Zeitschrift: Bulletin romand d'entomologie
Herausgeber: Société vaudoise d'entomologie ; Société entomologique de Genève
Band: 23 (2005-2006)
Heft: 1

Artikel: Les insectes : une source inépuisable d'antibiotiques naturels?
Autor: Menin, Laure
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-986330

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

BULLETIN ROMAND D'ENTOMOLOGIE **23** : 1 - 22 (2005)

Les insectes, une source inépuisable d'antibiotiques naturels?

par Laure MENIN, Chemin Planet 10, CH-1188 GIMEL

Dans le cadre des clubs et des revues d'entomologie, de nombreux articles traitant de la description de nouvelles espèces d'insectes, de leur biotope ou encore de leur élevage sont publiés chaque année. Mais rares sont les collectionneurs entomologistes qui connaissent la réponse immunitaire des insectes et le fabuleux potentiel thérapeutique qu'ils représentent. Il y a encore quelques années, certains biologistes auraient même pu être choqués d'entendre parler d'immunologie pour un organisme dépourvu d'anticorps, de lymphocytes et de mémoire immunitaire, tant ce domaine reste méconnu. Cette revue a pour but de donner un aperçu général et simplifié des mécanismes de défense des insectes, de la structure des molécules impliquées, de leur mode d'action ainsi que des différentes applications thérapeutiques qui en découlent. De plus, un parallèle avec la réponse immunitaire des vertébrés est présenté, puisque cette dernière comporte une réponse immunitaire innée très proche de celle des invertébrés, qui coexiste avec la réponse adaptative clonale.

Introduction

Les insectes, contrairement à nous, ne fabriquent pas d'anticorps pour lutter contre les microorganismes. Leur mécanisme de défense est fondé sur des réactions cellulaires et humorales. Les réactions cellulaires impliquent les hémocytes (ou cellules sanguines) qui encapsulent et phagocytent les particules ou organismes étrangers. Les réactions humorales consistent en l'activation de cascades protéolytiques (telles que la coagulation sanguine et la mélanisation) et la synthèse de molécules aux propriétés antibiotiques (peptides, protéines, et substances organiques). Chez l'insecte, cette synthèse intervient quelques minutes après l'infection bactérienne. Les peptides sont sécrétés dans l'hémolymphe (sang) et atteignent une concentration maximale en moins d'un jour après l'agression. Chez les insectes à métamorphose complète (holométaboles), la synthèse des peptides antimicrobiens se fait dans le corps gras (équivalent du foie chez les mammifères) et ces derniers sont sécrétés

dans l'hémolymphe. Ches les insectes à métamorphose incomplète (hétérométaboles), les peptides antimicrobiens sont stockés dans les cellules sanguines et sont libérés dans le sang par exocytose suite à une infection. Ces peptides antimicrobiens constituent une véritable ligne de défense contre les invasions microbiennes.

L'histoire des peptides antimicrobiens remonte aux années 1980 avec les recherches engagées par Hans Boman sur le papillon *Hyalophora cecropia* aboutissant à la découverte de la cécropine et de l'attacine. En 1986, Michael Zasloff s'étonne de voir les grenouilles survivre dans des mares, véritables «bouillons de culture» où les germes pullulent. Il ausculte ces batraciens et découvre dans leur peau des substances qu'il appelle magainines («boucliers» en hébreu). Ces peptides jouent le rôle de service commando pour détruire la paroi de toute cellule ou bactérie menaçante. Depuis cette date, les scientifiques ont identifié plus de 1000 peptides anti-infectieux aussi bien chez les plantes, les bactéries, les arthropodes et les insectes en particulier, que chez les vertébrés. Chaque espèce possède un arsenal spécifique dirigé contre les microorganismes pathogènes de son environnement particulier.

Les insectes, avec plus d'un million d'espèces, constituent un formidable réservoir de molécules. D'autre part, leur capacité à coloniser des biotopes variés et parfois insalubres laisse présumer de l'efficacité de leur réponse immunitaire et de leurs mécanismes de défense. La réponse immunitaire des insectes est un mécanisme de défense ancien, c'est le seul connu chez les invertébrés à ce jour. Il est dit inné ou non adaptatif car il ne possède pas de phénomène de mémoire comme chez les vertébrés avec la production des anticorps. Comme nous le verrons plus tard, chez les mammifères les peptides antimicrobiens viennent suppléer le système immunitaire et stimulent la réponse immunitaire adaptative. Aujourd'hui, la recherche s'intéresse aux peptides antimicrobiens des invertébrés, notamment ceux des insectes, car ils sont peu cytotoxiques et pour certains résistent bien aux protéases.

Pathogènes et infections nosocomiales

Les infections nosocomiales, c'est-à-dire contractées en milieu hospitalier, sont causées par des souches de microorganismes résistantes aux traitements antibiotiques classiques. Les infections nosocomiales sont généralement causées par les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Legionella,* mais aussi par les champignons *Aspergillus* et les levures *Candida* (Figure 1). Certains sont

des germes dits opportunistes, c'est-à-dire qu'ils deviennent pathogènes sur des organismes affaiblis sur le plan immunitaire, notamment sur des personnes hospitalisées. Parmi eux, les *Aspergillus* créent, après inhalation de spores, des infections systémiques très graves appelées aspergilloses. De même, la levure *Candida* est responsable de mycoses cutanées ou profondes graves appelées candidoses. L'incidence de ces infections nosocomiales continue d'exploser, causant la mort de plusieurs milliers de personnes chaque année. La fréquence des infections nosocomiales en France est comparable à ce qui est observé dans les autres pays développés mais la résistance des bactéries aux antibiotiques est plus fréquente en France que dans d'autres pays européens, constituant un problème de santé publique important. Ce développement croissant des résistances acquises par les microorganismes aux traitements antibiotiques actuels s'explique par l'abus général de l'usage des antibiotiques, leur prescription systématique et souvent inutile, ainsi que leur usage intensif dans la nourriture animale. Dans ce contexte, il devient crucial de développer de nouvelles classes d'antibiotiques capables de limiter l'induction de résistances bactériennes, pour venir ainsi complémenter les traitements actuels dont l'efficacité risque d'aller en diminuant.

