à 37°C. Le kit pour le test de viabilité est ensuite utilisé en suivant les instructions du fournisseur et les plaques sont lues à 450 nm et 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan™ GO Microplate. L'absorbance 450 nm est utilisée pour repérer les cellules vivantes alors que l'absorbance 660 nm est utilisée pour déterminer le bruit de fond.

La viabilité est calculée par :

$$\frac{AT450 - AT660 - AB450}{AC450 - AC660} \times 100\%$$

Où AT450 représente l'absorbance du puits à 450 nm, AT660 l'absorbance du puits à 660 nm, AB450 l'absorbance du puits contenant uniquement du milieu (blanc) à 450 nm, AC450 l'absorbance des puits contenant uniquement des cellules à 450 nm (contrôle) et AC660 l'absorbance des puits contenant uniquement des cellules à 660 nm.

Chaque échantillon est réalisé sous forme de triplicat et la moyenne des absorbances du blanc et des cellules est utilisée dans les calculs.

D. INCUCYTE S3

L'incucyte est utilisé pour le suivi des cellules en temps réel et surveiller la santé et viabilité des cellules. Il permet aussi de voir la migration et l'invasion des cellules. Il fournit également un large éventail d'essais phénotypiques à base de cellules. Pour l'étude, l'incucyte est utilisé afin de visualiser la croissance des cellules et plus particulièrement le phénomène de turgescence des cellules lorsqu'elles sont en présence d'une forte quantité de fengycine. De plus, des masques sont apposés sur les photos afin de calculer l'aire moyenne des cellules, la confluence des cellules et le nombre de cellules. Un masque consiste à appliquer une série d'analyses aux images prises par l'incucyte. Les cellules sont préparées comme pour la cytotoxicité. Cependant, elles sont incubées dans l'incucyte S3 présent dans le laboratoire de biosécurité de niveau 3 (BSL-3) la faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. L'incucyte est programmé pour faire 6 photos par puits et ce, toutes les heures pendant 72h. La température d'incubation est aussi de 37°C.

E. PRÉTRAITEMENT

Le deuxième objectif se concentre sur la synergie entre les lipopeptides et à déterminer comment ils réagissent entre eux. Les tests de cytotoxicité seuls ne permettent pas de mieux comprendre l'interaction entre les lipopeptides. Pour ce faire, des expériences supplémentaires aux tests de cytotoxicité sont nécessaires. Un autre test est un test de prétraitement qui consiste à prétraiter les cellules par de la fengycine avant d'ajouter de la surfactine. Les cellules sont doncensemencées dans des puits avec une concentration 20 000 cellules/puits. Elles sont ensuite traitées par de la fengycine aux concentrations voulues et incubées à 37°C pendant une durée de 1h ou de 24h.

La surfactine est ensuite ajoutée au milieu à la concentration voulue. Enfin, les cellules sont remises dans l'incubateur à 37 °C pour une durée totale d'incubation de 72h.

F. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE (DLS)

La DLS est utilisé afin de déterminer la taille des micelles ou autres structures produites par les lipopeptides dans le milieu DMEM. Dans un eppendorf, le ou les lipopeptides sont mélangés

dans du DMEM afin d'obtenir les concentrations et ratios voulus. 500 mL de la solution sont ensuite transférés dans une Brand semi-micro cuve en quartz. L'appareil est réglé à 37°C pour garder les mêmes conditions que lors de la cytotoxicité et la mesure est répétée trois fois. Les données sont ensuite récupérées sous forme de graphique où la taille des particules par rapport à l'intensité est représentée. La taille moyenne du micelle ou de la structure formée dans la cuve est aussi donnée.

G. RÉPLICATION VIRALE

L'effet antiviral des lipopeptides est testé sur le SARS-CoV-2. C'est une souche 20A/B.1 de SARS-CoV-2 Wuhan isolée sur un patient belge qui est utilisée lors de ces expériences. Le SARS-CoV-2 a été isolé et propagé dans des cellules de Vero E6. Toutes les expériences impliquant le SARS-CoV-2 ont été réalisées dans un laboratoire de niveau de biosécurité 3 (BSL-3).

L'activité antivirale des lipopeptides est déterminée par l'effet sur la réplication du virus. Le protocole est assez similaire à celui de la cytotoxicité. Les cellules vero E6 sontensemencées à 20 000 cellules/puits dans une plaque 96 puits nunclon delta-treated. Elles sont directement incubées avec les concentrations de lipopeptides voulues et infectées par une multiplicité d'infections (MOI) de 0,01. Chaque échantillon est testé en trois exemplaires. Un sérum positif avec un titre de séroneutralisation de 1/1280 dilué 5 fois est utilisé comme témoin positif. Les plaques sont ensuite incubées pendant 72 h à 37 °C. Chaque échantillon est inactivé pendant 30 minutes à 70 °C, avant la quantification de l'ARN viral par RT-qPCR.

H. EXTRACTION DE L'ARN ET RT-QPCR

L'ADN et l'ARN totaux sont extraits des échantillons à l'aide de plaques TANBead OptiPure Viral Auto dans un Maelstrom 9600 en suivant les instructions du fournisseur. Une transcription inversée en une seule étape et une qPCR sont effectuées à l'aide du kit Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR. La RT-qPCR amplifie le gène N2 du SRAS-CoV-2 à l'aide de l'amorce avant du SRAS-CoV-2 N2 (5'-TTACAAACATTGGCCGCAA-3'), de l'amorce inverse du SRAS-CoV-2 N2 (5'-GCGCGACATTCCGAA-3') et de la sonde SARS-CoV-2 N2 (5'-ACAATTTGCCCCAGCTTCAG-3'). La RT-qPCR a été réalisée dans un système de PCR en temps réel StepOneMC ou dans un système de PCR en temps réel QuantStudio 1. Le tout est réalisé en fonction de la température de fusion des amorces et de la sonde fournie par le fournisseur. Le nombre de cycles d'amplification a été fixé à 45 et les résultats ont été considérés comme positifs si le Ct était inférieur à 45. L'amplification de l'ARNm de bêta-actine a été utilisée comme contrôle interne du RT-qPCR.

Afin d'obtenir la concentration en ARN viral/mL, il faut transformer la valeur Ct obtenue par la Rt-qPCR par la formule :

$$10^{(-0,269 \times Ct) + 12,343}$$

V. RÉSULTATS & DISCUSSIONS

A. CYTOTOXICITÉ DES FENGYCINE, SURFACTINE ET LICHÉNYSINE

Différentes concentrations de fengycine sont testées sur des cellules E6 vero afin de déterminer sa cytotoxicité. Il est possible de voir sur la figure suivante l'évolution de la viabilité des cellules en fonction de la concentration en fengycine. L'IC50 de la fengycine composé majoritairement de fengycine A est de $187,6 \pm 130,5 \mu\text{g/mL}$ (**figure2**). L'IC50 correspond à une concentration où la viabilité des cellules vaut 50 %. La fengycine est connue pour être assez peu cytotoxique en raison de sa faible charge.

Viabilité des cellules Vero en présence de Fengycine A

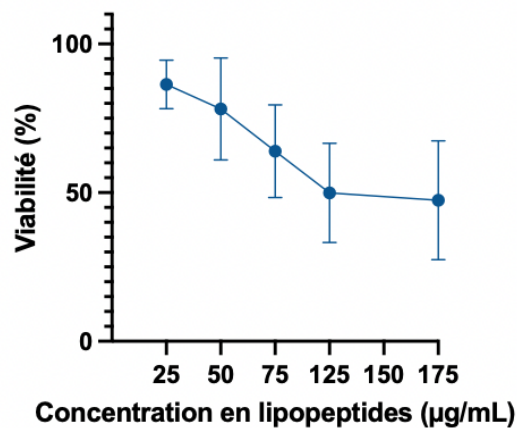


Figure 2 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de fengycine A.

En ce qui concerne la surfactine, des concentrations plus faibles ont été sélectionnées suite à sa plus forte cytotoxicité. L'évolution de la viabilité des cellules en fonction de sa concentration permet aussi de déterminer un IC50. Celui-ci vaut $54,4 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$.

Viabilité des cellules Vero en présence de surfactine

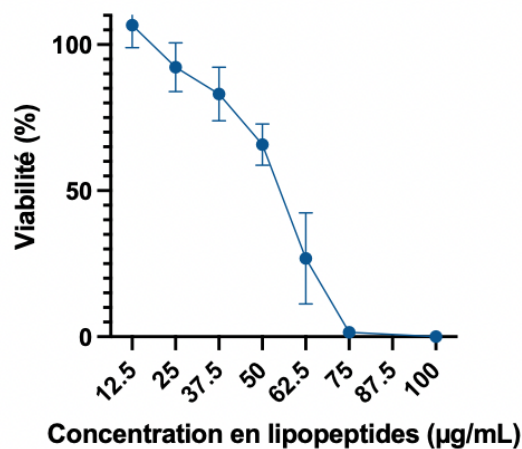


Figure 3 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de surfactine.

Enfin, l'évolution de la viabilité des cellules en fonction de la concentration de lichénysine montre une plus forte cytotoxicité de la lichénysine par rapport à la surfactine. En effet, la lichénysine possède un IC50 de $25,2 \pm 3,0$ $\mu\text{g/mL}$.

Viabilité des cellules Vero en présence de lichénysine

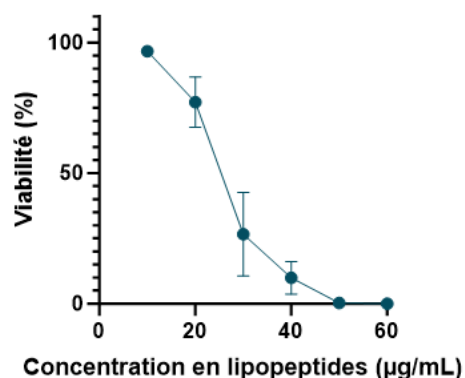


Figure 4 : Graphique de la viabilité des cellules en présence de lichénysine.

La différence entre la fengycine et les deux lipopeptides de la famille des surfactines est importante. Il est possible d'expliquer cela par leur capacité à s'insérer plus ou moins profondément dans la membrane. La fengycine aurait tendance à ne s'insérer que partiellement dans la membrane laissant une partie de sa queue hydrophobe dans le milieu alors que la surfactine aurait tendance à s'insérer complètement. La perturbation la membrane est donc d'autant plus forte avec la surfactine qu'avec la fengycine [55].

Ensuite, la seule différence entre la lichénysine et la surfactine est la présence respectivement de la glutamine à la place de l'acide glutamique en position 1 sur la chaîne peptidique. La présence d'une charge négative supplémentaire expliquerait que la cytotoxicité de la surfactine soit plus faible que la cytotoxicité de la lichénysine [54]. Il a été prouvé que l'ajout de calcium dans le milieu change la conformation de la fengycine et de la surfactine à cause de la présence d'acide glutamique dans leur chaîne peptidique. En plus de changer de conformation, la liaison glutamate-calcium affecte le déplacement chimique des protons et des carbones présents au sein du lipopeptide. Les lipopeptides peuvent donc moins facilement interagir avec la membrane cellulaire. La lichénysine, étant monochargée et ne possédant pas d'acide glutamique, interagirait pas ou moins avec le calcium présent dans le milieu DMEM et serait plus disponible pour s'insérer dans les membranes [76].

B. ANALYSE DE LA CYTOTOXICITÉ DE LA FENGYCINE-SURFACTINE ET DE LA FENGYCINE-LICHÉNYSINE

1. CONCENTRATION DU LIPOPEPTIDE LE PLUS CYTOTOXIQUE FIXE

Le deuxième objectif de cette étude est de déterminer si la surfactine et la lichénysine possèdent un comportement différent en présence de fengycine que lorsqu'elles sont seules.

Pour cet objectif, deux styles d'expériences différentes ont été testées. Dans un premier temps, une concentration fixe en surfactine et lichénysine est déterminée. Ces concentrations sont fixées aux alentours des IC50 calculés au préalable afin de plus facilement observer une augmentation ou non de la viabilité. Pour la fengycine, 7 concentrations différentes sont testées et sont calculées sur base de ratio molaire.

Pour chaque expérience, il est possible d'observer la viabilité des cellules en présence uniquement de la surfactine ou de la lichénysine dans le ratio 0 : 1. Il est également possible d'observer en rouge les viabilités des cellules en présence de la fengycine seule pour chacune de ces différentes concentrations. La fengycine possède une cytotoxicité assez faible par rapport à la surfactine permettant de garder globalement une bonne viabilité des cellules.

Lorsque les cellules sont en présence de 60 µg/mL de surfactine, la viabilité des cellules est seulement de $52,8 \pm 10,8$ %. L'ajout de fengycine permet une augmentation de la viabilité à partir d'un ratio 1 : 5 cependant c'est à partir du ratio 1 : 3 que la viabilité atteint les 70%. En vue de la norme ISO-10993-5, une réduction de la viabilité des cellules excédant les 30% est considéré comme un effet cytotoxique. Les ratios 1 : 3, 1 : 2 et 1 : 1 sont donc considérés non-cytotoxique (**figure 5**).

