

M2 Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie, Anticorps Thérapeutiques

LALMANACH A-C, UMR ISP, INRA Centre de Recherche Val de Loire, Nouzilly

Module 5 Immunité innée intestinale: Les peptides antimicrobiens (PAMs)

- Caractéristiques
- Cellules productrices
- Structures
- Activités biologiques

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

In natura: plus de 2600 peptides antimicrobiens recensés en 2015.

Antimicrobial peptide database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

Éléments essentiels de l'immunité innée de l'épithélium: fonction barrière intrinsèque.

Deux familles majeures de peptides antimicrobiens des mammifères :

- Les cathélicidines, à grande variété de structure primaire et secondaire mais prérégion hautement conservée (domaine Nterm cathelin, Cterm LL37).
- Les défensines, α , β , ou θ . Environ 50 α et 90 β chez les mammifères.

Les deux sous-familles α et β de défensines sont codées par un cluster d'au moins 8 gènes sur le chromosome 8p23 chez l'homme.

Les peptides antimicrobiens sont ≤ 5 kDa (30 à 50 AA). Charge nette + et caractère amphipathique.

Tous possèdent une activité bactéricide directe à large spectre (gram+ et gram-), à faible concentration micromolaire in vitro.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Autres facteurs anti-microbiens:

Chez la souris, CRS (cryptdin related sequence) peptides formant des homo ou hétérodimères.

BPI protéine de 55kDa, constituant des polynucléaires neutrophiles, capable de se lier au lipide A du LPS et déstabiliser la membrane externe des bactéries gram-.

Enzymes intestinales antimicrobiennes: PLA2 et lysozyme, dans les granules de Paneth et de neutrophiles

Angiogénine 4 (REG3 gamma)

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des facteurs de l'immunité innée relativement bien conservés au cours de l'évolution.

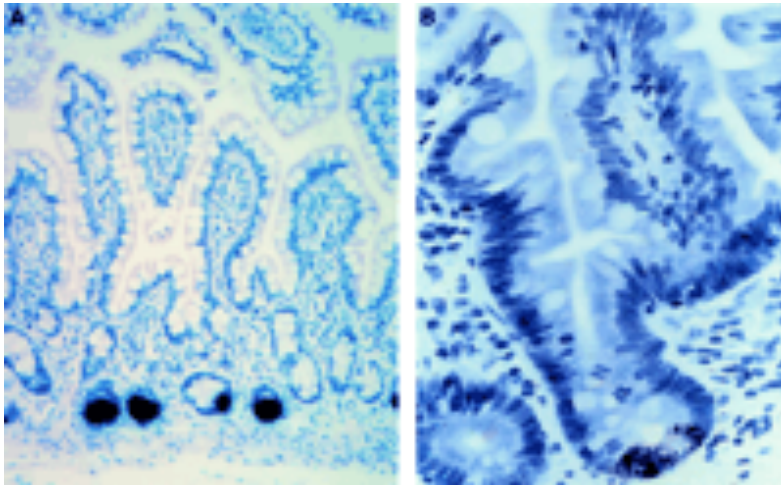
- Retrouvés dans le règne végétal et animal (invertébrés et vertébrés).
- Chez les mollusques jusqu' à l' homme en passant par les oiseaux (β -défensines les plus ancestrales, les α apparaissent chez les mammifères et les θ uniquement chez les primates).
- Analogie des séquences signal des β -défensines aviaires et des peptides cytotoxiques de venin de serpent¹.
- Analogie structurale des peptides du venin de platypus, de la β -défensine 1 de neutrophile bovin et d' un peptide neurotoxique de l' anémone de mer
- Les premières défensines ont été décrites il y a plus de 25 ans à partir d' extraits de neutrophiles².

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les cellules productrices intestinales

Les défensines identifiées à partir des cellules de Paneth: les α -défensines dans les granules sécrétrices.



Localisation of HD5 mRNA (left, silver staining) and peptide (right, brown peroxidase product)*.



Position stratégique en protection des cellules souches multipotentes de l' épithélium

Les entérocytes différenciés du gros intestin peuvent produire des β -défensines et des cathélicidines.

* G. Diamond & C.L. Bevins, Clin. Immunol. Immunopathol. 1998, 88: 221-225.
E. Porter et al. Infect. Immun. 1997, 65: 2389-2395.

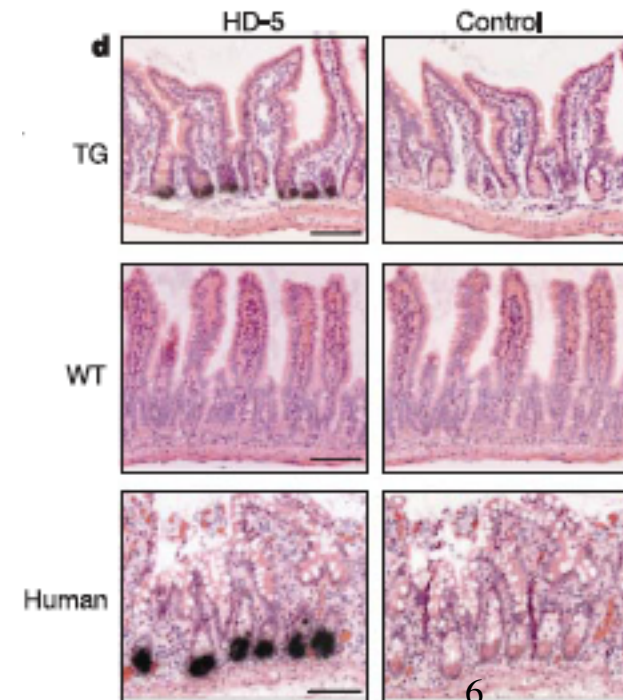
Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les cellules productrices