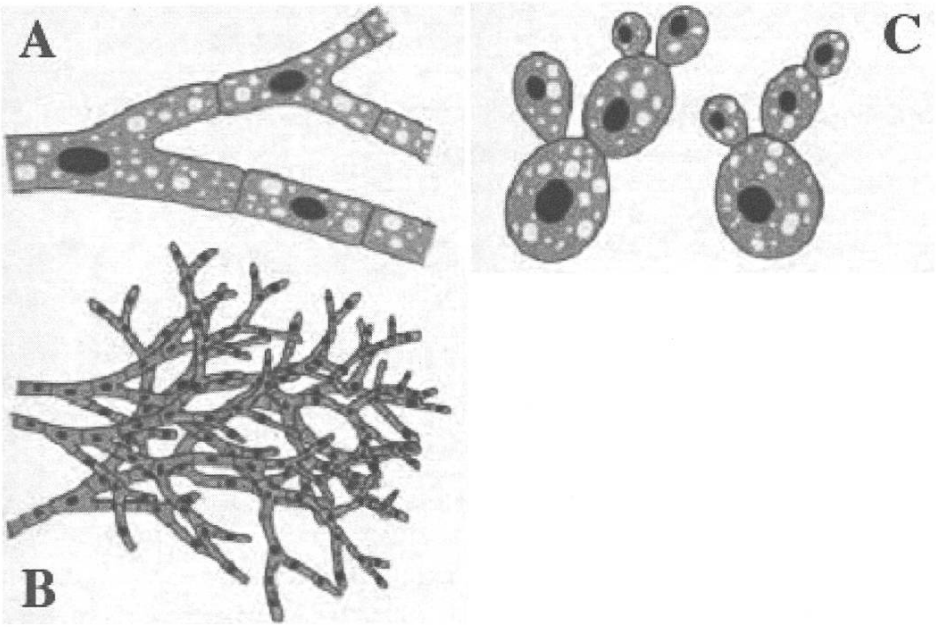

Figure 1. Champignons filamenteux et levures:
A: Détail d'un hyphe; B: Mycélium de champignon filamenteux;
C: Levures

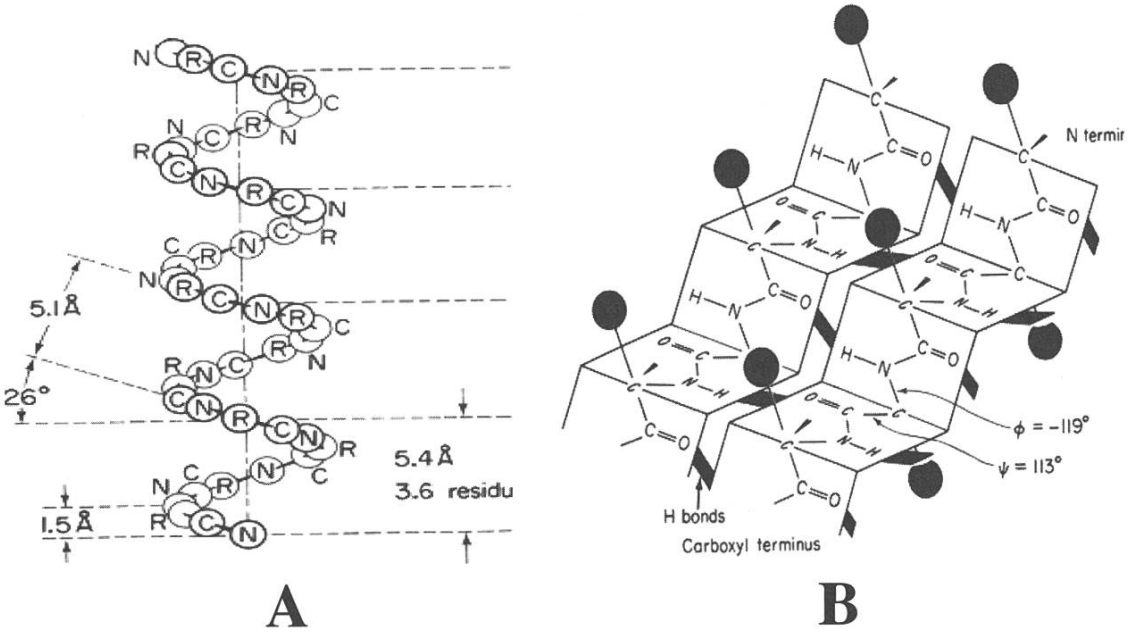

Figure 2. Structure secondaire des peptides. A: Hélice , B: Feuillet

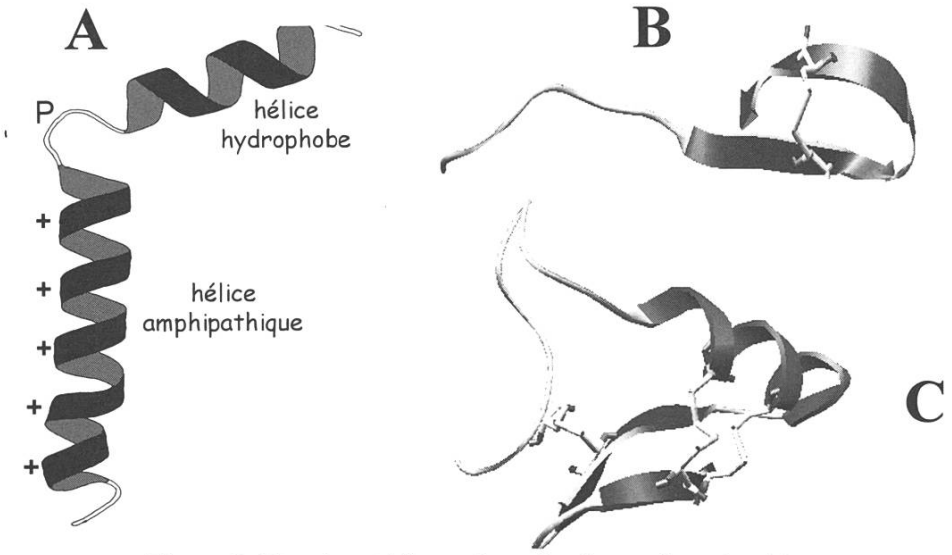

Figure 3. Structure tridimensionnelle d'une cécropine (A), de la thanatine (B) et d'une défensine d'insecte (C).

Structure des peptides antimicrobiens

Les peptides (petites protéines) sont constitués d'un enchaînement reposant sur 20 acides aminés naturels, liés les uns aux autres par une liaison dite peptidique. Ces 20 acides aminés sont composés d'un squelette identique mais ils diffèrent par la structure chimique de leur chaîne latérale qui leur confère des propriétés physico-chimiques extrêmement diverses. Ils peuvent être ainsi regroupés en 4 principales classes: les acides aminés cationiques (chargés positivement) tels que la lysine et l'arginine; les acides aminés anioniques (chargés négativement) tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique; les acides aminés aux propriétés lipophiles (ou hydrophobes) comme la phénylalanine ou la tyrosine; enfin, les acides aminés polaires tels que la sérine ou la thréonine. L'enchaînement simple de ces résidus est appelé structure primaire. De plus, les cystéines ont la particularité de naturellement s'apparier entre elles pour former un pont appelé pont disulfure. Une proline, en raison de sa géométrie, introduit le plus souvent un coude dans la structure peptidique. Plusieurs types de structures stables, dites secondaires, peuvent être rencontrées selon l'enchaînement et la propriété des acides aminés composant le peptide. Il s'agit des hélices et des feuillets . Les hélices sont des structures cylindriques et rigides dont le pas fait exactement 3,6 acides aminés. Ces hélices (Figure 2A) peuvent être amphiphiles (ou amphipatiques), c'est-à-dire posséder un côté lipophile et l'autre cationique, formant ainsi un «détergent» capable d'interagir avec les bicouches lipidiques des membranes, d'en perturber l'organisation et d'induire la lyse cellulaire. Le feuillet (Figure 2B) est un alignement des chaînes peptidiques les unes à côtés des autres, stabilisé par des liaisons hydrogène entre ces chaînes. Les contraintes spatiales imposées plissent ce feuillet. Enfin, les interactions électrostatiques et hydrophobes entre résidus, ainsi que la présence de ponts disulfure replient et imposent des contraintes spatiales à la structure dite alors tertiaire.