Viabilité des cellules Vero en présence de 60 µg/mL de Surfactine et différent ratio de Fengycine A

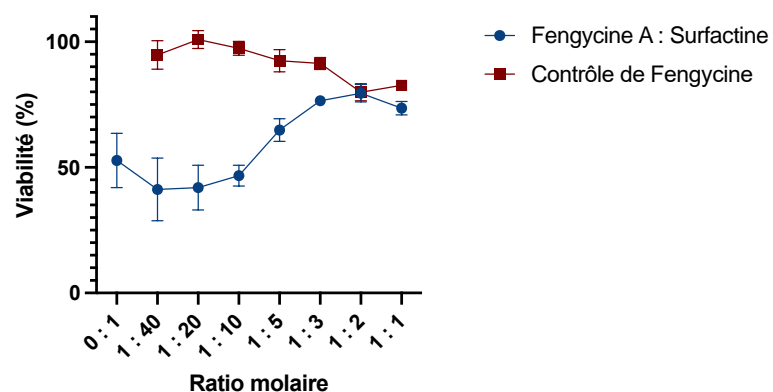


Figure 5 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 60 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.

Ensuite, une concentration fixe de 65 µg/mL de surfactine est testée. La viabilité des cellules juste en présence de surfactine vaut $31,8 \pm 0,4$ %. Il est possible d'observer une augmentation de la viabilité par l'ajout de fengycine dans le milieu. Dans ce cas-ci, la viabilité maximal est atteinte par le ratio molaire 1 : 2 et permet d'avoir une viabilité de $83,7 \pm 2,1$ %. La viabilité des cellules augmente de 1,7 fois grâce uniquement à l'ajout de fengycine (**figure 6**).

Viabilité des cellules Vero en présence de 65 µg/mL de Surfactine et différent ratio de Fengycine A

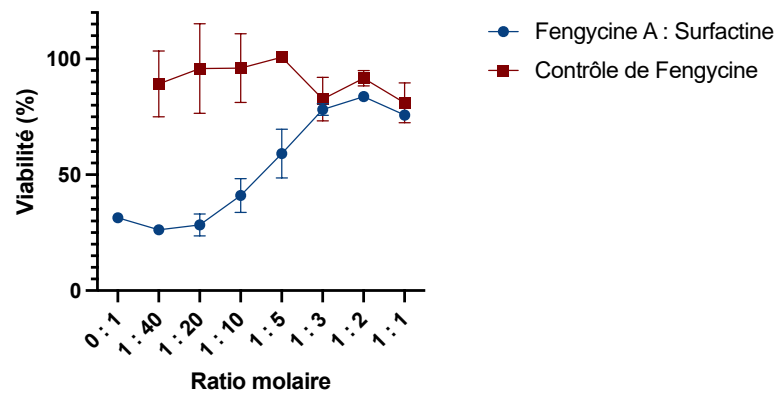


Figure 6 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 65 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.

Lorsqu'une concentration fixe de 70 µg/mL de surfactine est fixée, la viabilité des cellules est normalement de $21,5 \pm 10,2$ %. La viabilité maximale atteinte pour cette expérience est de 79,2843 % pour le ratio 1 : 1. Dans ce cas-ci seule les ratio 1 : 2 et 1 : 1 sont considérés non-cytotoxique (figure 7).

Viabilité des cellules Vero en présence de 70 µg/mL de Surfactine et différent ratio de Fengycine A

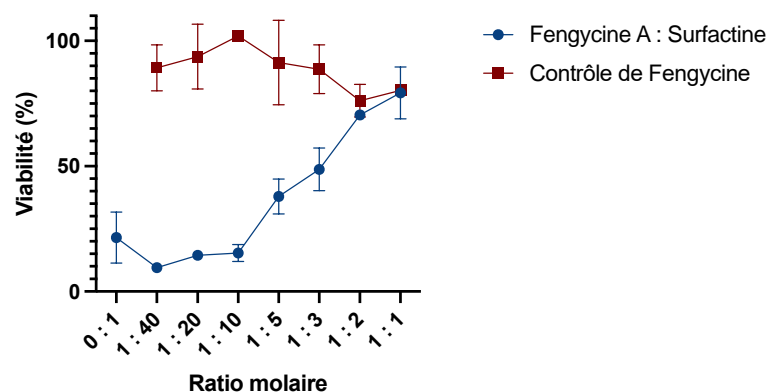


Figure 7 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est de 70 g/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.

Enfin, pour 75 µg/mL de surfactine, seul le ratio 1 : 1 permet une augmentation significative de la viabilité des cellules. La viabilité est juste en dessous des 70%, le ratio ne peut donc pas être considéré comme non-cytotoxique. Le résultat reste tout de même très intéressant car aucune cellule n'est vivante à une telle concentration de surfactine seule (figure 8).

Viabilité des cellules Vero en présence de 75 µg/mL de Surfactine et différent ratio de Fengycine A

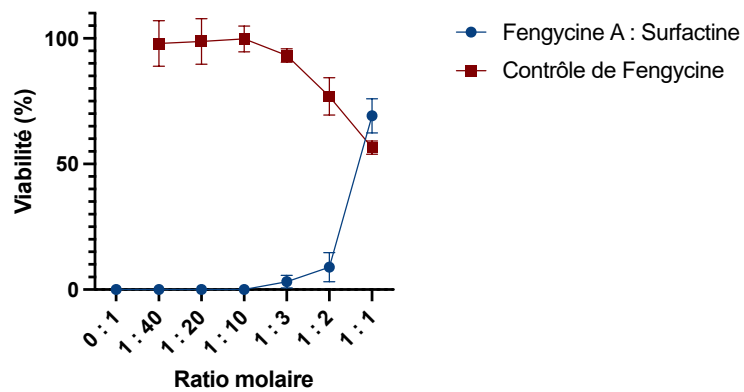


Figure 8 : Graphiques de la viabilité des cellules lorsque la concentration en surfactine est fixe et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.

Globalement, il est possible de voir que pour une concentration plus faible en surfactine, la viabilité la plus forte est atteinte pour un ratio 1 : 2. Alors que pour des concentrations plus importantes, il faut avoir un ratio 1 : 1 pour atteindre une bonne viabilité. Toutefois, il est assez difficile d’atteindre un mélange dit non-cytotoxique dû à la forte concentration totale de lipopeptides dans le milieu. En effet, pour les concentrations fixes à 70 µg/mL et 75 µg/mL au ratio 1 : 1, on a une concentration réelle de 172,5 µg/mL et 184,8 µg/mL.

Pour la lichénysine, seule une concentration fixe de 40 µg/mL est étudiée avec les mêmes 8 ratios. La lichénysine étant plus cytotoxique que la surfactine, il est nécessaire d’atteindre un équilibre équimolaire afin d’observer l’effet protecteur de la fengycine sur les cellules. Il est possible d’observer sur la figure 9 une augmentation de 3,4 fois pour atteindre une viabilité de $90,6 \pm 6,0$ % au ratio 1 : 1.

Viabilité des cellules Vero en présence de 40 µg/mL de Lichénysine et différent ratio de Fengycine A

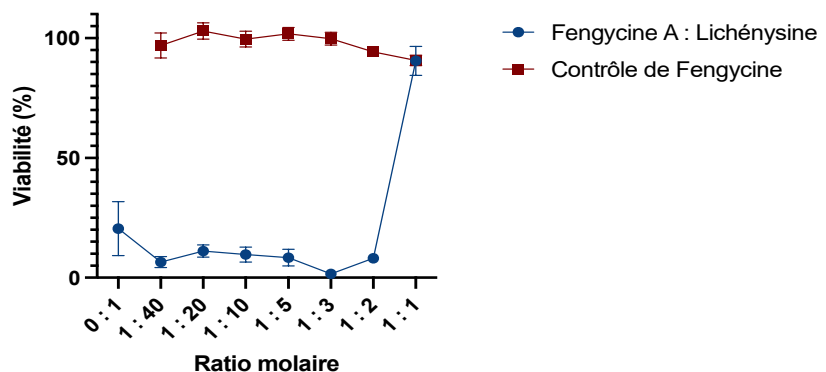


Figure 9 : Graphique de la viabilité des cellules lorsque la concentration en lichénysine est de 40 µg/mL et la concentration en fengycine A évolue en fonction des ratios.

Ces expériences permettent donc de mettre en évidence la capacité de la fengycine à protéger les cellules face à la cytotoxicité plus importante de la surfactine. Cependant, les concentrations en lipopeptides sont trop élevées pour analyser et distinguer l'activité antivirale des lipopeptides à l'activité cytotoxique.

2. *CONCENTRATION TOTALE DES LIPOPEPTIDES FIXE*

C'est pourquoi une deuxième série d'expériences est entreprise. Cette fois-ci, c'est la concentration totale de lipopeptides dans le milieu qui est fixée. Les concentrations en surfactine ou lichénysine et fengycine sont déterminées en fonction du ratio étudié.

Pour analyser la synergie entre la surfactine et la fengycine, 4 concentrations totales sont étudiées : 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL et 100 µg/mL. 7 ratios pour chaque concentration sont testés dont les ratios 0 : 1 et 1 : 0 où seules, respectivement, la fengycine et la surfactine sont présentes dans le milieu. La viabilité des cellules est aux alentours de 100% lorsque la concentration maximale est de 25 µg/mL. La viabilité diminue lorsque la concentration maximale est de 50 µg/mL. Dans les ratios 1 : 1 et 1 : 2, la concentration en surfactine est de 20,3 µg/mL et 29 µg/mL et la viabilité est respectivement de $93,9 \pm 0,9 \%$ et $88,0 \pm 1,7 \%$. La viabilité est donc légèrement plus basse que lorsqu'il y a uniquement de la surfactine à 25 µg/mL (**figure 10**). Cette diminution peut s'expliquer par le fait que la concentration totale de lipopeptides dans le milieu est de 50 µg/mL.

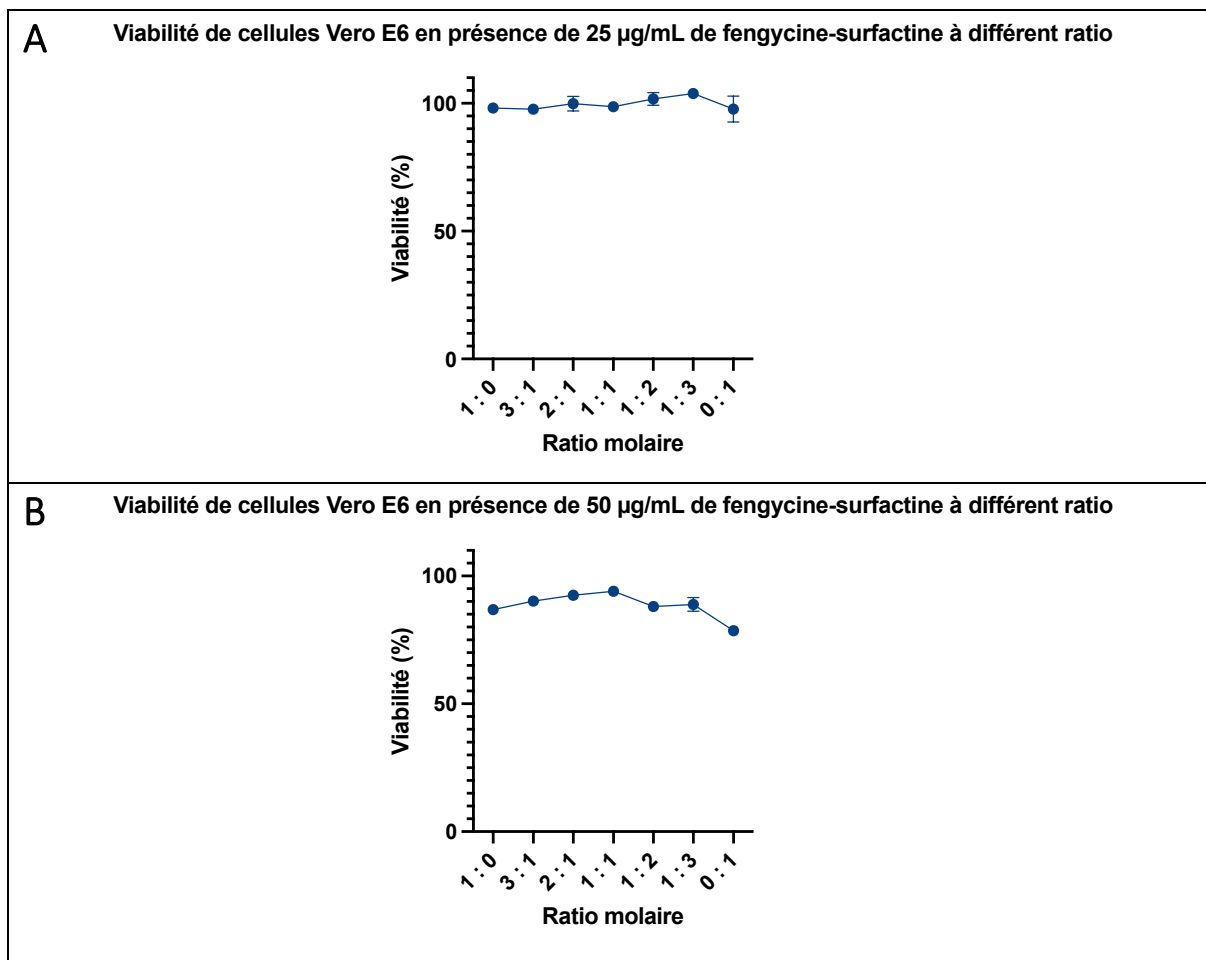


Figure 10 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est **A)** de 25 µg/mL et **B)** de 50 µg/mL.