Produits par les cellules épithéliales et les phagocytes :

- Les phagocytes (polynucléaires neutrophiles) stockent les peptides antimicrobiens dans des granules.
- Les cellules de Paneth peuvent sécréter les peptides anti-microbiens et/ou les stocker dans des granules.
- De manière générale, les α -défensines sont plutôt exprimées constitutivement, leur sécrétion étant régulée par stimulation.



Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin

Nita H. Salzman^{*†}, Dipankar Ghosh^{†‡}, Kenneth M. Huttner[§], Yvonne Paterson^{||} & Charles L. Bevins[‡]

Nature, 2003,
422: 522-526

HIS, sonde ARN AS

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les cellules productrices

Les cellules épithéliales expriment les β -défensines de manière constitutive ou inductible (hBD=human beta-defensin):

- hBD1, hBD3 et hBD4 exprimés constitutivement par les cellules épithéliales du petit et gros intestin
- L'expression d'hBD2 est stimulée par les cytokines inflammatoires, par l'IL-17¹, par les voies des récepteurs pour les PAMP, motifs moléculaires de pathogènes, TLR2 et TLR4², par la voie NOD2/CARD15³.
- L'expression d'hBD2 est stimulée par le BCG⁴, par *Campylobacter jejuni*⁵...

1- Kao et al. 2004, J. Immunol. 173 : 3482-3491.

2- Vora et al. 2004, J. Immunol. 173 : 5398-5405.

3- Voss et al. 2006, J. Biol. Chem. 281 : 2005-2011.

4- Mendez-Samperio et al. 2006, Cell Immunol. 239, 61-66.

5- Zilbauer et al. 2005, Infect. Immun. 73 : 7281-7289.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les cellules productrices

- Les cathélicidines sont beaucoup moins régulées par les TLR et/ou les cytokines.
- Les cathélicidines sont régulées positivement par l'acétylation des histones.
- Les cathélicidines sont régulées positivement par la vitamine D (1,25 D3).
- La di-hydroxy vitamine D3 est aussi capable de réguler positivement l'expression des TLRs.



boucle amplificatrice pour la production de peptides antimicrobiens.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Les cellules productrices

Dans les polynucléaires neutrophiles (PMN) humains :

- 4 α -défensines stockées dans les granules azurophiles qui iront fusionner avec le phagosome.
- 1 cathélicidine (LL-37) stockée dans des granules spécifiques secondaires et délivrée dans le milieu extracellulaire.

Le type et le nombre de peptides antimicrobiens dans les PMN de mammifères varie selon l'espèce.

La sécrétion des peptides antimicrobiens par les PMN et les cellules épithéliales peut être simultanément multiple (20 PAM identifiés dans la peau humaine).

Les peptides antimicrobiens sont pour la plupart produits sous forme de pro-peptides: maturation par clivage de la pro-région.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

La structure

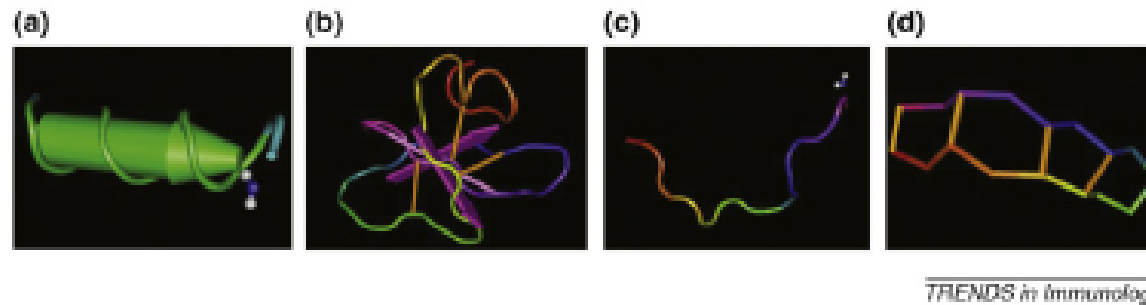


Figure 1. Structure of selected antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are present in a wide variety of structural conformations, such as peptides with α -helix structures, peptides with β -sheet structures stabilized by disulfide bridges or peptides with extended or loop structures. (a) α -helix. NMR-structure of the LL-37 core peptide of cathelicidin bound to detergent micelles (PDB ID: 2FBS). (b) β -sheet. Solution structure of the defensin hBD2 by two-dimensional proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (PDB ID: 1FOQ). (c) extended structure. NMR structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine (DPC) micelles (PDB ID: 1G88). (d) loop structure. 3D structure of a cyclic defensin from the leukocytes of rhesus macaques (PDB ID: 1HVZ). PDB ID: ID of peptide structure in Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). The style of LL37 in (a) is shown as secondary coloring shortcuts, whereas the styles of peptides in (b-d) are shown in rainbow coloring shortcuts.