Cette variété de structures explique la diversité protéique du monde vivant. De plus, elle reflète l'adaptation des espèces à l'environnement microbien spécifique à chaque niche écologique. Les peptides antimicrobiens sont constitués en moyenne de 15 à 50 acides aminés et sont la plupart du temps cationiques pour pouvoir interagir avec les membranes des bactéries et champignons chargées négativement. Ils sont dérivés de larges précurseurs contenant une séquence signal, et peuvent être soumis à des modifications post-transcriptionnelles, telles qu'une glycosylation (fixation d'un sucre sur un acide aminé) ou la cyclisation du premier acide aminé. Certains peptides peuvent également provenir de la dégradation naturelle de protéines de plus grande taille.

Les principales classes de peptides antimicrobiens sont présentées ci-dessous:

- *Les peptides linéaires en hélice* : Cette famille de peptides a été isolée dans des organismes très distants du point de vue de l'évolution, des invertébrés (insectes, arachnides) aux vertébrés (poissons, amphibiens, mammifères). Les cécropines sont les représentants primitifs de cette famille. Elles ont été isolées majoritairement des lépidoptères et des diptères (stomoxyne [1], cératotoxine [2]), mais également d'hyménoptères (ponéricine, mélittine [3]) et d'isoptères (spinigérine [4]). Ce sont des peptides cationiques de 30 à 40 acides aminés, linéaires et ne contenant pas de cystéine. Au contact d'une membrane lipidique, les cécropines se structurent en deux hélices , l'une amphiphile et l'autre lipophile, séparées par un segment flexible contenant une proline qui coude la structure (Figure 3A). Les cécropines possèdent une homologie importante avec des peptides isolés de la peau d'amphibiens tels que la magainine, bien que ces derniers ne possèdent qu'une seule hélice. Le spectre d'activité de ces peptides est très large puisqu'ils peuvent être antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasitaires et même insecticides, ce qui les rend très attractifs pour l'application thérapeutique. De plus, beaucoup ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes telles que les cellules humaines. La spécificité des cécropines pour les membranes procaryotes proviendrait des compositions lipidiques membranaires différentes, et en particulier de la présence de cholestérol et de phytostérol chez les eucaryotes qui protègerait la membrane de l'action de ces peptides.

- *Les peptides stabilisés par des ponts disulfure*: cette famille comprend les peptides en «épingle à cheveux» à un ou deux ponts disulfure (Figure 3 B), les défensines à 3 ou 4 ponts disulfure, et les peptides en «forme de nœud» possédant également 3 ponts. Ces peptides possèdent des structures mixtes faites d'hélices et d'un feuillet . Chez les insectes, les peptides en épingles à cheveux ne sont représentés que par la thanatine isolée de l'hémiptère *Podisus maculiventris* [5] et la scarabaecine isolée du coléoptère *Oryctes rhinoceros* [32]. La thanatine est un peptide cationique de 21 acides aminés possédant un feuillet à 2 brins repliés en épingle grâce à un pont disulfure. En revanche, on trouve plus communément ces peptides chez les scorpions (androctonine [6]), les araignées (gomésine [7], 2 ponts), les crustacés (polyphémusine et tachyplésine de la limule [8]), les amphibiens du genre *Rana* (brévinine, esculentine, gaegurine [9]), et les mammifères (protégrine de cochon [10], bacténécine de bœuf [11], la plupart contenant 2 ponts disulfure).

Les défensines, constituent sans doute le dénominateur commun le mieux connu des différents systèmes de défense chez les mammifères, les arthropodes (insectes, scorpions), les mollusques et les plantes. Plus de 80 défensines ont été isolées d'insectes appartenant principalement aux ordres des Diptères, Lépidoptères, Coléoptères, Hyménoptères, Hémiptères, Trichoptères, Isoptères, Névroptères et Odonates. Ce sont des peptides cationiques de 33 à 46 acides aminés possédant 3 à 4 ponts disulfures. Certaines défensines ont des propriétés strictement antibactériennes et sont capables de tuer les bactéries en moins d'une minute. Elles n'ont pas d'action lytique sur les cellules eucaryotes, même à des concentrations élevées. Elles possèdent une hélice et un feuillet à 2 brins antiparallèles stabilisés par 3 ou 4 ponts disulfure, formant un motif appelé CS . Ce motif CS est d'ailleurs commun à certaines toxines des venins. Certaines défensines ont été décrites comme antifongiques mais elles sont beaucoup moins nombreuses [12]: il s'agit par exemple de la drosomycine isolée du diptère *Drosophila melanogaster* [13], de l'héliomycine et de la gallérimycine isolées des lépidoptères *Heliothis virescens* [14] et *Galleria mellonella* [15], de la termicine isolée de l'isoptère *Pseudacanthotermes spiniger* [16] et de Alo3 isolée du coléoptère *Acrocinus longimanus* [17]. Les défensines antifongiques agissent en inhibant la germination des spores ou en perforant les hyphes. Leur structure peut varier de celle des défensines antibactériennes par le nombre d'hélices et de brins constituant le feuillet .

- *Les peptides riches en proline:* ces peptides de 14 à 39 acides aminés possèdent une large distribution chez les invertébrés et ont été isolés d'hyménoptères (abaecine isolée de *Bombus pascuorum* et d'*Apis mellifera*, apidaeine isolée de *Apis mellifera*, formaecine isolée de *Myrmecia gulosa* [18, 19, 20]), de diptères (drosocine, diptéricine et metchnikowine isolées de *D. melanogaster* [21]), de lépidoptères (lébocine isolée de *Trichoplusia ni* [22]) et d'hémiptères (pyrrhocoricine isolée de *Pyrrhocoris apterus* [23], métalnikowine isolée de *Palomena prasina* [24]). Les prolines représentent jusqu'à 25% des acides aminés de la séquence, et sont souvent associées en doublets ou en triplets avec des résidus basiques proline-arginine-proline ou proline-histidine-proline. Certains de ces peptides possèdent des carbohydrates (sucres) liés à la sérine ou à la thréonine, c'est le cas par exemple de la pyrrhocoricine, de la formaecine et de la drosocine. Le rôle de ce groupement sucré reste mal compris: il semble qu'*in vitro*, la présence du sucre améliore l'activité de la drosocine et de la formaecine, tandis que la pyrrhocoricine synthétisée sans sucre est plus active que son homologue naturel porteur de sucre. L'activité de ces peptides riches en proline est antibactérienne,

et ils sont plus particulièrement efficaces sur les bactéries à Gram-négatif comme *Pseudomonas, Salmonella* et *Enterobacter*.