Cependant, on peut commencer à voir l'effet protecteur de la fengycine lorsque la concentration maximale dans le milieu est de 75 µg/mL. En effet, le ratio 1 : 3 contient 50,40 µg/mL de surfactine et 24,60 µg/mL de fengycine. La viabilité pour ce ratio est de $81,3 \pm 6,5$ % alors que, pour uniquement 50 µg/mL de surfactine dans le milieu, la viabilité est de $78,6 \pm 0,3$ %. Cette fois-ci, l'augmentation de la concentration en lipopeptides dans le milieu n'impacte pas la viabilité totale des cellules. Il semblerait qu'il faille une concentration suffisamment importante de lipopeptides dans le milieu pour qu'il y ait une synergie qui se développe entre la fengycine et la surfactine. La viabilité baisse à $15,0 \pm 9,1$ % lorsque la surfactine est à 75 µg/mL (**figure 11**). Cependant, la viabilité est encore de $76,1 \pm 2,7$ % lorsqu'on a une concentration de 67,2 µg/mL de surfactine et 32,8 µg/mL de fengycine (**figure 12**). À nouveau, il y a une synergie qui se forme entre la fengycine et la surfactine permettant de rendre le mélange moins cytotoxique que lorsque la surfactine est seule.

Viabilité de cellules Vero E6 en présence de 75 µg/mL de fengycine-surfactine à différent ratio

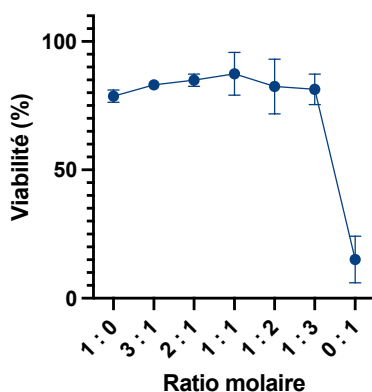


Figure 11 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est de 75 µg/mL.

Enfin, lorsque la concentration totale est de 100 µg/mL, la surfactine atteint des concentrations de 57,8 µg/mL et 67,2 µg/mL pour les ratio 1 : 2 et 1 : 3. Les viabilités sont respectivement de $76,5 \pm 2,1$ % et de $76,1 \pm 2,7$ % (figure 12). La viabilité est suffisamment haute pour considérer le mélange comme étant non-cytotoxique. De plus, la viabilité est bien supérieure à la viabilité attendue avec de telles concentrations de surfactine. En effet, l'IC50 de la surfactine vaut $54,9 \pm 3,2$ µg/mL, ce qui veut dire que pour cette concentration la viabilité des cellules vaut 50%.

Viabilité de cellules Vero E6 en présence de 100 µg/mL de fengycine-surfactine à différent ratio

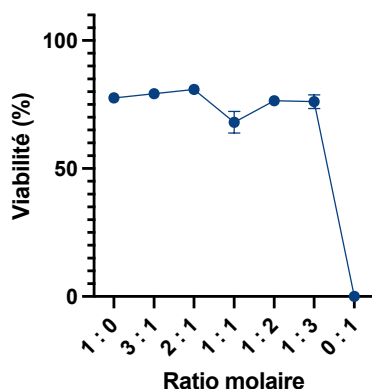


Figure 12 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est fixée.

En ce qui concerne, la lichénysine et la fengycine, 3 concentrations différentes ont été testées : 12,5 µg/mL, 25 µg/mL et 50 µg/mL avec les mêmes ratios que précédemment. Pour une concentration totale de 12,5 µg/mL et 25 µg/mL, la viabilité des cellules reste aux alentours de 100 % qu'il y ait de la fengycine, de la lichénysine ou les deux (figure 13).

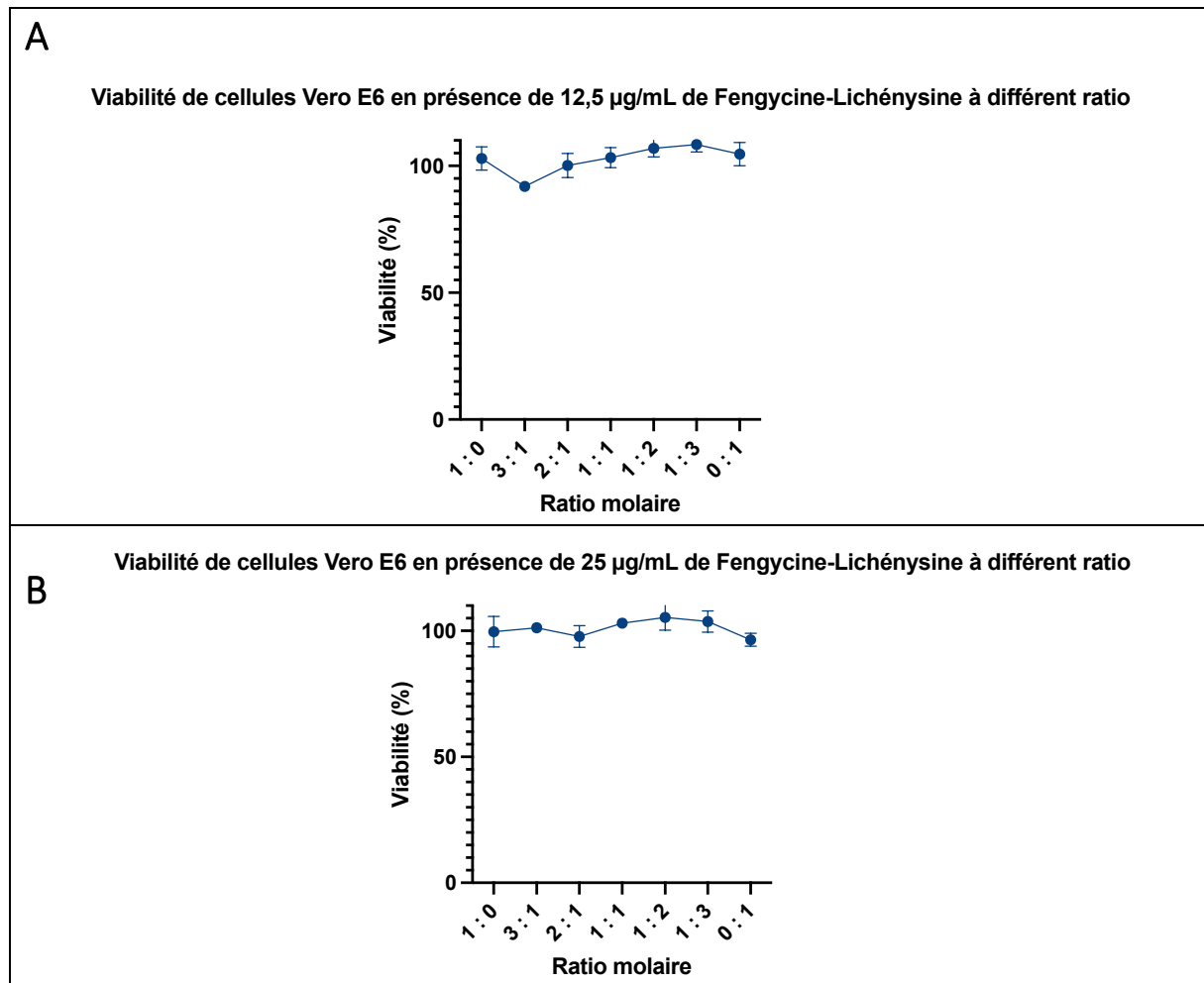


Figure 13 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est **A)** de 12,5 µg/mL et **B)** de 25 µg/mL.

La viabilité est de 0 % lorsqu'on a 50 µg/mL de lichénysine. La viabilité pour le ratio 1 : 1 vaut $91,6 \pm 3,3$ % et la viabilité pour le ratio 1 : 2 vaut $48,4 \pm 16,6$ %. La concentration en lichénysine est respectivement de 20,5 µg/mL et de 29,2 µg/mL. La viabilité chute fortement entre les deux malgré la faible différence de concentration de lichénysine. Une hypothèse déjà avancée précédemment, serait qu'il est nécessaire d'avoir un ratio 1 : 1 afin de développer une synergie entre la lichénysine et la fengycine et ainsi augmenter la viabilité. De plus, la lichénysine étant très toxique, 5 µg/mL de lichénysine en plus dans le milieu impacte très fortement la viabilité des cellules. La synergie entre la lichénysine et la fengycine est difficilement discernable par cette expérience. Cependant, un résultat intéressant avait pu être trouvé lorsque la concentration en lichénysine était fixe et que le ratio était de 1 : 1. Une synergie serait donc bien possible entre ces deux lipopeptides. Cependant, elle reste moins importante que la synergie développée entre la fengycine et la surfactine.

Viabilité de cellules Vero E6 en présence de 50 µg/mL de Fengycine-Lichénysine à différent ratio

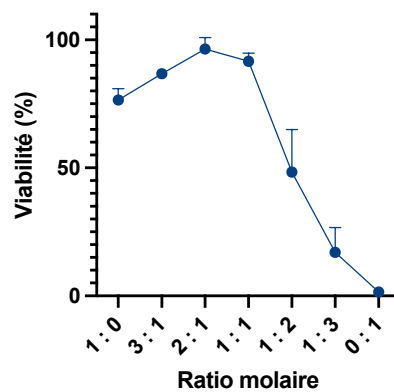


Figure 14 : Graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine à différentes concentrations lorsque la concentration totale est de 50 g/mL.

Un certain équilibre molaire est donc nécessaire pour optimiser la synergie entre les deux lipopeptides, que ce soit fengycine-surfactine ou fengycine-lichénysine, et ainsi augmenter la viabilité des cellules. Dans les cas présentés ci-dessus, la viabilité est globalement augmentée par rapport à la molécule la plus cytotoxique, surfactine ou lichénysine.

C. ANALYSE DE LA SYNERGIE

Différentes expériences sont exécutées afin d'essayer de comprendre le phénomène de synergie qui se passe lors de la mise en contact de fengycine avec la surfactine ou la lichénysine.

1. ANALYSE DES CELLULES DANS UN INCUCYTE S3

Une première série d'expériences est d'analyser le comportement des cellules grâce à un incucyte S3. Une particularité de l'interaction de la fengycine avec les cellules a pu être observée au microscope lors des expériences précédentes. À forte concentration de fengycine seule dans le milieu, les cellules ont tendance à se regrouper afin de former de grosses cellules multinucléées.

La figure 15 montre l'évolution durant 72h de l'aire moyenne des cellules en présences de différentes concentrations de fengycine. Au plus la concentration en fengycine est élevée, au plus l'aire moyenne des cellules est importante. Un test de Dunnett's est réalisé afin de déterminer si la différence des aires moyennes des cellules est significative. Après 72h, les cellules mises en contact avec au moins 50 µg/mL de fengycine ont bien significativement une aire moyenne plus importante que les cellules seules ou les cellules avec uniquement du DMSO.

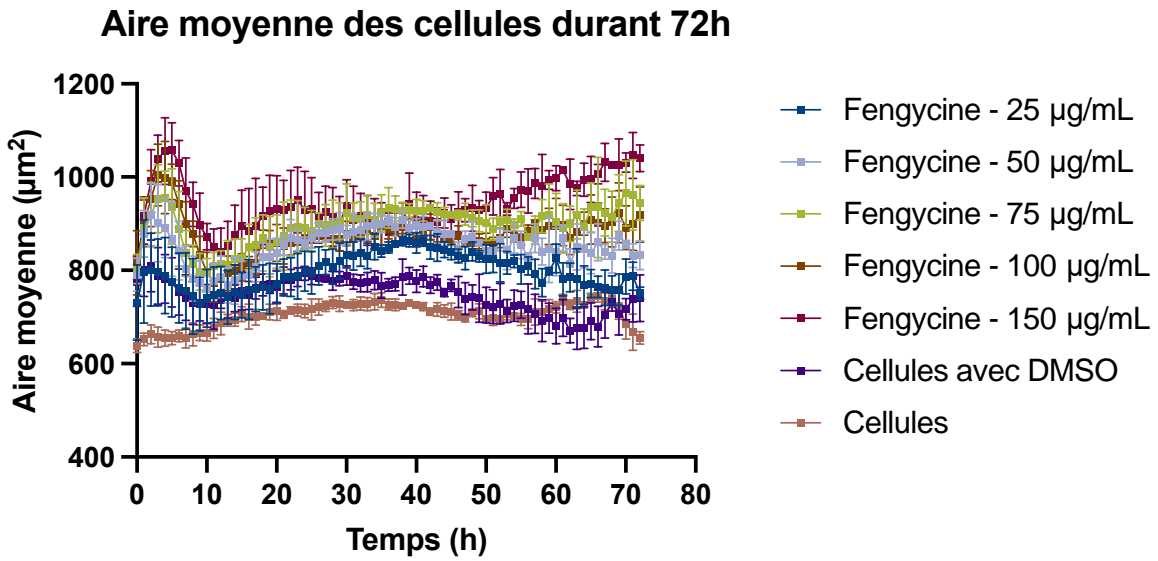
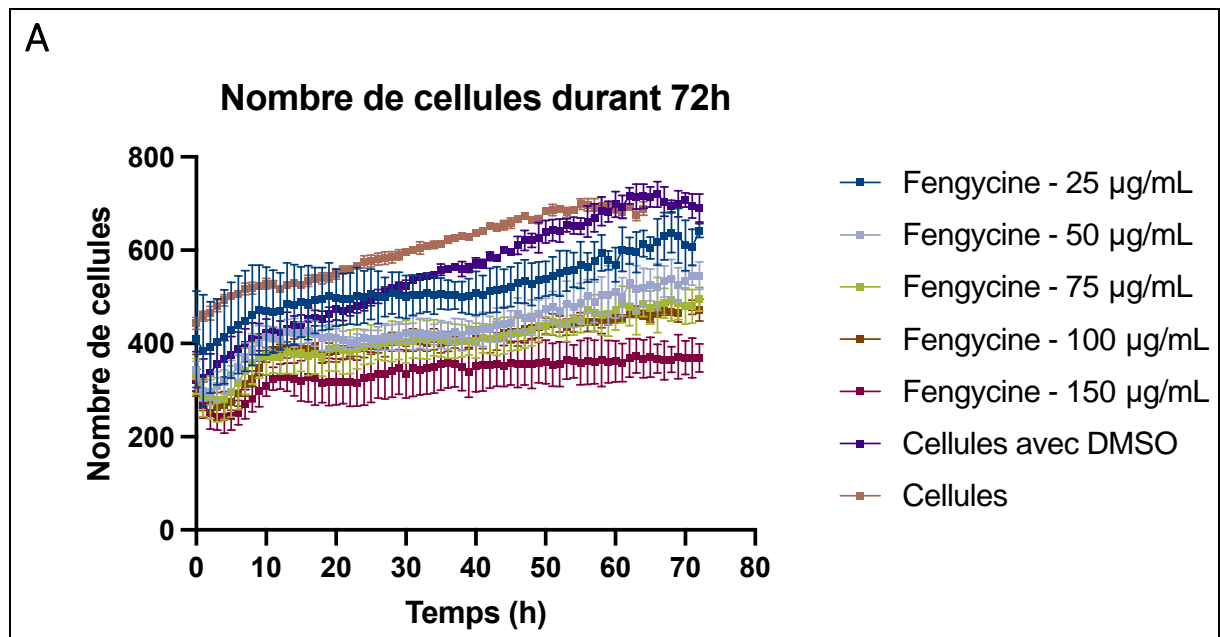