Peptides très compacts, présentant une structure en hélice α (principalement cathélicidines et certaines α -défensines) ou en feuillet β (défensines), stabilisée par plusieurs ponts disulfure.

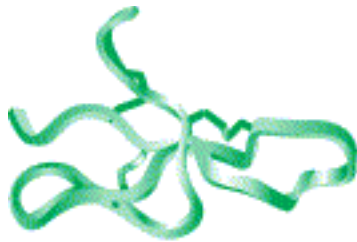
Les défensines θ , cycliques, ne sont présentes que chez les primates. 10

Immunité innée muqueuse

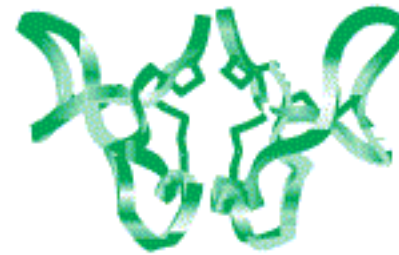
Les peptides antimicrobiens

La structure

Rabbit α -defensin



RK-1



Dimeric human α -defensin

HNP-3

Monomeric human β -defensin



hBD-1



Rhesus Macaque θ -defensin

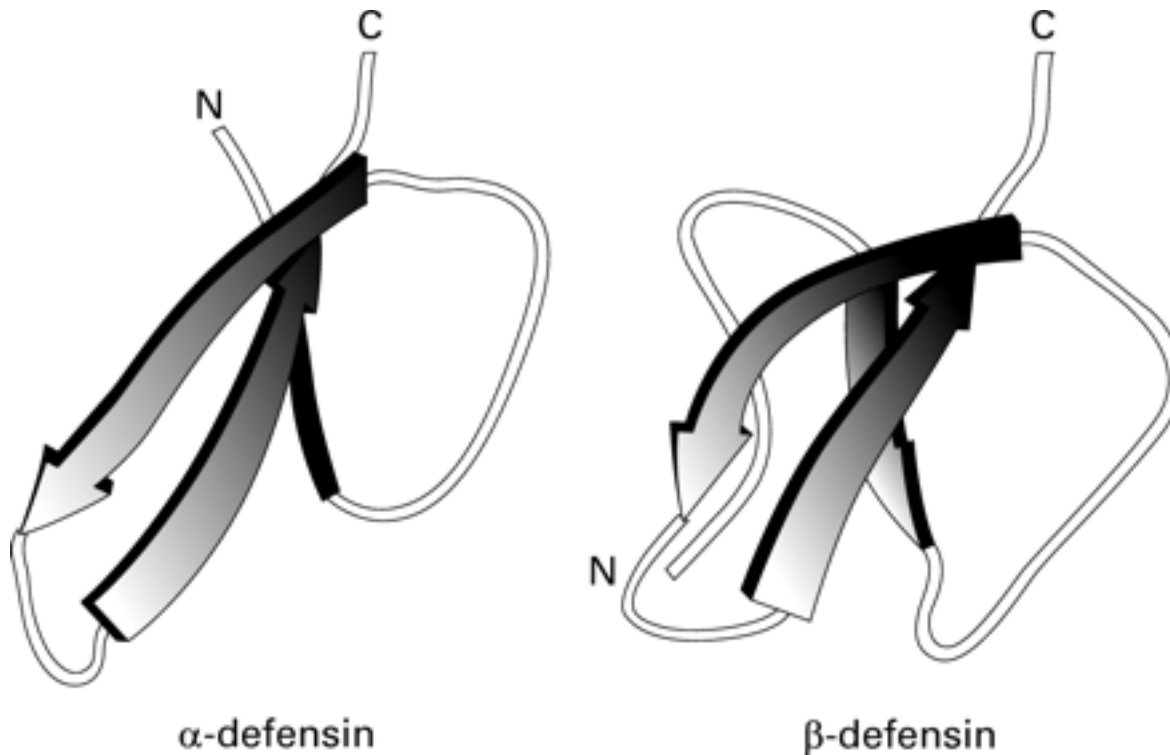
RTD-1

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

La structure

Feuillets beta caractéristiques des α et β défensines.



Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

La structure

Comparaison des sous-familles de défensines des vertébrés

	Structure	Taille (kDa)	Résidus	Appariements Cys	Source
α -Défensines	feuillet β	3,5-4	29-35	1-6, 2-4, 3-5	hum., lapin, rat souris
β -Défensines	feuillet β	4-6	38-42	1-5, 2-4, 3-6	hum., bov., poulet mouton, porc...
θ -Défensines	cyclique	2	18	1-4, 2-5, 3-6	singe

La connectivité des 6 résidus cystéine dans la séquence, pour former 3 ponts disulfure stabilisant la structure 3D : définit la sous-famille de défensine.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Homologies structurales liées à homologies de séquence

Les α défensines

Chez la souris il existe 20 isoformes d' α défensines nommées cryptdines.