- *Les polypeptides riches en glycine:* Ces peptides ont été moins étudiés en raison de leur taille importante (souvent plus de 100 acides aminés) qui rend la caractérisation structurale plus difficile, et de leur faible activité biologique (limitée à certaines bactéries). Ils ont été essentiellement isolés de diptères (diptéricine), de lépidoptères (attacine, glovérine) et de coléoptères (coléoptéricine, holotricine). Ils possèdent plus de 20% de glycine. Certains agissent en synergie avec les cécropines, ces dernières fragilisant la membrane et permettant à ces polypeptides d'agir plus facilement sur leur cible intracellulaire. Les attacines possèdent environ 180 acides aminés et constituent, avec les cécropines, l'un des peptides antimicrobiens majoritaire sécrété par les lépidoptères suite à une infection. L'induction de la synthèse des attacines par l'insecte serait déclenchée par les peptidoglycanes présents à la surface des bactéries. Les glovérines possèdent 130 acides aminés dont 22% de glycine et sont antibactériennes. Elles se lient aux lipopolysaccharides présents à la surface des bactéries. Quant aux peptides riches en glycine de coléoptères tels que la coléoptéricine (isolée d'*Allomirina dichotomus* et *Zophobas atratus* [25, 26]), la rhinocérosine (isolée du dynaste *Oryctes rhinoceros* [27]) ou l'holotricine (isolée d'*Holotrichia diomphalia* [28]), leur taille est moindre (70 à 80 acides aminés). Certains de ces polypeptides riches en glycine peuvent l'être aussi en proline. Leur activité est antibactérienne.

Purification et caractérisation des peptides antimicrobiens

L'extraction des peptides se fait plus facilement au stade larvaire qu'au stade adulte, car le volume d'hémolymphe est généralement plus important. La première étape consiste à induire la réponse immunitaire de l'insecte en lui inoculant un cocktail de bactéries: pour un insecte de petite taille (diptère) l'inoculation se fait par piqûre à l'aide d'une aiguille préalablement trempée dans un culot bactérien, tandis que pour des insectes plus volumineux (coléoptère, lépidoptère) elle se fait par injection d'une solution bactérienne. L'induction de la réponse immunitaire dure 24h, puis l'insecte est anesthésié et l'hémolymphe collectée par prise de sang. Le volume d'hémolymphe varie de 0,001 ml pour un asticot de drosophile à 1 ml pour certaines chenilles ou larves de coléoptères. Quand le volume d'hémolymphe est trop faible, un extrait de corps entiers peut être réalisé par broyage de l'insecte dans de l'azote liquide. L'hémolymphe est par la suite séparée en de multiples fractions par des

étapes successives de chromatographie liquide. La détection des peptides antimicrobiens est basée sur un test dit «d'inhibition de croissance»: les différentes fractions sont ajoutées à des cultures fraîches de différents microorganismes (bactéries, champignons, levures). L'absence de croissance du microorganisme après 24h indique la présence d'un antibiotique potentiel dans la fraction. Plusieurs étapes chromatographiques suivies de tests d'activité sont nécessaires pour parvenir à un composé pur dont la structure chimique (enchaînement et nature des acides aminés qui le composent) est résolue ensuite par différentes techniques physico-chimiques. Le peptide caractérisé devra être alors produit à plus large échelle, afin d'obtenir une idée plus précise de son spectre d'activité sur un grand nombre de microorganismes notamment certains pathogènes pour l'homme: bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, champignons filamenteux opportunistes tels que *Aspergillus fumigatus*, levures telles que *Candida albicans*, parasites, virus. Ce spectre d'activité opposé à sa toxicité sur les cellules eucaryotes permet de définir le potentiel thérapeutique du peptide.

Exemples chez quelques insectes

Au regard du nombre d'ordres, mais aussi de familles, de genres et d'espèces d'insectes existant à la surface du globe, l'éventail de ce qui a été étudié de manière approfondie reste évidement faible. Les ordres les mieux étudiés sont ceux des Diptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hyménoptères et Hémiptères. La table 1 résume de manière non exhaustive la liste les peptides antimicrobiens trouvés dans les principaux ordres et espèces étudiés.

Chez les lépidoptères, environ une dizaine d'espèces ont été étudiées appartenant à 8 familles dont les Nymphalidae, Bombycidae, Saturnidae, Noctuidae, Arctiidae, Sphingidae, Pyralidae et Psychidae. Les cécropines sont les plus fréquemment isolées mais on trouve également des polypeptides antibactériens riches en glycine tels que les attacines (présentes aussi chez les diptères) et les glovérines. La glovérine est un polypeptide d'environ 130 acides aminés, sans cystéine et contenant environ 20% de glycine. Son activité antibactérienne est comparable à celle de l'attacine. Chez la noctuelle *Heliothis virescens*, l'héliomicine est un peptide comprenant une hélice et un feuillet à 2 brins stabilisés par 3 ponts [34]. L'héliomicine affecte le développement des champignons filamenteux et des levures, avec une activité de l'ordre du M sur

des souches telles que *Aspergillus* et *Candida*. Un analogue naturel de l'héliomicine, Ard1, a également été décrit du Nymphalidae *A. demophoon* [35]. Bien que Ard1 ne diffère de l'héliomicine que par deux acides aminés, son activité est plus forte sur certains pathogènes humains tels que *A. fumigatus*, *C. albicans* et *Cryptococcus neoformans*.