Figure 15 : Graphique de l'évolution de l'aire moyenne de cellules durant 72h en présence ou non de fengycine.

Au plus la concentration en fengycine augmente au plus le nombre de cellules diminue et au plus la confluence entre les cellules diminue. Un test de Dunnett's permet à nouveau de confirmer que la différence entre les cellules seules ou avec DMSO et les cellules ayant minimum 50g/mL est significative (**figure 16**). Ces diminutions s'expliqueraient par le fait que les cellules auraient tendance à fusionner entre elles et qu'une cellule multi-nucléée ne prendrait pas autant de place que plusieurs cellules unies nucléées. De plus, dans ce cas-ci, une cellule est définie par une membrane fermée, le nombre de noyaux n'est donc pas pris en compte lors du comptage des cellules.



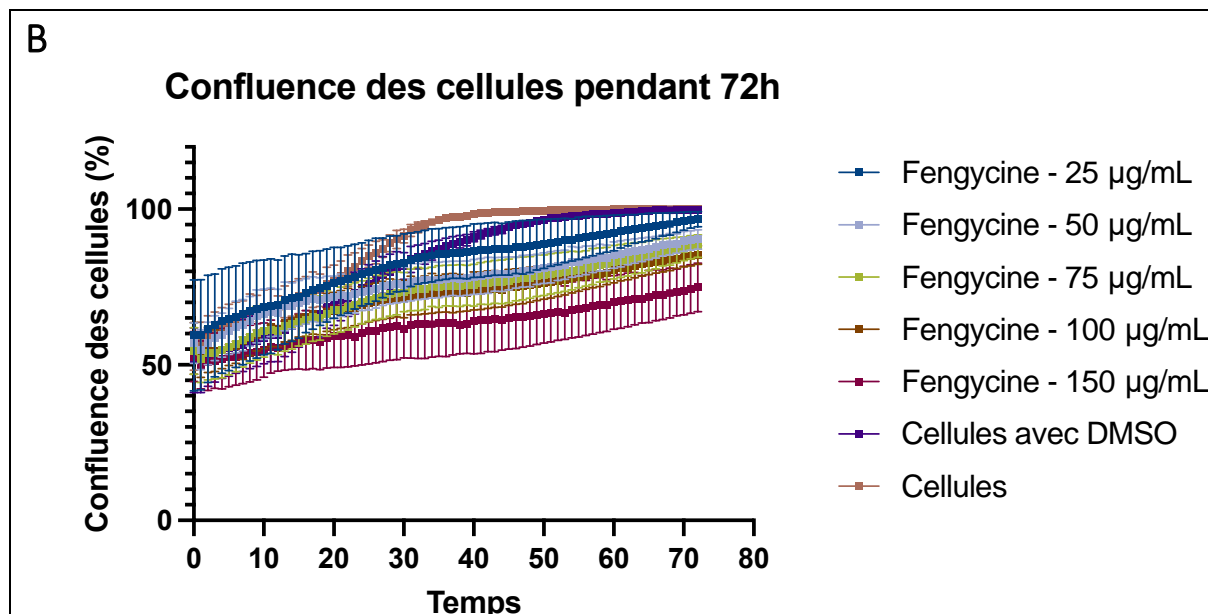


Figure 16 : Graphiques de l'évolution **A)** du nombre de cellules et **B)** de la confluences des cellules durant 72h en présence ou non de fengycine.

Une hypothèse serait que des fengycines présentes sur des cellules différentes pourraient s'attirer entre elles et attirer les cellules l'une vers l'autre conduisant à la fusion de ces cellules. En effet, la fengycine est capable, par interaction électrostatique entre les résidus chargés de la fengycine (ornithines et acides glutamiques) et les têtes lipidiques de la membrane, de s'insérer au sein de celle-ci [77]. Étant donné que la fengycine n'est que partiellement insérée au sein des membranes, certains résidus aminés sont exposés au milieu et peuvent contribuer à des interactions fengycine-fengycine [78]. Des interactions hydrophobes entre Tyr-10, Tyr-4 et ile-11 des fengycines adjacentes ont lieu et conduisent à la formation d'agrégats [77]. Il se pourrait donc que des fengycines présentes sur des cellules différentes soient attirées l'une par l'autre et s'agrègent. Les membranes cellulaires auraient tendance, elles aussi, à fusionner et cela permettrait de former des cellules multi-nucléées.

2. PRÉTRAITEMENT PAR LA FENGYCINE

Une hypothèse serait que la fengycine est capable de protéger les cellules par son interaction particulière avec les membranes. C'est donc sa protection qui rendrait la surfactine et la lichénysine moins toxiques pour les cellules. Pour ce faire, un prétraitement des cellules par la fengycine est effectué. Il s'agit de mettre les cellules en contact avec la fengycine et laisser incuber l'expérience pendant 1h ou 24h avant d'ajouter la surfactine.

Le prétraitement de 24h montre une meilleure viabilité des cellules comparé au test de cytotoxicité basique lorsque peu ou pas de surfactine est ajoutée dans le milieu. A partir du ratio 1 : 1, la viabilité est plus faible pour le prétraitement. Il en est de même pour le prétraitement d'1h. Dans les prétraitements, la fengycine ne permet plus de contrer la cytotoxicité plus forte de la surfactine (figure 17).

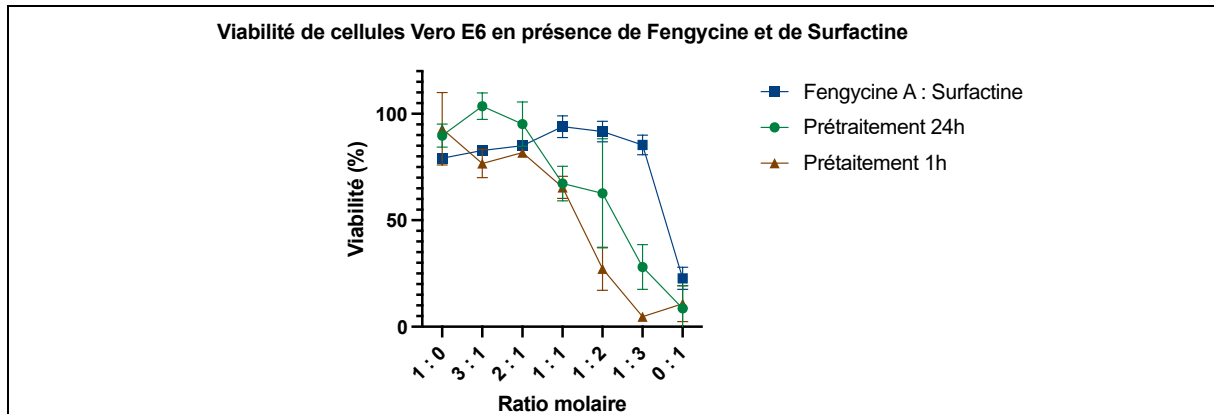


Figure 17 : Viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine où les courbes représentent en bleu : l'ajout simultané des deux lipopeptides, en brun : le prétraitement des cellules par de la fengycine pendant 1h avant l'ajout de surfactine, en vert : le prétraitement des cellules par de la fengycine pendant 24h avant l'ajout de surfactine. La concentration totale en lipopeptide pour chaque expérience est de 75 µg/mL.

Une analyse supplémentaire peut montrer que la cytotoxicité de surfactine reste plus forte lors des prétraitements des cellules par la fengycine que lors du test de cytotoxicité où l'ajout entre la fengycine et de la surfactine est simultané. Il s'agit du calcul des IC50 cependant, ici, seule la concentration en surfactine et la viabilité des cellules entre en compte dans leur calcul (**figure 18**).

Il est possible de mettre plus de surfactine dans le milieu avant d'atteindre une viabilité des cellules de 50% lorsque la surfactine est mise en même temps que la fengycine. La surfactine devient même plus cytotoxique lorsqu'il y a un prétraitement des cellules que lorsque seule de la surfactine est ajoutée dans le milieu.

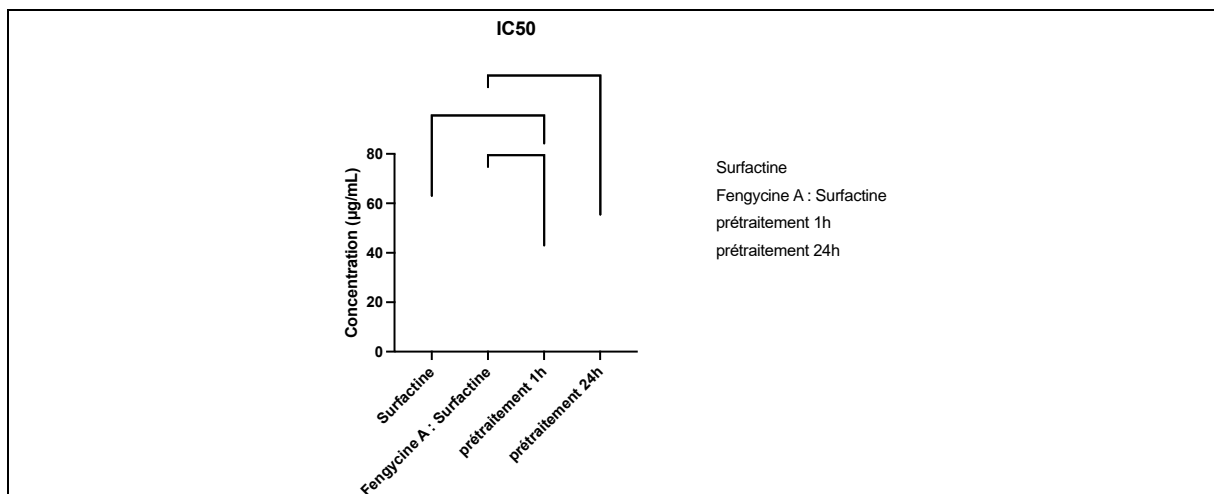


Figure 18 : Graphique représentant les IC50 de la surfactine, de la fengycine-surfactine, du prétraitement par la fengycine de 1h avant l'ajout de surfactine et du prétraitement par la fengycine de 24h avant l'ajout de surfactine. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test).

Il semblerait donc que la fengycine et la surfactine auraient tendance à interagir entre elles avant d'interagir avec la membrane des cellules. Cette interaction permettrait de diminuer la cytotoxicité de la surfactine. La différence notable entre le prétraitement d'1h et le prétraitement de 24h résulterait du temps que met la fengycine à interagir avec la membrane.

3. ANALYSE DES STRUCTURES FORMÉES PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE

Une analyse de diffusion dynamique de la lumière (DLS) est mise en vigueur afin d'essayer d'identifier les structures formées par les lipopeptides. Tout d'abord, la fengycine et la surfactine sont séparément analysées par DLS. La fengycine présente dans le milieu DMEM une macrostructure en moyenne de 157,3 nm alors que la surfactine possède une structure à 18,91 nm et une structure à 163,2 nm (**figure 19**). La macrostructure pourrait s'expliquer par l'interaction entre les composants du milieu et le lipopeptide. De plus, la surfactine et la fengycine sont à une concentration bien supérieure à leur concentration critique d'agrégation (CAC) expliquant la formation de nanostructures supramoléculaires [17,79].