La cystéine 1 est localisée côté N-terminal.

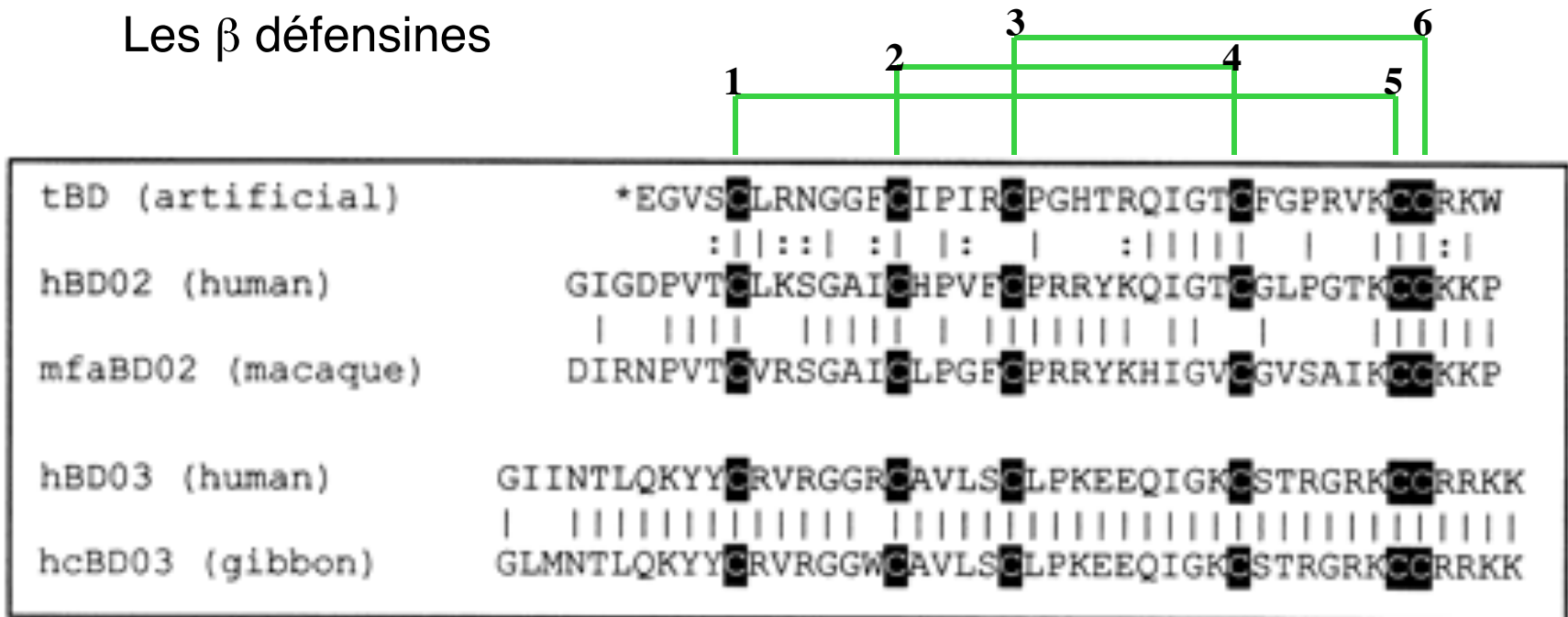
	1	2	3	4	5	6
Cryptdin-1	LRDLVCYCR	SRGCKGR	ERMNGT	CRKGHLL	YTLCCR	
Cryptdin-2	LRDLVCYCR	TRGCKRR	ERMNGT	CRKGHLM	YTLCCR	
Cryptdin-3	LRDLVCYCR	KRGCKRR	ERMNGT	CRKGHLM	YTLCCR	
Cryptdin-4	GLLCYCR	KGHCKRG	ERVGTC	--G-	IRFLYCC	PR
Cryptdin-5	LSKKLIC	YCRIRG	CKRRER	VFGTCR	NLFLT	FVFCSS
Cryptdin-6	LRDLVCYCR	RARGCKG	ERMNGT	CRKGHLL	YMLCCR	
Human HD-5	ATCYCRT	GRCATRE	SLSGVCE	ISGRLYR	LCCR	
Human HD-6	AFTCHCR	RS-CYS	TEYSYGT	CTVMGIN	HRCCL	
Rat RD-5	LRDLKCF	CRRKSC	NWGE	GIMGICK	KRYGSP	LCCR
HNP-1	ACYCRIP	ACIAGER	RYGTCI	IYIGRL	WAFCC	
HNP-4	VCSCRLV	FCRRE	TELRVGN	CLIGGV	SFTYC	CTRVD
RMAD-1	ACYCRIP	ACLAGER	RYGTCF	YLGRV	WAFCC	
RMAD-2	ACYCRIP	ACLAGER	RYGTCF	YMGRV	WAFCC	
RMAD-3	ACYCRIP	ACLAGER	RYGTCF	YRRRV	WAFCC	
RMAD-8	ACYCRIP	ACLAGER	RYGTCF	YLRRV	WAFCC	
RMAD-4/5	(R) RTCRC	RFGR	CFRRES	YSYSG	SCNING	RIFSLCCR
RMAD-6/7	(R) RTCRC	RFGR	CFRRES	YSYSG	SCNING	RISLCCR

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Homologies structurales liées à homologies de séquence

Les β défensines



Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Production de la forme active

Maturation par clivage de la prorégion pour libérer le peptide actif.