Chez les Diptères, une vingtaine d'espèces ont été étudiées : elles appartiennent à 7 familles dont les Calliphoridae, Drosophilidae, Muscidae, Psychodidae, Sarcophagidae, Tephritidae, et Culicidae. *Drosophila melanogaster* reste l'insecte le plus étudié car son génome a été séquencé mais aussi car c'est un modèle de premier choix pour les recherches qui portent sur les processus de biologie cellulaire et de biologie du développement communs aux eucaryotes supérieurs, dont les humains. Chez la drosophile, plus de 8 peptides antimicrobiens appartenant aux principales familles de peptides ont été décrits. Cinq d'entre eux (diptéricine, cécropine, attacine, drosocine, défensine) possèdent des activités dirigées contre les bactéries. La drosomycine possède 4 ponts disulfure et une certaine homologie avec des défensines de plantes. Elle est active uniquement sur les champignons, inhibant la germination des spores. Elle est sécrétée en grande quantité dans l'hémolymphe, à des concentrations pouvant atteindre 0,4 mM. Enfin, la metchnikowine possède une activité à la fois antibactérienne et antifongique. Il a été établi que la réponse antimicrobienne de la drosophile présente un certain niveau de spécificité. Ainsi, les gènes codant les peptides antimicrobiens sont induits de manière différente selon le type de microorganisme injecté expérimentalement. Les gènes codant les peptides antibactériens sont très fortement induits après infection par des bactéries, tandis que les champignons sont les meilleurs inducteurs du gène codant pour la drosomycine antifongique [29]. Les mécanismes de reconnaissance des bactéries ou champignons font intervenir des récepteurs appelés «pattern recognition proteins», qui reconnaissent spécifiquement des molécules présentes sur l'enveloppe des microorganismes telles que les lipopolysaccarides (LPS), le mannose, les peptidoglycanes, ou encore les beta-1,3-glucanes des champignons. La liaison de ces ligands aux récepteurs déclenche immédiatement les mécanismes de défense immunitaire tels que la phagocytose, l'activation des cascades protéolytiques et la synthèse des peptides antimicrobiens [30]. Chez les Diptères, les moustiques vecteurs du paludisme en Afrique tels que l'anophèle (*Anopheles gambiae*) ou de la fièvre jaune tels que *Aedes aegypti* ont été également étudiés. Une ébauche de la séquence du génome de l'anophèle est librement accessible depuis 2002. Celle d'*Aedes aegypti* est également en cours. La gambicine isolée à partir des cellules sanguines de l'anophèle a des propriétés antibactériennes et antifongiques,

mais est également létale pour les oocystes du parasite *Plasmodium berghei* [31]. La gambicine est un peptide de 61 acides aminés à 4 ponts disulfure, et sans homologie de séquence avec d'autres peptides répertoriés dans les banques de données. L'expression de la gambicine est induite après infection dans l'intestin, le corps gras et les hémocytes.

Une dizaine d'espèces de coléoptères a été étudiée appartenant à 6 familles: les Cerambycidae, Dynastidae, Scarabaeidae, Cetonidae, Tenebrionidae et Chrysomelidae. En réponse à une infection, les coléoptères sécrètent majoritairement des défensines antibactériennes et des peptides riches en proline et en glycine tels que la coléoptéricine isolée d'*A. dichotomus* et de *Z. atratus* [25, 26], la rhinocérosine isolée d'*O. rhinoceros* [27] et l'acaloleptine isolée d'*A. luxuriosa* [28]. Ces derniers sont des peptides très basiques contenant de nombreux motifs glycine-proline, et possédant une activité antibactérienne stricte. La rhinocérosine possède 94% d'identité avec la coléoptéricine et 75% d'identité avec l'holotricine isolée de *H. diomphalia*. L'homologie avec l'acaloleptine isolée de *A. luxuriosa* est plus faible, de l'ordre de 45%. La scarabaecine trouvée chez *O. rhinoceros* est la seule isolée de ce type chez les coléoptères; elle présente un pont disulfure, ainsi qu'un feuillet à 2 brins et une hélice situés dans la partie terminale [32]. Elle est strictement antifongique et appartient à la famille des «chitin-binding proteins». Trois peptides originaux Alo-1, -2 et -3 ont également été décrits du longicorne *Acrocinus longimanus*, l'arlequin de Cayenne [33]. Ces peptides contiennent 3 ponts et un feuillet à 3 brins, formant une structure globale en forme de nœud, seule structure de ce type isolée chez les insectes à ce jour. Ces peptides sont strictement antifongiques, avec une forte activité sur les levures pathogènes du genre *Candida*.

Chez les hémiptères, le peu d'espèces étudiées appartiennent aux familles des Pentatomidae, Pyrrhocoridae et Reduviidae. Il est difficile de donner des généralités sur les familles de peptides caractérisés chez les hémiptères, compte tenu du faible nombre de représentants étudiés. Il semble néanmoins qu'aucun peptide linéaire en hélice n'ait été décrit. En revanche, les peptides riches en cystéine ou proline sont plus nombreux. La thanatine déjà décrite précédemment, isolée du Pentatomidae *Podisus maculiventris*, possède un spectre d'activité très large: elle est active à de faibles concentrations sur des bactéries, champignons filamenteux et levures. Une étude récente a montré que la thanatine est active sur 3 souches cliniques multirésistantes de bactéries et qu'elle améliore l'activité d'antibiotiques tels que la tetracycline sur une souche résistante de la bactérie *Enterobacter aerogenes* [36]. De plus, ce peptide est dépourvu de toxicité envers les cellules eucaryotes, ce qui en

fait un bon candidat pour le développement thérapeutique. Ajoutons à ces avantages sa faible taille, atout majeur pour la production industrielle de ce peptide. Trois peptides antimicrobiens ont été isolés de *Pyrrhocoris apterus*. La pyrrhocoricine est un petit peptide contenant 25% de proline en motifs proline-arginine-proline et portant une thréonine glycosylée [23]. La pyrrhocoricine possède 55% d'homologie avec la drosocine, peptide antibactérien glycosylé isolé de *D. melanogaster*. Elle possède une activité antibactérienne et une étude a montré qu'à faible dose, la pyrrhocoricine est stable, non toxique, et qu'elle protège les souris d'une infection par *E. coli* [37]. Son action sur les bactéries serait bactériostatique et non lytique, et son mode d'action n'impliquerait pas la formation de pores membranaires, mais plutôt l'interaction stéréo-sélective avec une cible cellulaire. L'hémiptéricine est un peptide de 133 acides aminés riche en glycine, possédant un grand nombre de résidus chargés positivement et négativement répartis sur toute la séquence et une certaine homologie avec la partie riche en glycine de la diptericine des diptères.

Enfin, chez les hyménoptères, les 5 familles étudiées sont les Apidae, Vespidae, Ichneumonidae, Sphecidae et Formicidae. Des peptides antimicrobiens ont été isolés de l'hémolymphe mais aussi de leur venin. La plupart des familles de peptides sont représentées: les hélices (mélittine, ponéricines), les défensines et les peptides riches en proline (abaecine, apidaecine) et en glycine (hymenoptaecine). Les apidaecines, isolées de l'hémolymphe de plusieurs hyménoptères après induction bactérienne, sont de petits peptides basiques riches en proline (33%), très stables à la chaleur et actifs sur les bactéries [38, 39]. De manière similaire à la drosocine et à la pyrrhocoricine, l'effet des apidaecines sur les bactéries serait bactériostatique et leur mode d'action n'impliquerait pas la formation de pores membranaires, mais plutôt l'interaction stéréo-sélective avec une cible cellulaire. La royalisine (90% identique à l'hyménoptécine) est un peptide antibactérien amphipathique à 3 ponts disulfure isolé de la gelée royale de *A. mellifera*, proche des sapécines et de la phormicine isolée de larves du diptère *Phormia terranovae* [40].