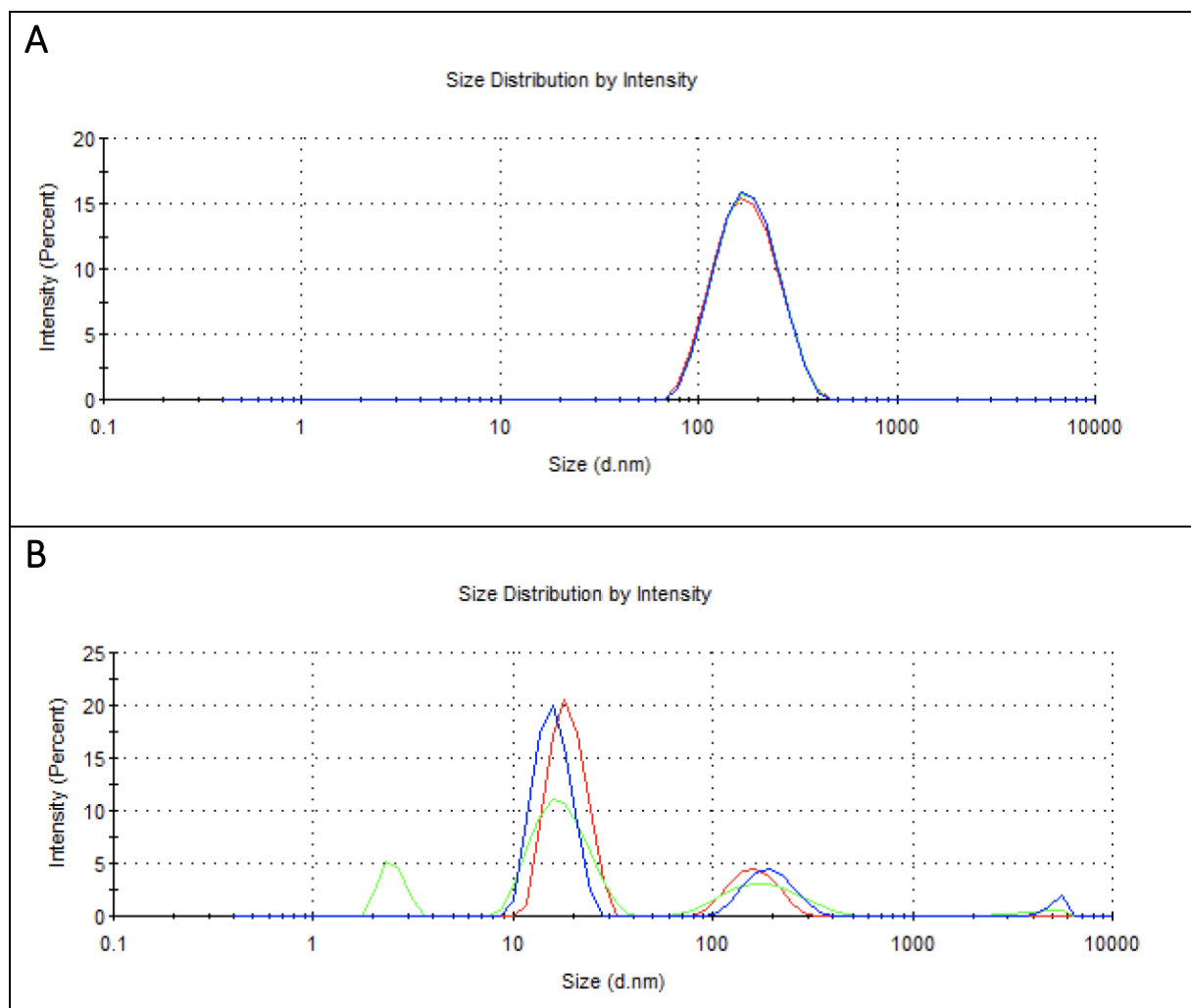


Figure 19 : Graphiques montrant la taille de la distribution pour **A)** de la fengycine à 75 µg/mL et pour **B)** de la surfactine à 75 µg/mL en fonction de l'intensité. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon.

Ensuite, une analyse des structures formées par la fengycine et la surfactine au ratio 1 : 1 et 1 : 2 est faite. La structure formée par le ratio 1 : 1 est de 142,3 nm et la structure formée par le ratio 1 : 2 est de 168,9 nm (**figure 20**). La taille de ces structures ressemble fortement à la taille de la structure de la fengycine seule. Il est donc possible que seule la fengycine est discernable ou alors que la structure formée par la fengycine et les éléments du milieu, a absorbé la surfactine en son sein. La faible différence de viabilité entre les deux ratios peut donc s'expliquer par le fait que les structures sont assez similaires.

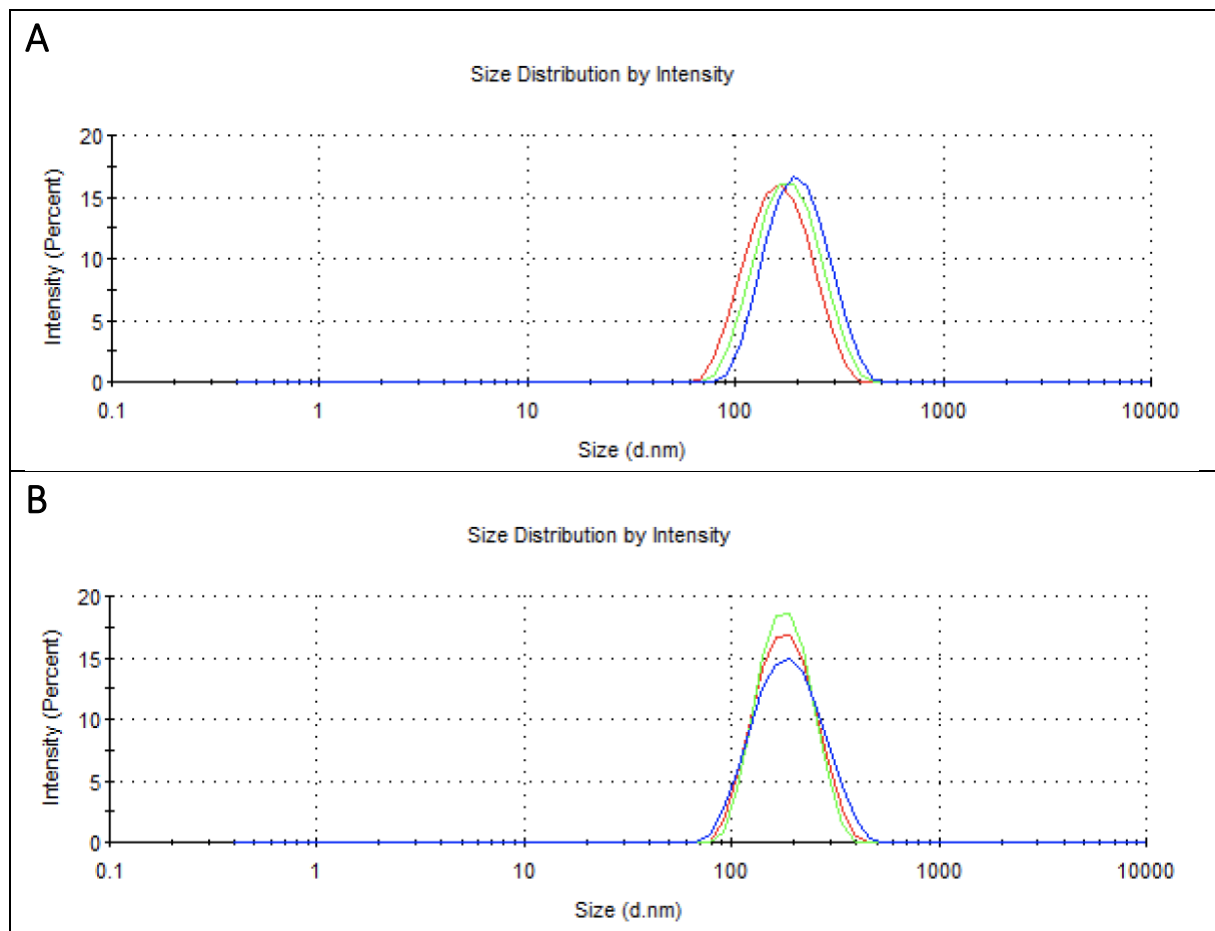


Figure 20 : Graphiques montrant la taille de la distribution pour une concentration de lipopeptides totales de 75 µg/mL d'un mélange de fengycine et de surfactine au ratio **A)** 1 : 1 et **B)** 1 : 2. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon.

Enfin, la lichénysine et le ratio 1 : 1 fengycine-lichénysine est analysé par DLS. La lichénysine n'est pas discernable par DLS. La structure formée est soit trop petite soit les structures formées sont trop hétérogènes pour que l'appareil puisse fournir une mesure. En ce qui concerne le mélange, il est possible de voir des structures formées à 124,1 nm et des structures

formées à 1246 nm (**figure 21**). Une hétérogénéité de la mesure apparaît encore ici. La lichénysine aurait donc tendance à ne pas se stabiliser en une seule structure. Cependant, la macrostructure étant de taille importante, elle pourra moins facilement s'insérer au sein des membranes et la cytotoxicité du mélange qui en résulte sera moins cytotoxique.

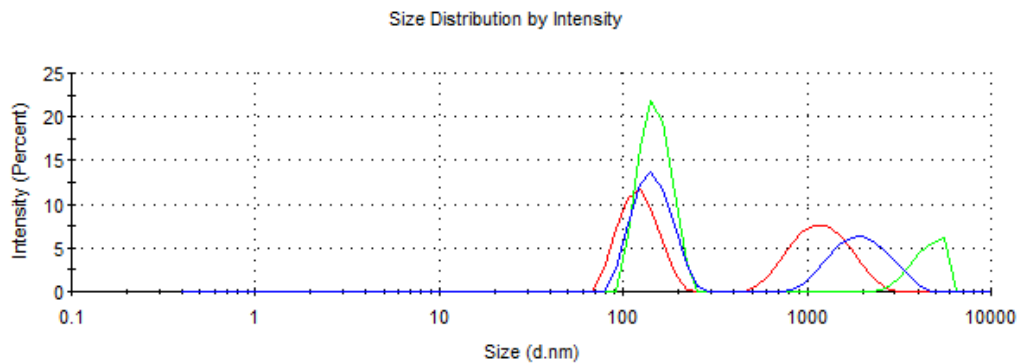


Figure 21 : Graphique montrant la taille de la distribution pour une concentration de lipopeptides totales de 75 µg/mL d'un mélange de fengycine et de lichénysine au ratio 1 : 1. Les trois courbes représentent les trois mesures prises pour un même échantillon.

D. DISTINCTION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE

Afin de distinguer l'activité antivirale de l'activité cytotoxique, il est nécessaire de sélectionner des ratios permettant de garder une bonne viabilité des cellules où il est possible d'analyser une activité antivirale. Les ratios sélectionnés sont 1 : 1 et 1 : 2 pour la fengycine-surfactine et le ratio 1 : 1 pour la fengycine-lichénysine. En ce qui concerne les concentrations, une gamme assez large de concentration est sélectionnée permettant ainsi de calculer des IC50.

En ce qui concerne la viabilité des cellules en présence de fengycine-surfactine, le ratio 1 : 1 permet de maintenir une plus haute viabilité pour une plus grande concentration. En effet, pour une concentration totale en lipopeptides de 200 µg/mL, la viabilité est encore de $55,5 \pm 11,4$ % alors que pour le ratio 1 : 2, dès une concentration totale de 125 µg/mL, la viabilité est de $49,2 \pm 3,7$ %. Il est encore plus facile d'observer la différence entre les deux ratios grâce aux calculs des IC50. L'IC50 du ratio 1 : 1 vaut $242,5 \pm 47,0$ µg/mL et l'IC50 du ratio 1 : 2 vaut $126,7 \pm 3,0$ µg/mL. Seul l'IC50 du ratio 1 : 1 possède une différence très significative avec l'IC50 de la surfactine. La viabilité augmente donc significativement grâce à l'ajout de fengycine dans un équilibre équimolaire.