Chez la souris, les cryptdines sont maturées dans les granules des cellules de Paneth grâce à la MMP7 (matrix metalloprotease matrilysin).

proCrp1 :

```
20                        43 44           53 54   58 59  
DPIQNTDEETKTEEQPGEDDQAVS↓VSFGDPEGTS↓LQEES↓LRDLVCYCRSRGCKGRERMNGTCRKGHLLYLCCR
```

proHD5 :

```
20                        55 56           62 63  
ESLQERADEATTQKQSGEDNQLAISFAGNGLSALR↓TSGSQAR↓ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
```

Chez l'homme, la pro-forme de l'HD5 est sécrétée puis maturée dans la lumière intestinale (pas de MMP7 connue). La forme active peut aussi être sécrétée.*

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Large spectre d'activité antimicrobienne: bactéries, champignon, (protozoaires et virus)

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella typhimurium*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Listeria monocytogenes* ...

**Large spectre anti-bactérien:
Gram+ et Gram-**

Démonstration *in vivo*: souris KO pour les gènes des peptides antimicrobiens

- Souris Camp -/-: sensibles à *Streptococcus*, herpes simplex virus, *Escherichia coli* et vaccinia virus.
- Souris mBD1 -/-: sensibles à *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus*.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

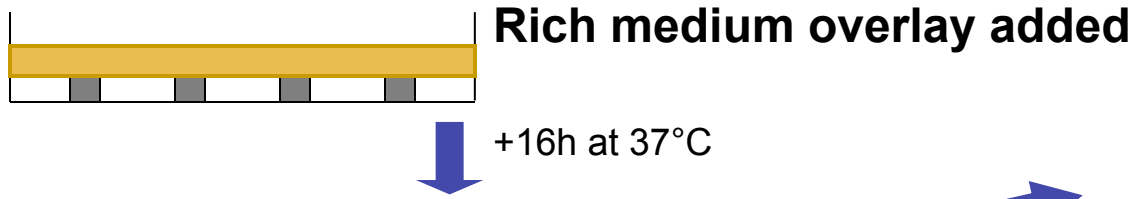
Mesure de l'activité anti-microbienne:
test de diffusion radiale en gélose

Activité biologique

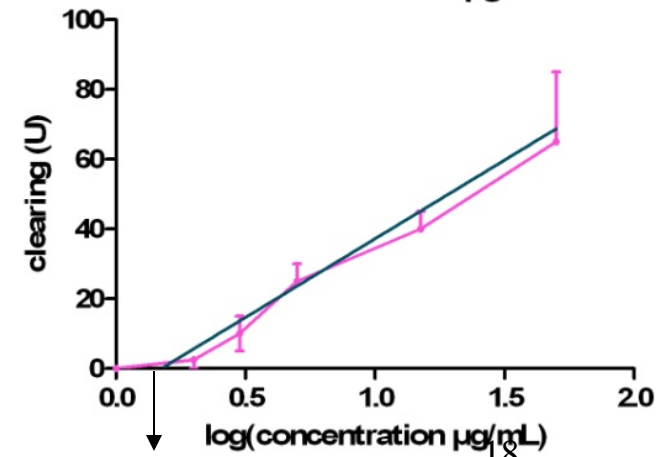
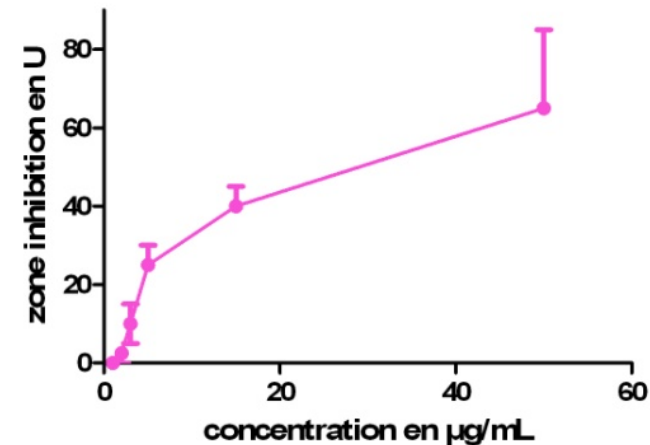
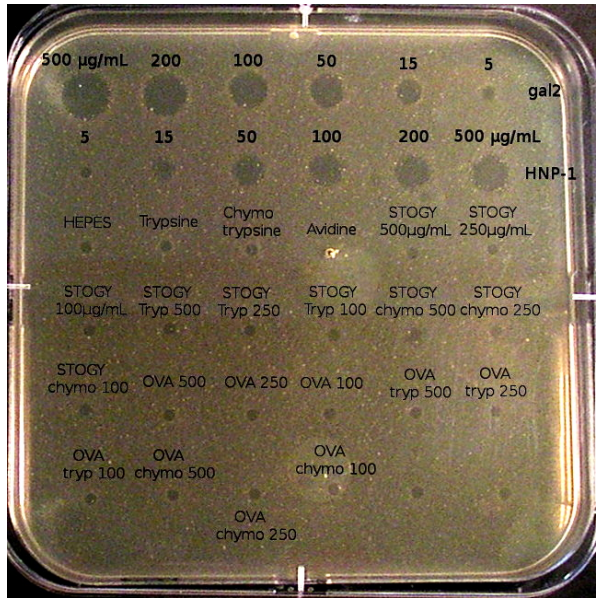
Bacteria added to LB 0.03% - type1 agarose underlay gel