Table 1. Peptides antimicrobiens décrits des espèces d'insectes étudiées jusqu'à présent, classés par ordre d'insectes.
L'activité principale du peptide est indiquée par un chiffre en exposant :
1, antibactérien; 2, antifongique; 3, insecticide : 4, antiparasitaire.
Les peptides soulignés portent une glycosylation (sucre).

Espèces	Hélice	Cysteine-riche	Proline-riche	Glycine-riche	Autres
Lépidoptères					
Archeoprepona demophoon	Cécropines[1]	Ard1[2]			
Bombyx mori	Cécropines[1] Enbocine[1] Moricines[1]		Lébocines[1]	Attacines[1] Glovérine[1]	Lysozyme
Galleria mellonella		Gallerimycine[2] Sf-Cobatoxine[1]		Glovérine[1]	
Heliothis virescens	Viresceine[1]	Héliomicine[2]			Lysozyme
Hyalophora cecropia	Cécropines[1]			Attacines[1]	Hémoline
Hyphantria cunea	Hyphancine[1]		Attacines[1]	Hémoline Lectine	
Manduca sexta	Bactéricidine[1] Cécropine[1]		Attacines[1]	Hémoline Glovérine[1]	Serpine
Oiketicus kirbyi	Cécropine[1]	Psychimicine[1,2]			
Spodoptera frugiperda		Sf-cobatoxines[1] Spodoptericine[1] Gallerimycine[2]			
Spodoptera littloralis		Spodomicine[2]			
Samia cynthia				Attacines[1]	
Diptères					
Calliphora vicina					Alloferon
Ceratitis capitata	Cécropines[1] Cératotoxines[1]				
Culex pipiens	Cécropines[1]	Défensine[1] Gambicine[1,2,4]			

Espèces	Hélice	Cysteine-riche	Proline-riche	Glycine-riche	Autres
Drosophila melanogaster	Andropine[1] Cécropines[1]	Défensine[1] Drosomycine[2]	Drosocin[1] Metchnikowine[1, 2]	Attacines[1]	DIMs Diptéricines[1]
Protophormia terraenovae		Phormicine[1]		Diptéricines[1]	
Sarcophaga peregrina	Sarcotoxines[1]	Sapécines[1]		Diptéricine[1]	Antifungal protein (His riche)
Stomoxys calcitrans	Stomoxyne[1,2,4]	Défensines[1]			
Aedes aegypti	Cécropine[1]	Défensines[1]			
Anopheles gambiae	Cécropines[1]	Défensine[1] Gambicine[1,2,4]			
Phlebotomus duboscqi		Défensine[1]			
Coléoptères					
Acalolepta luxuriosa		Défensine[1]		Acaloleptines[1]	
Acrosinus longimanus		Alo[2]			
Allomyrina dichotoma		Défensines[1]		Coléoptericines[1]	
Leptinotarsa decemlineata					
Holotrichia diomphalia				Holotricines[1]	
Oryctes rhinoceros		Défensine[1] Scarabaecin[2]		Rhinocérosine[1]	
Protaetia brevitarsis				Protaetines[1]	
Tenebrio molitor		Ténecin[1]			Ténecin 3[2] (His-riche)
Zophobas atratus		Défensine[1]		Coléoptericine[1]	

Espèces	Hélice	Cysteine-riche	Proline-riche	Glycine-riche	Autres
Hyménoptères					
Apis mellifera	Mélittine	Défensine[1] Royalisine1	Abaecine[1] Apidaecines1	Hymenoptaecine[1]	Sécapine
Bombus pascuorum		Défensine[1]	Abaecine[1] Apidaecine[1]		
Coccygomimus disparis			Apidaecine[1]		
Dolichovespula maculata			Apidaecine[1]		
Paravespula germanica			Apidaecines[1]		
Sphecius speciosus			Apidaecines[1]		
Vespa crabo	Mastoparan				
Vespula maculifrons			Apidaecines[1]		
Myrmecia gulosa			Formaecine[1]		
Pachycondyla goeldii	Ponéricines[1,2,3]				
Hémiptères					
Palomena prasina		Défensine[1]	Métalnikowines[1]		
Podisus maculiventris		Thanatine[1, 2]			
Pyrrhocoris apterus		Défensine[1]	Pyrrhocoricine[1]	Hémiptericine[1]	
Rhodnius prolixus		Défensines[1]			
Isoptères					
Pseudacanthotermes spiniger	Spinigérine[1]	Termicine[2]			
Drepanotermes rubriceps		Termicine[2]			
Nasutitermes walkeri		Termicine[2]			
Tumulitermes pastinator		Termicine[2]			
Divers					
Locusta migratoria		Locustine[1]			
Aeschna cyanea		Défensine[1]			

Enfin, chez les hyménoptères les peptides antimicrobiens ont également été isolés du venin, laissant supposer leur rôle de défense contre les microorganismes pathogènes venant de la proie ou de l'agresseur. C'est le cas de la mélittine de *A. mellifera* et des ponéricines isolées du venin de la fourmi prédatrice *Pachycondyla goeldii* [3]. Les ponéricines sont des hélices dont il a été trouvé 15 isoformes différentes. Elles sont antibactériennes, antifongiques mais également certaines présentent une activité insecticide sur les grillons et les criquets.

Mode d'action

Il est très intéressant de constater que pour leur mode d'action, les peptides antimicrobiens ont exploité une différence fondamentale entre un microbe et un organisme multicellulaire: la structure de la membrane externe. Chez les bactéries, la surface de la membrane externe est composée de lipides dont les têtes sont chargées négativement. Au contraire, chez les cellules de plantes et d'animaux, cette membrane est composée de lipides neutres, de cholestérol et de phytostérol et de lipides négativement chargés mais dont la tête chargée est orientée vers le cytoplasme de la cellule. La présence de cholestérol dans la membrane des cellules animales réduit l'efficacité des peptides antimicrobiens, probablement grâce à une stabilité renforcée de cette membrane par le cholestérol et/ou à une interaction de ce composé avec le peptide. Le mode d'action le plus généralement proposé est l'interaction électrostatique et/ou hydrophobe du peptide positivement chargé avec la membrane qui provoque un déplacement des lipides et une perturbation de la structure membranaire. Le microbe serait ainsi tué par dépolarisation de sa membrane et par la création de «trous» induisant la fuite des composants cytoplasmiques. Par exemple, il a été montré que la défensine antibactérienne de *Phormia* perturbe la perméabilité de la membrane cytoplasmique des bactéries, induisant ainsi la perte des électrolytes du cytoplasme, une dépolarisation de la membrane, une diminution de l'ATP cytoplasmique et une inhibition de la respiration [41]. Les peptides riches en proline agissent plus lentement que les défensines ou cécropines. De plus, leur mode d'action est stéréospécifique, de sorte que seules les formes énantiomères L sont actives (les énantiomères D de drosocine, apidaecine et pyrrhocoricine sont totalement inactifs), ce qui exclu un mécanisme d'action de type perforation membranaire et favorise l'hypothèse d'une interaction avec un récepteur spécifique. Enfin, dans certains cas, le peptide peut rentrer dans la cellule pour atteindre sa cible. Des hypothèses évoquent l'interaction de certains de ces peptides avec des protéines dites