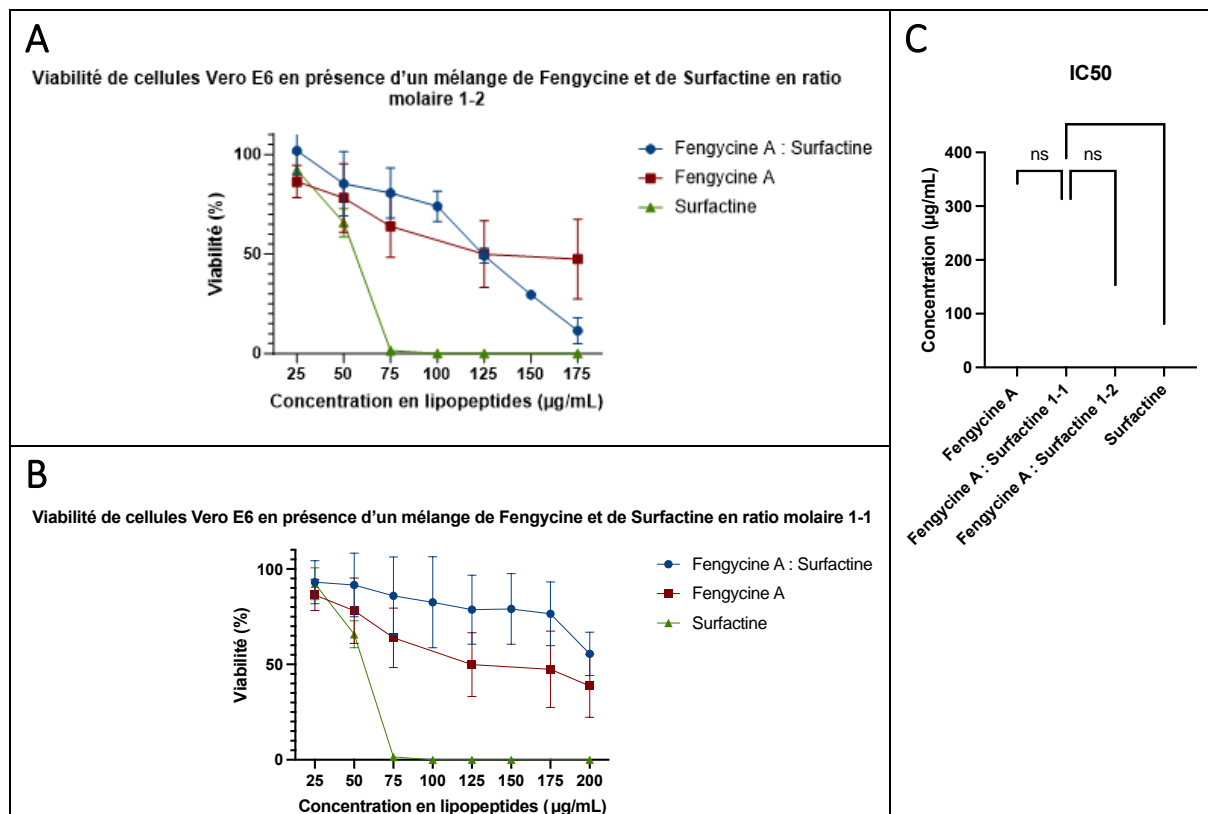


Figure 22 : **A**) graphique de viabilité des cellules en présence de fengycine et de surfactine au ratio 1 : 1 ; **B**) graphiques de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de surfactine au ratio 1 : 2 ; **C**) graphiques des IC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 1, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 2 et de la surfactine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test)

L'analyse antivirale se fait grâce à la concentration en ARN viral présente au sein du milieu après 3 jours d'incubation. Plusieurs courbes de contrôle sont nécessaires afin de déterminer si il y a une différence de concentration en ARN viral entre les cellules avec traitement et les cellules sans traitement. Le premier contrôle sera les cellules infectées par le Sars-Cov-2 mais sans traitement et est représenté par la droite cellules infectées. Les cellules infectées ont une concentration en ARN viral de $9,8.10^5 \pm 4,1.10^5$ ARN/mL. Ensuite, la droite ARN résiduel représente la quantité de virus restante dans le milieu si aucune cellule n'est présente et que donc la réplication de l'ARN est impossible. Il montre donc l'artéfact de présence du virus. Ce deuxième contrôle possède une concentration en ARN viral de $1,0.10^3 \pm 5,7.10^2$ ARN/mL. Enfin, le sérum détermine la quantité d'ARN viral restante dans le milieu quand bien même nos cellules ont été traitées par un sérum.

L'activité antivirale de la surfactine seule semble impressionnante dans un premier temps car, à seulement 75 µg/mL de surfactine, la concentration en ARN viral est nulle. Cela s'explique par le fait que plus aucune cellule n'est vivante dans le milieu. La réplication du Sars-Cov-2 est donc impossible. Cependant, la surfactine est connue pour interagir avec la protéine spike et ainsi inhiber la liaison des virions aux récepteurs cellulaires [72-73]. Elle posséderait donc bien une activité antivirale mais qui est assez difficile de séparer de son activité cytotoxique.

La fengycine quant à elle possède une faible activité antivirale car il faut attendre une concentration de 200 µg/mL pour réussir à avoir une valeur non significativement différente du sérum ou de l'ARN résiduel. Malgré cela, il est assez difficile de distinguer l'activité antivirale de l'activité cytotoxique car, pour cette concentration, la viabilité des cellules n'est plus qu'à $55,5 \pm 3,1$ %. La chute de la concentration en ARN viral peut donc simplement être due à la difficulté du virus à se répliquer car il y a peu de cellules.

La concentration en ARN viral est plus faible pour le ratio 1 : 2 que pour le ratio 1 : 1 et ce, pour des concentrations totales en lipopeptides plus petites. Cette différence pourrait à nouveau s'expliquer par le fait que la viabilité des cellules est plus faible pour le ratio 1 : 2 que pour la ratio 1 : 1. La viabilité des cellules est quasiment similaire pour une concentration de 125 µg/mL au ratio 1 : 2 que pour une concentration de 200 µg/mL au ratio 1 : 1. Cependant, la concentration en ARN viral est plus faible pour le ratio 1 : 1 que pour le ratio 1 : 2. Il y a une différence de 44,8 ARN/mL. L'activité antivirale serait donc plus forte pour un mélange équimolaire de fengycine et de surfactine.

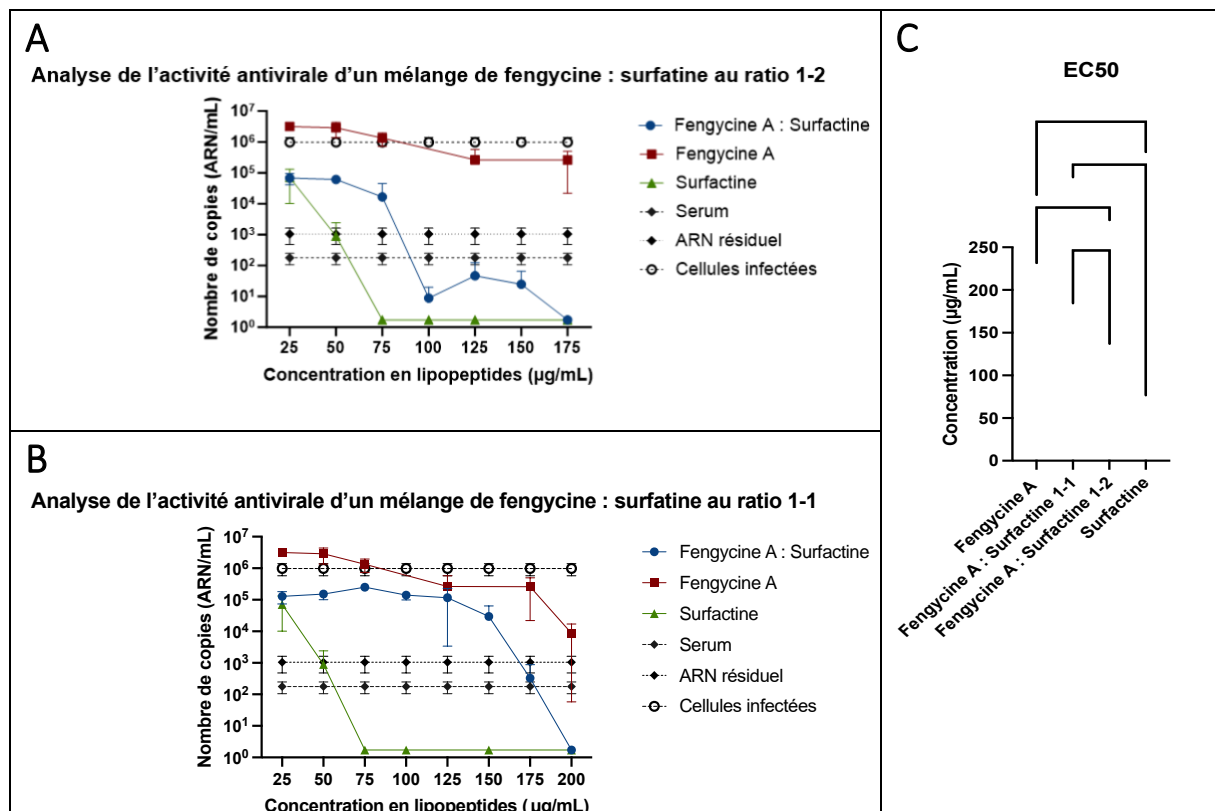


Figure 23 : **A**) graphique de l'activité antivirale de la fengycine et de la surfactine au ratio 1 : 1 ; **B**) graphiques de l'activité antivirale de la fengycine A et de la surfactine au ratio 1 : 2 ; **C**) graphiques des EC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 1, du mélange fengycine-surfactine au ratio 1 : 2 et de la surfactine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test)

En ce qui concerne la viabilité des cellules en présence de fengycine-lichénysine, celle-ci diminue moins fortement que lorsque les cellules sont uniquement en présence de la lichénysine. Les calculs des IC50 permettent ici de montrer une différence significative entre la lichénysine et la fengycine. Cependant, le mélange entre les deux n'est pas significativement différent par rapport à la lichénysine seule ou la fengycine seule.

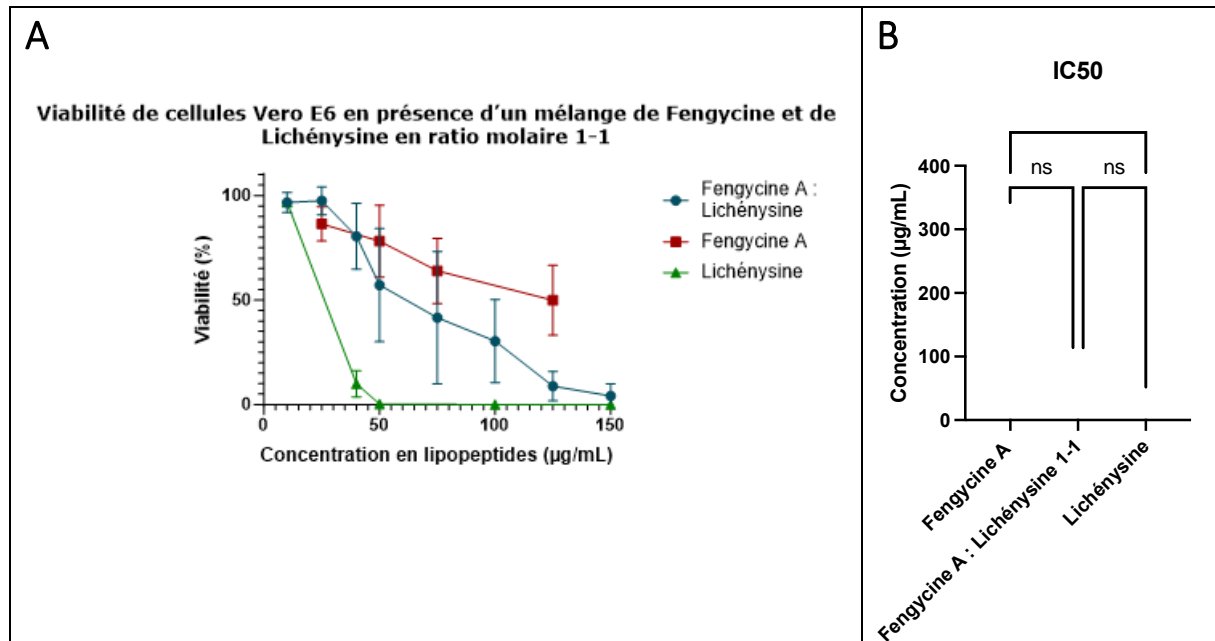


Figure 24 : **A**) graphique de la viabilité des cellules en présence de fengycine A et de lichénysine au ratio 1 : 1 ; **B**) graphique des IC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-lichénysine au ratio 1 : 1 et de la lichénysine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test)

La courbe de viabilité de la lichénysine se superpose à la courbe d'activité antivirale. Ce qui veut dire que la diminution de la quantité en ARN viral dans le milieu est liée à la mortalité des cellules et probablement pas au fait que la lichénysine est capable d'agir contre le Sars-Cov-2. En ce qui concerne le mélange de fengycine-lichénysine, à une concentration de 50 et 75 µg/mL, la viabilité des cellules est encore de $57,1 \pm 5,1$ % et $41,6 \pm 4,0$ %. Cependant, la concentration en ARN viral est nulle pour 75 µg/mL et similaire au sérum pour 50 µg/mL. Le mélange fengycine-lichénysine permettrait donc de distinguer l'activité antivirale de la cytotoxicité.