Peptide loaded into each well

Peptide diffusion, 3h at 37°C



E. coli
ATCC
25922



Concentration Min. Inh.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Perturbation et rupture membranaire des pathogènes.

- Molécules cationiques -> affinité pour les charges négatives de surface des membranes bactériennes (plus que sur les cellules eucaryotes)
- Molécules amphipathiques (analogues aux détergents) -> désorganisation membranaire et rupture des gradients électrochimiques



Destruction par éclatement des micro-organismes à forte pression osmotique interne

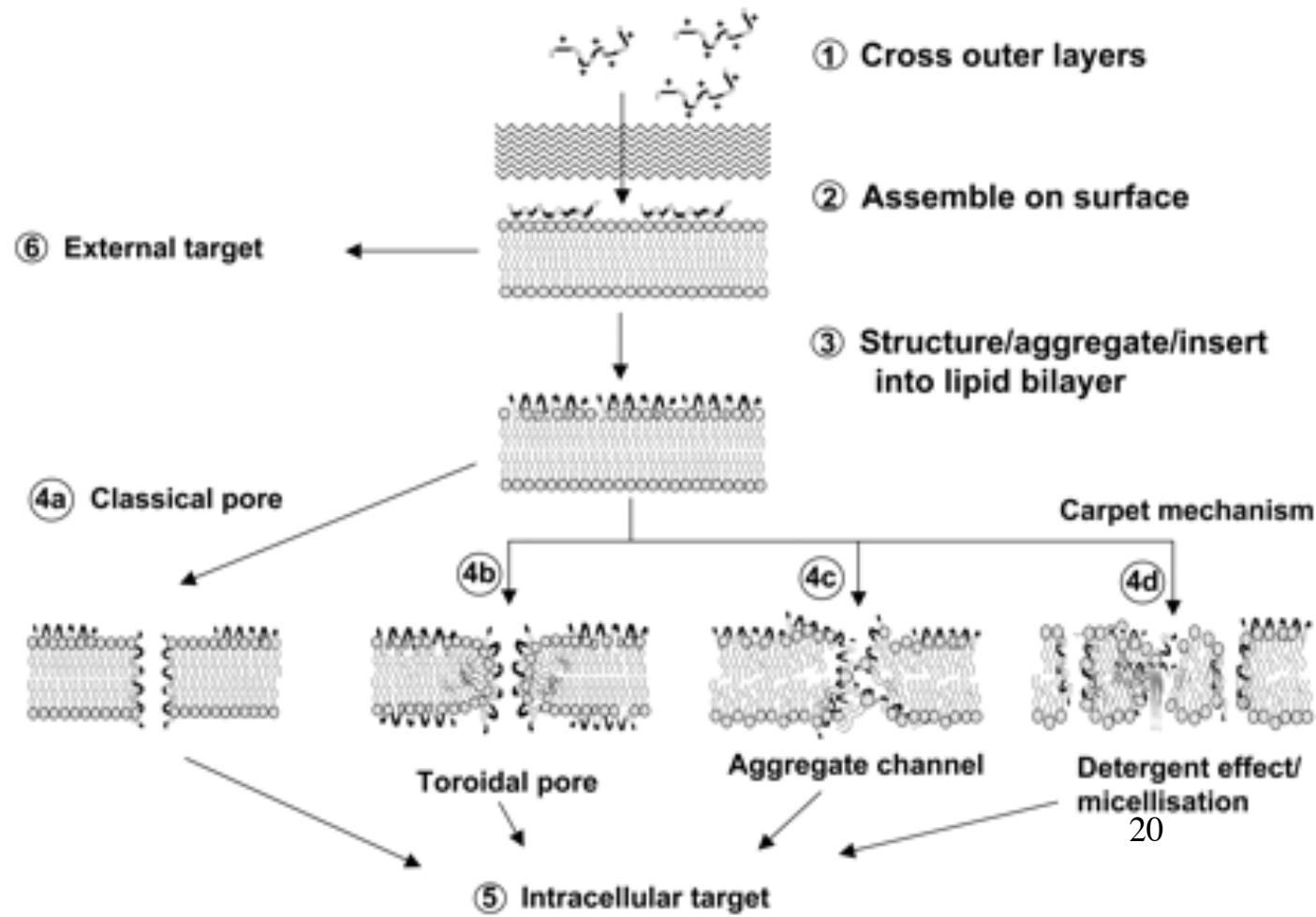
Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Perturbation membranaire : mécanismes d'action

Modèle de formation de pore par les peptides à hélice α .