chaperones [37] responsable du repliement d'autres protéines. PR-39, un peptide riche en proline et arginine isolé de l'intestin de cochon, agit en stoppant la synthèse de l'ADN bactérien dans les 3 minutes [42].

Parallèle avec la réponse immunitaire des vertébrés

Chez les invertébrés, aucune molécule apparentée aux immunoglobulines n'a pu être détectée. Cette absence d'immunité à mémoire aussi appelée adaptative peut s'expliquer par leur courte vie et leur taux de reproduction élevé: pour ces organismes, un tel système serait alors mal adapté et d'un coût énergétique ou métabolique beaucoup trop élevé. Le système immunitaire aurait donc évolué en s'adaptant aux divers modes de vie des organismes vivants: pour les organismes simples et à croissance rapide (excepté les crustacés et mollusques), un système de défense chimique à induction rapide mais relativement peu spécifique, à spectre d'action étendu mais fixe; pour les organismes plus complexes et à croissance lente, une défense à mémoire dont l'induction est plus lente mais qui procure une couverture spécifique et de longue durée contre les germes pathogènes. Chez les mammifères, le système inductible non spécifique de défense chimique coexiste avec le système adaptatif spécifique dit «à mémoire».

L'étude de la réponse immunitaire innée de la drosophile a permis, d'une part de constater de grandes similitudes avec celle des mammifères et d'autre part de mieux comprendre cette dernière. En de nombreux points, la réponse antimicrobienne des insectes évoque la réponse de phase aiguë des mammifères: réactions de coagulation, phagocytose, synthèse des peptides antimicrobiens et voies de signalisation. Chez la drosophile, les gènes des peptides antimicrobiens sont régulés grâce à des régions situées en amont appelées promoteurs, activés par fixation de facteurs initiant la transcription des gènes en acides ribonucléiques messagers (ARNm) qui vont être traduits en protéines. Ces facteurs se fixent notamment sur les motifs kB. Ces motifs kB sont nécessaires pour l'induction des gènes antibactériens après infection. Chez les mammifères, ces motifs sont présents et sont le site de fixation du facteur nucléaire NF-kB, un facteur jouant un rôle important dans le contrôle des gènes induits au cours de la réponse immunitaire et inflammatoire. Chez ces derniers, de très nombreux signaux peuvent activer NF-kB tels que des motifs structuraux spécifiques des microorganismes infectieux. Après activation de NF-kB, une cascade de réactions biochimiques conduit à la transcription des gènes contrôlés pas ce facteur de transcription. Chez la drosophile, les protéines constituant NF-kB ont été identifiées et leur rôle

dans le contrôle des gènes codant pour les peptides antimicrobiens a été établi [43, 44, 45]. Ainsi, les protéines impliquées dans les voies de signalisation ont été conservées dans l'évolution entre les plantes, les insectes et les mammifères. Ceci montre l'universalité et l'origine évolutive très ancienne des réactions immunitaires.

Chez les mammifères, les défensines et représentent les peptides antimicrobiens les plus abondants. Les défensines de vertébrés se distinguent essentiellement par l'organisation de leurs ponts disulfure et agissent localement à différents endroits. Les défensines sont exprimées de manière constitutive, essentiellement dans les granules des neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Les défensines sont induites par une blessure et sont synthétisées au niveau des muqueuses et de l'épithélium (poumon, intestin, reins, peau, trachée). Ces défensines possèdent un large spectre d'activités antibactérienne, antifongique mais aussi antivirale, anticancéreuse et antiparasitaire. Les défensines de vertébrés sont multifonctionnelles: outre leur activité antibactérienne, elles déclenchent et orientent la réponse immunitaire adaptative [46] en attirant les cellules lymphocytaires sur le lieu de l'infection. La présence des défensines est indispensable pour lutter contre sa propre flore bactérienne. Elles sont synthétisées dès la 13ème semaine de gestation et sont présentes dans le liquide amniotique.

Phénomènes de résistance bactérienne

De nombreux chercheurs soutiennent que les phénomènes de résistance aux peptides antimicrobiens sont hautement improbables du fait qu'en perforant leur membrane, les peptides s'attaquent à leur «talon d'Achille». Pour évoluer vers la résistance, une bactérie devrait donc changer la composition et l'organisation des lipides membranaires, solution trop coûteuse pour être probable. De plus, avec des peptides qui agissent en moins de 1 minute comme les défensines, les bactéries sont incapables de muter aussi rapidement. Rien ne prouve cependant que l'apparition d'une résistance est impossible dès lors qu'une pression de sélection s'installe sur les bactéries, par exemple dans le cas de peptides agissant lentement comme les peptides riches en proline. On sait néanmoins que certaines bactéries du genre *Marganella* et *Serratia* sont capables de diminuer la densité des lipides de leur membrane de façon à diminuer les sites d'interaction avec le peptide antimicrobien. Certaines autres espèces de bactéries sécrètent des protéases qui détruisent les peptides en les tronçonnant en de multiples morceaux. En réalité, très peu d'équipes se sont intéressées à ce problème car il faut produire des

quantités importantes de peptides et effectuer de nombreux tests pour éventuellement observer une résistance.