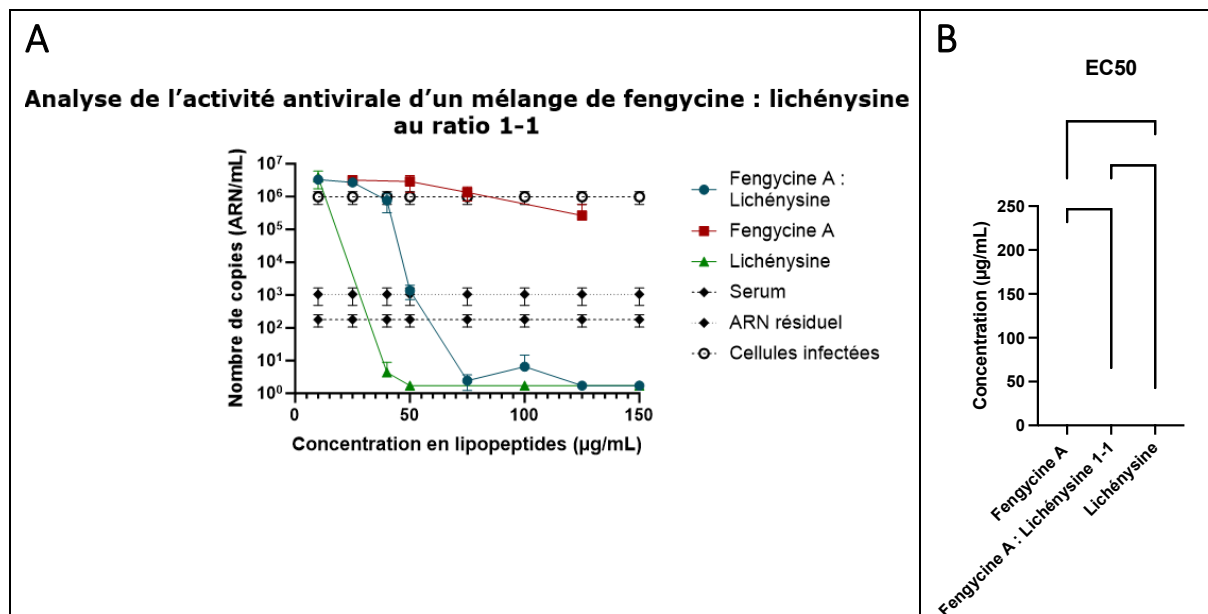


Figure 25 : **A)** graphique de la concentration en ARN viral en présence de fengycine A et de lichénysine au ratio 1 : 1 ; **B)** graphique des EC50 de la fengycine seule, du mélange fengycine-lichénysine au ratio 1 : 1 et la lichénysine seule. Les différents « * » indiquent une valeur de moyenne significativement différente ($p < 0,05$, Dunnett's test)

L'indice de sélectivité (IS) peut être calculé en divisant l'IC50 par l'EC50. Il sert à comparer plus facilement la distinction entre l'activité antivirale et l'activité cytotoxique. L'indice de sélectivité est dans chaque cas plus important lorsqu'il y a un mélange entre les deux lipopeptides que seul. La distinction entre l'activité antivirale et l'activité cytotoxique est donc plus importante. En effet, plus un indice de sélectivité est élevé, plus la capacité de la ou les molécules à réduire la concentration virale tout en gardant une bonne viabilité des cellules est haute.

LIPOPEPTIDES	IC50	EC50	IS
Fengycine	187,6 ± 130,5	212,6 ± 4,1	0,8823
Surfactine	54,4 ± 3,2	53,3 ± 8,4	1,0207
Fengycine : surfactine 1 : 1	242,5 ± 47,0	161,7 ± 8,1	1,4950
Fengycine : surfactine 1 : 2	126,7 ± 3,0	82,4 ± 40,0	1,5375
Lichénysine	25,2 ± 3,0	26,4 ± 1,4	0,9558
Fengycine : lichénysine 1 : 1	65,6 ± 24,0	49,9 ± 0,7	1,3144

Tableau 1 : Calcul des indices de sélectivités (IS).

VI. CONCLUSION

Les différentes analyses cytotoxiques ont permis de mettre en évidence que la fengycine avait tendance à être moins cytotoxique que la surfactine ou la lichénysine. Cela résulte du fait que la fengycine a tendance à ne s'insérer que partiellement dans la membrane contrairement à la surfactine [55]. Les nanostructures globalement formées par la surfactine sont plus petites que les nanostructures formées par la fengycine. Les monomères de surfactine auraient donc plus facile à s'insérer à la membrane rendant la surfactine plus cytotoxique par rapport à la fengycine. De plus, la lichénysine étant monochargée et ne possédant pas d'acide glutamique, elle s'insérerait plus facilement encore dans les membranes [76].

Un mélange équimolaire entre la fengycine et la surfactine permet de réduire la cytotoxicité de la surfactine. Néanmoins, les mélanges restent tous légèrement plus cytotoxiques que la fengycine seule. L'activité antivirale est quant à elle légèrement réduite lorsque la lichénysine et la surfactine se trouvent en présence de fengycine. La fengycine interagissant avec la fengycine et la lichénysine et possédant une activité antivirale faible, a tendance à diminuer l'efficacité des mélanges. La nanostructure formée entre la fengycine et la surfactine empêcherait la surfactine d'agir aussi efficacement sur le virion. Cependant, sur base des expériences mises en place, il est impossible de déterminer comment les lipopeptides interagissent avec le virus. Il serait utile de faire des expériences supplémentaires où l'action antivirale serait testée à des moments précis du cycle de réplication. Il est tout de même intéressant de souligner que le calcul des indices de sélectivité permet de montrer que les mélanges de lipopeptides augmentent la distinction entre l'activité cytotoxique et l'activité antivirale.

Une forte concentration en fengycine permet donc d'augmenter la taille des cellules. Cette augmentation résulterait de l'interaction fengycine-fengycine et fengycine-membrane. Cependant, des tests supplémentaires permettraient de mieux visualiser et de mieux comprendre ces différentes interactions et savoir si l'une des interactions est dominante ou non [77-78]. Ces tests pourraient ainsi aider à confirmer ou infirmer l'hypothèse d'agrégation des fengycines et de la fusion des cellules.

Ces interactions particulières de la fengycine ne permettent pas de protéger les cellules lorsqu'une forte concentration de lichénysine ou de surfactine est ajoutée au milieu. Une différence dans le temps pour un prétraitement de fengycine aurait tout de même un effet. La fengycine prendrait donc un certain temps avant de réussir à s'insérer dans les membranes et développer de fortes interactions. Au vu de la figure 15, il faudrait un temps de 42h avant d'avoir une différence significative entre la taille des cellules seules et la taille des cellules en présence d'au moins 75 µg/mL. Une étude cinétique avec différents tests de prétraitements et plusieurs concentrations pourraient montrer plus facilement à quel moment et à quelle concentration la fengycine interagirait plus avec la membrane qu'avec la surfactine.

La synergie entre les lipopeptides permet donc de réduire leur effet cytotoxique mais leur activité antivirale baisse légèrement.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Chen W.-C., Juang R.-S. & Wei Y.-H., 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* **103**, 158–169, DOI:10.1016/j.bej.2015.07.009.
- [2] Morikawa M., Hirata Y. & Imanaka T., 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1488**(3), 211–218, DOI:10.1016/S1388-1981(00)00124-4.
- [3] Carolin C F., Kumar P.S. & Ngueagni P.T., 2021. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials* **407**, 124827, DOI:10.1016/j.jhazmat.2020.124827.
- [4] Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O. & Ongena M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* **34**(6), 1037–1062, DOI:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.
- [5] Johnson B.A., Hage A., Kalveram B., Mears M., Plante J.A., Rodriguez S.E., Ding Z., Luo X., Bente D., Bradrick S.S., Freiberg A.N., Popov V., Rajsbaum R., Rossi S., Russell W.K. & Menachery V.D., 2019. Peptidoglycan-Associated Cyclic Lipopeptide Disrupts Viral Infectivity. *Journal of Virology* **93**(22), e01282-19, DOI:10.1128/JVI.01282-19.
- [6] Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R. & Pauli G., 1997. Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* **25**, 289–97, DOI:10.1006/biol.1997.0099.
- [7] Huang X., Lu Z., Zhao H., Bie X., Lü F. & Yang S., 2006. Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Vitro. *Int J Pept Res Ther* **12**(4), 373–377, DOI:10.1007/s10989-006-9041-4.
- [8] Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Foley B., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Silva T. de, Group on behalf of the S.C.-19 G., LaBranche C.C. & Montefiori D.C., 2020. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2020.04.29.069054, DOI:10.1101/2020.04.29.069054.
- [9] de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D. & Munster V.J., 2016. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **14**(8), 523–534, DOI:10.1038/nrmicro.2016.81.
- [10] Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F. & Tan W., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **382**(8), 727–733, DOI:10.1056/NEJMoa2001017.

- [11] Burrell C.J., Howard C.R. & Murphy F.A., 2017. Chapter 31 - Coronaviruses. In: Burrell, C.J., Howard, C.R., Murphy, F.A. eds. *Fenner and White's Medical Virology* (Fifth Edition). Academic Press, London, 437–446, DOI:10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X.
- [12] Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T. & Veerler D., 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**(2), 281-292.e6, DOI:10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [13] V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H. & Thiel V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**(3), 155–170, DOI:10.1038/s41579-020-00468-6.
- [14] Théâtre A., Hoste A.C.R., Rigolet A., Benneceur I., Bechet M., Ongena M., Deleu M. & Jacques P., 2022. *Bacillus* sp.: A Remarkable Source of Bioactive Lipopeptides. In: Hausmann, R., Henkel, M. eds. *Biosurfactants for the Biobased Economy, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, 123–179, DOI:10.1007/10_2021_182.
- [15] Süssmuth R.D. & Mainz A., 2017. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition* **56**(14), 3770–3821, DOI:10.1002/anie.201609079.
- [16] Théâtre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H. & Jacques P., 2021. The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9.
- [17] Hoste A., Görgen S. & Jacques P., 2023. Increasing the natural biodiversity of microbial lipopeptides using a synthetic biology approach, Academic Press, Cambridge, United States, 203-247, DOI:10.1016/B978-0-323-91697-4.00010-7.
- [18] Bloudoff K. & Schmeing T.M., 2017. Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, Biophysics in Canada* 1865(11, Part B), 1587–1604, DOI:10.1016/j.bbapap.2017.05.010.
- [19] Roongsawang N., Lim S.P., Washio K., Takano K., Kanaya S. & Morikawa M., 2005. Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS Microbiology Letters* **252**(1), 143–151, DOI:10.1016/j.femsle.2005.08.041.
- [20] Arima K., Kakinuma A. & Tamura G., 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**(3), 488–494, DOI:10.1016/0006-291X(68)90503-2.

- [21] Tsan P., Volpon L., Besson F. & Lancelin J.-M., 2007. Structure and Dynamics of Surfactin Studied by NMR in Micellar Media. *J. Am. Chem. Soc.* **129**(7), 1968–1977, DOI:10.1021/ja066117q.
- [22] Peypoux F., Bonmatin J.M. & Wallach J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(5), 553–563, DOI:10.1007/s002530051432.
- [23] Shao C., Liu L., Gang H., Yang S. & Mu B., 2015. Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach. *International Journal of Molecular Sciences* **16**(1), 1855–1872, DOI:10.3390/ijms16011855.
- [24] Kowall M., Vater J., Kluge B., Stein T., Franke P. & Ziessow D., 1998. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science* **204**(1), 1–8, DOI:10.1006/jcis.1998.5558.
- [25] Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-H., Cheng Y.-C., Wu Y.-C., Shu H.-Y., Goötz F. & Liu S.-T., 2007. Nonribosomal Synthesis of Fengycin on an Enzyme Complex Formed by Fengycin Synthetases *. *Journal of Biological Chemistry* **282**(8), 5608–5616, DOI:10.1074/jbc.M609726200.
- [26] Lin T.-P., Chen C.-L., Chang L.-K., Tschen J.S.-M. & Liu S.-T., 1999. Functional and Transcriptional Analyses of a Fengycin Synthetase Gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **181**(16), 5060–5067, DOI:10.1128/JB.181.16.5060-5067.1999.
- [27] Lin T.-P., Chen C.-L., Fu H.-C., Wu C.-Y., Lin G.-H., Huang S.-H., Chang L.-K. & Liu S.-T., 2005. Functional analysis of fengycin synthetase *FenD*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1730**(2), 159–164, DOI:10.1016/j.bbaexp.2005.02.005.
- [28] Shu H.-Y., Lin G.-H., Wu Y.-C., Tschen J.S.-M. & Liu S.-T., 2002. Amino Acids Activated by Fengycin Synthetase *FenE*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**(4), 789–793, DOI:10.1006/bbrc.2002.6729.
- [29] Lin G.-H., Chen C.-L., Tschen J.S.-M., Tsay S.-S., Chang Y.-S. & Liu S.-T., 1998. Molecular Cloning and Characterization of Fengycin Synthetase Gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **180**(5), 1338–1341, DOI:10.1128/JB.180.5.1338-1341.1998.
- [30] Yaseen Y., Gancel F., Drider D., Béchet M. & Jacques P., 2016. Influence of promoters on the production of fengycin in *Bacillus* spp. *Research in Microbiology* **167**(4), 272–281, DOI:10.1016/j.resmic.2016.01.008.
- [31] Yang H., Li X., Li X., Yu H. & Shen Z., 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Anal Bioanal Chem* **407**(9), 2529–2542, DOI:10.1007/s00216-015-8486-8.
- [32] Tsuge K., Akiyama T. & Shoda M., 2001. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Iturin A Operon. *Journal of Bacteriology* **183**(21), 6265–6273, DOI:10.1128/JB.183.21.6265-6273.2001.