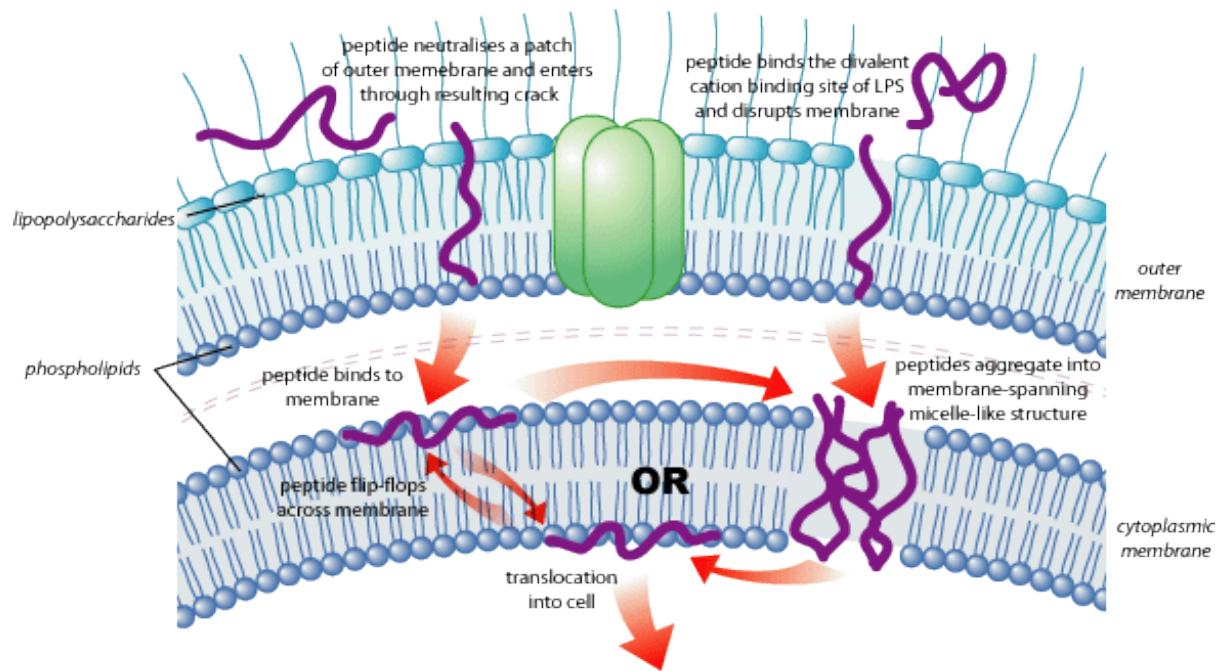


Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Perturbation membranaire : mécanismes d'action



Certains peptides peuvent pénétrer (CPP) et se lier à l'ADN pour détruire leur cellule cible.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Pas d'effet sur les cellules de l'hôte : hypothèses

- Moins de charges négatives à la surface des cellules eucaryotes (les phospholipides à tête polaire négative sont plutôt orientés dans le feuillet interne de la bicouche).
- Contenu en cholestérol des membranes eucaryotes, apparaît protecteur (rigidification de la bicouche lipidique, expérience de la sarcotoxin sur des liposomes).
- Rôle protecteur de protéines sériques, de la matrice extracellulaire.
- Les concentrations cytotoxiques pour les cellules eucaryotes sont très supérieures aux concentrations microbicides (MIC LL37 et β -defensines de l'ordre du μM aux sites muqueux, cytotox $>$ à $30\mu\text{M}$) . 22

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Résistance bactérienne aux peptides anti-microbiens

Réduction de la charge négative globale de la membrane bactérienne



limiter l' accès des peptides cationiques

- Modification du phosphatidyl glycerol avec la L-lysine (gène *mprF* de *S.aureus*).
- Alanylation de l' acide teichoïque et lipoteichoïque (opéron *dlt*).
- Acylation du lipide A du LPS (gènes *phoP-phoQ*, gène *pagP* de *S. Typhimurium*).

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Résistance bactérienne aux peptides anti-microbiens

Sécrétion de protéases dégradant les peptides anti-microbiens

- protéase de la membrane externe de *S. Typhimurium* (*pgtE*)
- protéases V8 et aureolysin de *S. aureus* (ciblant LL37)

Pompes d'efflux évacuant les peptides anti-microbiens

- gène *mtrCDE* de *Neisseria gonorrhoeae*
- gène *qacA* de *Staphylococcus aureus*

Moyens bactériens globalement très limités

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Une surprenante similarité structurale entre les défensines et les chimiokines