Applications thérapeutiques et sociétés de biotechnologie

Un certain nombre de sociétés de biotechnologie ont vu le jour pour exploiter le potentiel thérapeutique des peptides antimicrobiens. A l'heure actuelle, les molécules qui se poursuivent en phase cliniques ont pour la plupart une vocation à application topique (sous forme de crème ou de spray) et non systémique. En France, la société Entomed crée en 1999 a été la seule spécialiste de l'exploration des peptides antimicrobiens issus d'insectes. Elle développait notamment un antifongique dérivé de l'héliomicine contre les fusarioses et la cédosporiose, infections fongiques orphelines. Cette société est en phase de cessation d'activité non pas par le manque d'efficacité des peptides délivrés pour les analyses en phase pré-clinique mais pour le coût élevé que représenterait un traitement thérapeutique avec ce type de molécule peptidique. Il est un fait que pour arriver sur le marché des antibiotiques avec cette nouvelle génération de molécules, le coût de production et du traitement devra être considérablement réduit pour rivaliser avec le coût d'une molécule chimique simple. Micrologix Biotech, à Vancouver, mène des essais cliniques contre diverses infections des cathéters, en exploitant des peptides dérivés de l'indolicidine bovine. Magainin Pharmaceuticals (USA) a mené jusqu'en 1999 des essais de phase III avec son produit «Pexiganan ou Locilex™», peptide extrait de la peau de la grenouille africaine *Xenopus laevis*, afin de développer un traitement pour l'ulcère du pied chez les diabétiques. La FDA a rejeté ce peptide en fin d'essai clinique de phase III pour manque d'efficacité comparé à un produit déjà sur le marché. La société est devenue Genaera en 2001 et a annoncé un accord avec Du Pont de Nemours pour développer la magainine dans l'agriculture. IntraBiotics (USA) utilise l'analogue synthétique de la protégrine du porc, découverte au début des années 1990 par l'équipe de Robert Lehrer et a mené des essais sur les infections de la bouche chez les immunodéprimés; cette société poursuit des essais cliniques sur la pneumonie associée à la ventilation, une maladie nosocomiale, et sur les complications respiratoires de la mucoviscidose. Enfin, Demegen (USA) développe sous forme d'aérosol un analogue de l'histatine, peptide antimicrobien présent dans la salive humaine, pour traiter la mucoviscidose.

Conclusion

Les insectes ont développé un système immunitaire puissant pour lutter contre les infections microbiennes propres à leur niche écologique, en synthétisant des peptides présentant une grande diversité de structures et d'activités. Fabriquer un mélange complexe de plusieurs peptides antimicrobiens permet à l'insecte de mieux se protéger en couvrant un large spectre d'activités antibiotiques. De plus, la synergie d'action entre certains de ces peptides a été prouvée; elle augmenterait encore leur défense immunitaire. Ces peptides sont pour la plupart non toxiques sur les cellules eucaryotes et les phénomènes de résistance bactérienne peu probables. Les insectes représentant numériquement la plus grande classe parmi les êtres vivants, ils constituent un réservoir inépuisable de molécules thérapeutiques dont on espère grandement que certaines d'entre elles pourront voir le jour sous forme de traitement antibiotique. Pour une connaissance plus approfondie sur ce sujet passionnant, le lecteur pourra se référer aux revues récentes [47, 48, 49].

Remerciements

Je remercie chaleureusement le Dr. Philippe Bulet, collègue de travail et ami, pour la lecture critique de ce document.

Bibliographie

[1] Boulanger et al. Biol Chem. 2002; 277(51): 49921-6.

[2] Marchini et al. Insect Biochem Mol Biol. 1993; 23(5): 591-8.

[3] Orivel et al. J Biol Chem. 2001; 276(21): 17823-9.

[4] Lamberty et al. J Biol Chem. 2001; 276 (6): 4085-92.

[5] Fehlbaum et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(3): 1221-5.

[6] Ehret-Sabatier et al. J Biol Chem. 1996; 271(47): 29537-44.

[7] Silva PJ et al. J Biol Chem. 2000; 275(43): 33464-70.

[8] Miyata et al. J Biochem (Tokyo). 1989; 106(4): 663-8.

[9] Simmaco et al. FEBS Lett. 1993; 324(2): 159-61.

[10] Zhao et al. FEBS Lett. 1994; 346 (2-3): 285-8.

[11] Storici et al. FEBS Lett. 1992; 314(2):187-90.

[12] Bulet et al. Innate immunity 2003. Ezekowitz and Hoffmann Eds. 89-107. Humana Press, Totowa NJ.

[13] Fehlbaum et al. J Biol Chem. 1994; 269(52): 33159-63.

[14] Lamberty et al. Biochemistry. 2001; 40(40): 11995-2003.

[15] Schuhmann et al. Arch Insect Biochem Physiol. 2003; 53(3): 125-33.

[16] Lamberty et al. J Biol Chem. 2001; 276(6): 4085-92.

[17] Barbault et al. Biochemistry 2003; 42: 14434-42.

[18] Rees et al. Insect Biochem Mol Biol. 1997; 27(5):413-22.

[19] Casteels et al. Embo J. 1989; 8(8): 2387-91.

[20] Mackintosh et al. J Biol Chem. 1998; 273(11): 6139-43.

[21] Lazzaro et al. Mol Biol Evol. 2003; 20(6): 914-23.

[22] Liu et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 269(3): 803-7.

[23] Cociancich et al. Biochem J. 1994; 300: 567-75.

[24] Chernysh et al. J Insect Physiol. 1996; 42: 81-89.

[25] Sagisaka et al. Insect Mol Biol. 2001; 10(4): 293-302.

[26] Bulet et al. J Biol Chem. 1991; 266(36): 24520-5.

[27] Yang et al. Eur J Biochem. 1998; 255(3): 734-8.

[28] Lee et al. J Biochem (Tokyo). 1994; 115(1): 82-6.

[29] Lemaitre B. Médecine et sciences 1999 ; 15 : 15-22.

[30] Yu et al. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32(10): 1287-93.

[31] Vizioli et al. PNAS USA 2001; 98 (22): 12630-5.

[32] Tomie et al. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 307: 261-6.

[33] Barbault et al. Biochemistry 2003; 42, 14434-14442.

[34] Lamberty et al. Biochemistry 2001; 40 (40): 11995-2003.

[35] Landon et al. Protein Sci. 2004; 13(3): 703-13.

[36] Pages et al. Int J Antimicrob Agents 2003; 22(3):265-9.

[37] Otvos et al. Protein Sci. 2000; 9(4): 742-9.

[38] Casteels et al. EMBO J. 1989; 8(8):2387-91.

[39] Rees et al. Insect Biochem Mol Biol. 1997; 27(5): 413-22.

[40] Fujiwara et al. J Biol Chem. 1990; 265(19): 11333-7.

[41] Cociancich et al. J Biol Chem. 1993; 268(26): 19239-45.
[42] Boman et al. Infect Immun. 1993 ; 61 : 2978-2984.
[43] Imler et al. Curr Opin microbiol. 2000 ; 3(1) : 16-22.
[44] Tauszig et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(19):10520-5.
[45] Hoffmann et al. Nat Immunol. 2002; 3(2):121-6.
[46] Lillard et al. Proc Nat Acad Sci USA. 1999 ; 96 : 651-656.
[47] Bulet et al. Immunol Rev. 2004; 198: 169-84.
[48] Bulet et al. Protein Pept Lett. 2005 ; 12 : 3-11.
[49] Boman et al. J Intern Med. 2003; 254(3) : 197-215.