- [33] Peypoux F., Besson F., Michel G. & Delcambe L., 1981. Structure of Bacillomycin D, a New Antibiotic of the Iturin Group. *European Journal of Biochemistry* **118**(2), 323–327, DOI:10.1111/j.1432-1033.1981.tb06405.x.
- [34] Duitman E.H., Hamoen L.W., Rembold M., Venema G., Seitz H., Saenger W., Bernhard F., Reinhardt R., Schmidt M., Ullrich C., Stein T., Leenders F. & Vater J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(23), 13294–13299, DOI:10.1073/pnas.96.23.13294.
- [35] Moyne A.-L., Cleveland T.E. & Tuzun S., 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters* **234**(1), 43–49, DOI:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09511.x.
- [36] Seydlová G. & Svobodová J., 2008. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *cent.eur.j.med* **3**(2), 123–133, DOI:10.2478/s11536-008-0002-5.
- [37] Mulligan C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**(2), 183–198, DOI:10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- [38] Carolin C F., Kumar P.S. & Ngueagni P.T., 2021. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials* **407**, 124827, DOI:10.1016/j.jhazmat.2020.124827.
- [39] Razafindralambo H., Thonart P. & Paquox M., 2004. Dynamic and equilibrium surface tensions of surfactin aqueous solutions. *J Surfact Deterg* **7**(1), 41–46, DOI:10.1007/s11743-004-0286-x.
- [40] Deleu M., Razafindralambo H., Popineau Y., Jacques P., Thonart P. & Paquot M., 1999. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **152**(1), 3–10, DOI:10.1016/S0927-7757(98)00627-X.
- [41] Shakerifard P., Gancel F., Jacques P. & Faille C., 2009. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling* **25**, 533–41, DOI:10.1080/08927010902977943.
- [42] Ahimou F., Jacques P. & Deleu M., 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* **27**(10), 749–754, DOI:10.1016/S0141-0229(00)00295-7.
- [43] W. Hamley I., 2015. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications* **51**(41), 8574–8583, DOI:10.1039/C5CC01535A.
- [44] Vicente-García C. & Colomer I., 2021. New antimicrobial self-assembling short lipopeptides. *Organic & Biomolecular Chemistry* **19**(31), 6797–6803, DOI:10.1039/D1OB01227D.

- [45] Fa K., Liu H., Li Z., Gong H., Petkov J. & Lu J.R., 2023. Acyl chain length tuning improves antimicrobial potency and biocompatibility of short designed lipopeptides. *Journal of Colloid and Interface Science* **630**, 911–923, DOI:10.1016/j.jcis.2022.10.114.
- [46] Singh A.K. & Cameotra S.S., 2013. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res* **20**(10), 7367–7376, DOI:10.1007/s11356-013-1752-4.
- [47] Janek T., Rodrigues L.R. & Czyżnikowska Ż., 2018. Study of metal-lipopeptide complexes and their self-assembly behavior, micelle formation, interaction with bovine serum albumin and biological properties. *Journal of Molecular Liquids* **268**, 743–753, DOI:10.1016/j.molliq.2018.07.118.
- [48] Heerklotz H. & Seelig J., 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* **36**(4), 305–314, DOI:10.1007/s00249-006-0091-5.
- [49] Hanif A., Zhang F., Li P., Li C., Xu Y., Zubair M., Zhang M., Jia D., Zhao X., Liang J., Majid T., Yan J., Farzand A., Wu H., Gu Q. & Gao X., 2019. Fengycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Inhibits *Fusarium graminearum* Growth and Mycotoxins Biosynthesis. *Toxins* **11**(5), 295, DOI:10.3390/toxins11050295.
- [50] Tao Y., Bie X., Lv F., Zhao H. & Lu Z., 2011. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *J Microbiol.* **49**(1), 146–150, DOI:10.1007/s12275-011-0171-9.
- [51] Wang Y., Zhang C., Liang J., Wang L., Gao W., Jiang J. & Chang R., 2020. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**(17), 7467–7481, DOI:10.1007/s00253-020-10773-y.
- [52] Jacques P., 2011. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez, G. ed. *Biosurfactants: From Genes to Applications*, Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg, 57–91.
- [53] Meena K.R. & Kanwar S.S., 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International* **2015**, e473050, DOI:10.1155/2015/473050.
- [54] Dufour S., Deleu M., Nott K., Wathélet B., Thonart P. & Paquot M., 2005. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1726**(1), 87–95, DOI:10.1016/j.bbagen.2005.06.015.
- [55] Deleu M., Paquot M. & Nylander T., 2008. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal* **94**(7), 2667–2679, DOI:10.1529/biophysj.107.114090.
- [56] Yuan L., Zhang S., Wang Y., Li Y., Wang X. & Yang Q., 2018. Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. *J Virol* **92**(21), e00809-18, DOI:10.1128/JVI.00809-18.

- [57] Kracht M., Rokos H., Ozel M., Kowall M., Pauli G. & Vater J., 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **52**(7), 613–619, DOI:10.7164/antibiotics.52.613.
- [58] Huang X., Lu Z., Zhao H., Bie X., Lü F. & Yang S., 2006. Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Vitro. *Int J Pept Res Ther* **12**(4), 373–377, DOI:10.1007/s10989-006-9041-4.
- [59] Jourdan E., Henry G., Duby F., Dommes J., Barthélemy J.P., Thonart P. & Ongena M., 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**(4), 456–468, DOI:10.1094/MPMI-22-4-0456.
- [60] Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J. & Ongena M., 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact* **27**(2), 87–100, DOI:10.1094/MPMI-09-13-0262-R.
- [61] Kim K., Jung S.Y., Lee D.K., Jung J.-K., Park J.K., Kim D.K. & Lee C.-H., 1998. Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, 11Surfactin was formerly referred to as PI-003. a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology* **55**(7), 975–985, DOI:10.1016/S0006-2952(97)00613-8.
- [62] Park S.Y. & Kim Y., 2009. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK- κ B, MAPK and Akt pathway. *International Immunopharmacology* **9**(7), 886–893, DOI:10.1016/j.intimp.2009.03.013.
- [63] Aleti G., Lehner S., Bacher M., Compant S., Nikolic B., Plesko M., Schuhmacher R., Sessitsch A. & Brader G., 2016. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* **18**(8), 2634–2645, DOI:10.1111/1462-2920.13405.
- [64] Li J., Lai S., Gao G.F. & Shi W., 2021. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* **600**(7889), 408–418, DOI:10.1038/s41586-021-04188-6.
- [65] Lytras S., Xia W., Hughes J., Jiang X. & Robertson D.L., 2021. The animal origin of SARS-CoV-2. *Science* **373**(6558), 968–970, DOI:10.1126/science.abh0117.
- [66] Wu D., Wu T., Liu Q. & Yang Z., 2020. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International Journal of Infectious Diseases* **94**, 44–48, DOI:10.1016/j.ijid.2020.03.004.
- [67] Wang M.-Y., Zhao R., Gao L.-J., Gao X.-F., Wang D.-P. & Cao J.-M., 2020. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 587269, DOI:10.3389/fcimb.2020.587269.
- [68] Arya R., Kumari S., Pandey B., Mistry H., Bihani S.C., Das A., Prashar V., Gupta G.D., Panicker L. & Kumar M., 2021. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology* **433**(2), 166725, DOI:10.1016/j.jmb.2020.11.024.

- [69] Castells M.C. & Phillips E.J., 2021. Maintaining Safety with SARS-CoV-2 Vaccines. *New England Journal of Medicine* **384**(7), 643–649, DOI:10.1056/NEJMra2035343.
- [70] Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W., Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U. & Gruber W.C., 2020. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **383**(27), 2603–2615, DOI:10.1056/NEJMoa2034577.
- [71] Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J. & Zaks T., 2021. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **384**(5), 403–416, DOI:10.1056/NEJMoa2035389.
- [72] Crovella S., de Freitas L.C., Zupin L., Fontana F., Ruscio M., Pena E.P.N., Pinheiro I.O. & Calsa Junior T., 2022. Surfactin Bacterial Antiviral Lipopeptide Blocks In Vitro Replication of SARS-CoV-2. *Applied Microbiology* **2**(3), 680–687, DOI:10.3390/applmicrobiol2030052.
- [73] Chowdhury T., Baidara P. & Mandal S.M., 2021. LPD-12: a promising lipopeptide to control COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents* **57**(1), 106218, DOI:10.1016/j.ijantimicag.2020.106218.
- [74] Baidara P., Chowdhury T., Roy D., Mandal M. & Mandal S.M., 2023. Surfactin-like lipopeptides from *Bacillus clausii* efficiently bind to spike glycoprotein of SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **0**(0), 1–12, DOI:10.1080/07391102.2023.2196694.
- [75] Xia B., Luo M., Pang L., Liu X. & Yi Y., 2021. Lipopeptides against COVID-19 RNA-dependent RNA polymerase using molecular docking. *Biomedical Journal* **44**(6, Supplement 1), S15–S24, DOI:10.1016/j.bj.2021.11.010.
- [76] Nasir M.N., Laurent P., Flore C., Lins L., Ongena M. & Deleu M., 2013. Analysis of calcium-induced effects on the conformation of fengycin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **110**, 450–457, DOI:10.1016/j.saa.2013.03.063.
- [77] Sur S., Romo T.D. & Grossfield A., 2018. Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. B* **122**(8), 2219–2226, DOI:10.1021/acs.jpcc.7b11889.
- [78] Horn J.N., Cravens A. & Grossfield A., 2013. Interactions between Fengycin and Model Bilayers Quantified by Coarse-Grained Molecular Dynamics. *Biophys J* **105**(7), 1612–1623, DOI:10.1016/j.bpj.2013.08.034.

- [79] Taira T., Yanagisawa S. & Imura T., 2021. Influence of inorganic and organic counter-cations on the surface properties and self-assembly of cyclic lipopeptide surfactin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **626**, 126973, DOI:10.1016/j.colsurfa.2021.126973.

VIII. ANNEXES

Tableau 2 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 60 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
0 : 1	0	60
1 : 40	2,20	60
1 : 20	4,39	60
1 : 10	8,78	60
1 : 5	17,57	60
1 : 3	29,28	60
1 : 2	43,92	60
1 : 1	87,84	60

Tableau 3 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 65 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
0 : 1	0	65
1 : 40	2,38	65
1 : 20	4,76	65
1 : 10	9,52	65
1 : 5	19,03	65
1 : 3	31,72	65
1 : 2	47,58	65
1 : 1	95,17	65

Tableau 4 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 70 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
0 : 1	0	70
1 : 40	2,56	70
1 : 20	5,12	70
1 : 10	10,25	70
1 : 5	20,50	70
1 : 3	34,16	70
1 : 2	51,24	70
1 : 1	102,49	70

Tableau 5 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de surfactine est de 75 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
0 : 1	0	75
1 : 40	2,75	75
1 : 20	5,49	75
1 : 10	10,98	75
1 : 3	36,60	75
1 : 2	54,90	75
1 : 1	109,81	75

Tableau 6 : Calcul de la concentration en fengycine en fonction des ratios sélectionnés lorsque la concentration de lichénysine est de 40 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Lichénysine
0 : 1	0	40
1 : 40	1,44	40
1 : 20	2,88	40
1 : 10	5,76	40
1 : 5	11,52	40
1 : 3	19,20	40
1 : 2	28,80	40
1 : 1	57,61	40

Tableau 7 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 25 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
1 : 0	25	0
3 : 1	20,4	4,6
2 : 1	18,6	6,4
1 : 1	14,9	10,2
1 : 2	10,6	14,5
1 : 3	8,2	16,8
0 : 1	0	25

Tableau 8 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 50 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
1 : 0	50	0
3 : 1	40,7	9,3
2 : 1	37,3	12,7
1 : 1	29,7	20,3
1 : 2	21,2	29,0
1 : 3	16,4	33,6
0 : 1	0	50

Tableau 9 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 75 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
1 : 0	75	0
3 : 1	61,1	13,9
2 : 1	55,9	19,1
1 : 1	44,6	30,5
1 : 2	31,7	43,3
1 : 3	24,6	50,4
0 : 1	0	75

Tableau 10 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 100 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Surfactine
1 : 0	100	0
3 : 1	81,5	18,6
2 : 1	74,6	25,5
1 : 1	59,4	40,6
1 : 2	42,3	57,8
1 : 3	32,8	67,2
0 : 1	0	100

Tableau 11 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 12,5 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Lichénysine
1 : 0	12,5	0
3 : 1	10,2	2,4
2 : 1	9,3	3,2
1 : 1	7,4	5,1
1 : 2	5,3	7,4
1 : 3	4,1	8,5
0 : 1	0	12,5

Tableau 12 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 25 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Lichénysine
1 : 0	25	0
3 : 1	20,4	4,7
2 : 1	18,6	6,5
1 : 1	14,8	10,3
1 : 2	10,5	14,6
1 : 3	8,1	16,9
0 : 1	0	25

Tableau 13 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine lorsque la concentration totale en lipopeptides est fixée à 50 µg/mL.

Ratio	Concentration (µg/mL)	
	Fengycine	Lichénysine
1 : 0	50	0
3 : 1	40,7	9,4
2 : 1	37,2	12,9
1 : 1	29,5	20,5
1 : 2	21	29,2
1 : 3	16,3	34,0
0 : 1	0	50

Tableau 14 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine au ratio 1 : 1.

Concentration totale en lipopeptides	Concentration	
	Fengycine	Surfactine
25	14,86	10,15
50	29,71	20,29
75	44,57	30,44
100	59,43	40,59
125	74,27	50,73
150	89,13	60,88
175	103,98	71,02
200	118,84	81,17

Tableau 15 : Calcul de la concentration en fengycine et en surfactine au ratio 1 : 2.

Concentration totale en lipopeptides	Concentration	
	Fengycine	Surfactine
25	10,57	14,44
50	21,13	28,87
75	31,70	43,30
100	42,27	57,74
125	52,83	72,17
150	63,40	86,61
175	73,97	101,04

Tableau 16 : Calcul de la concentration en fengycine et en lichénysine au ratio 1 : 1.

Concentration totale en lipopeptides	Concentration	
	Fengycine	Surfactine
10	5,90	4,10
25	14,76	10,25
40	23,62	16,40
50	29,51	20,49
75	44,27	30,74
100	59,02	40,98
125	73,78	51,23
150	88,53	61,47