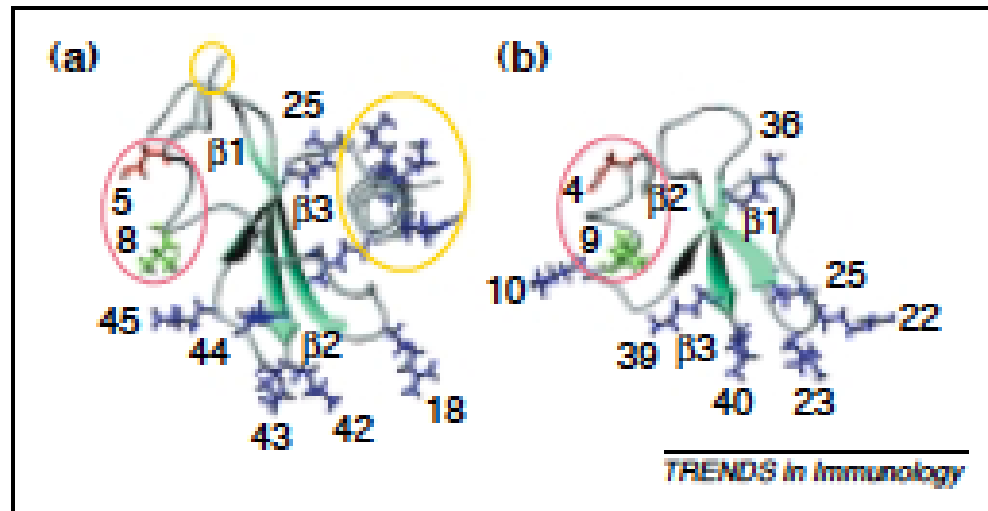


Fig. 1. Comparison of the tertiary structures of (a) murine macrophage inflammatory protein 3 α (MIP-3 α)/CCL20 and (b) human β -defensin-2

Activité similaire?



Découverte dans les années 2000:

Yang et al. 1999, Science, 286: 525-528.

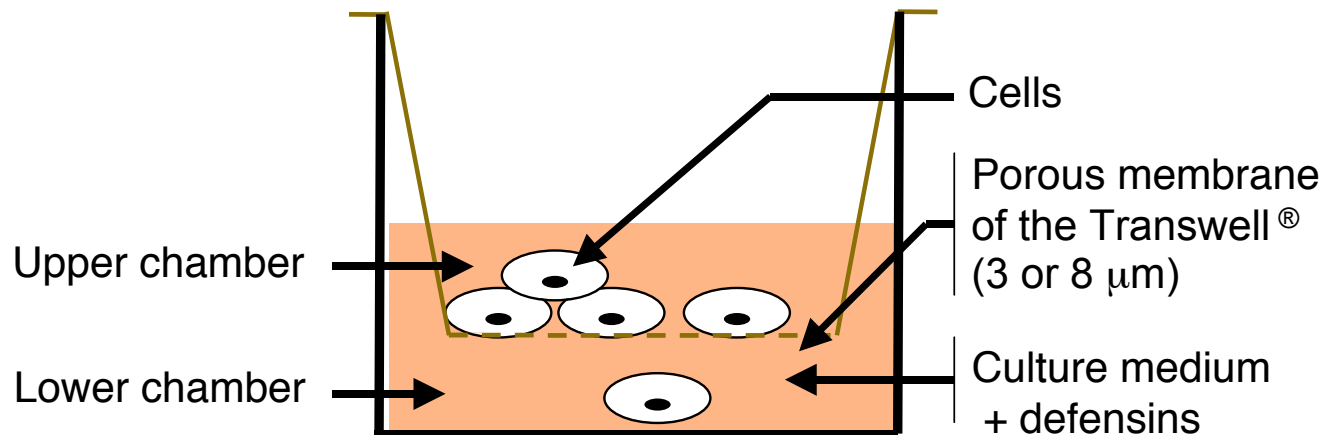
Yang et al. 2002, Trends in Immunology, 23: 291-296.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique

Mesure de l'activité chimiotactique: test de migration des cellules en système « Transwell® ».



Numération des cellules dans la chambre inférieure.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique : chimiotactisme, capacité de recrutement cellulaire

hBD2 et CCL20 ont une structure 3D similaire et partagent la même affinité pour le récepteur CCR6 → Recrutement des cellules dendritiques (DC) et des cellules T

HNP1 et HNP2 (α -défensines) → Recrutement des monocytes
hBD3 et hBD4 (β -défensines)

LL37 (cathélicidine) → Recrutement des neutrophiles (boucle amplificatrice)

Activité de type chimiokine : les défensines constituent un pont entre immunité innée et adaptative

Remarque: inversement, il a été montré que certaines chimiokines présentent une activité bactéricide directe, analogues aux peptides antimicrobiens.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique : Régulation de l'inflammation

Stimulation de la production de cytokines

CXCL8 (IL-8)		Chimiokines: afflux de phagocytes
CCL2 (MCP1)		
IFN α ...		Effecteurs antiviraux

hBD2, hBD3, hBD4 et cathélicidine induisent la production
d' IL-6 (inflam)
d' IL-10 (anti-inflam)

de MCP1 (CCL2)		Chimiokines: afflux de phagocytes, cellules présentatrices d' Ag, lymphocytes...
de MIP3 α (CCL20)		
de RANTES (CCL5)		
d' IL-18 (inducteur d' IFN γ , cytokine activatrice majeure des phagocytes)		

Effet adverse possible: Inhibition de la production de cytokines

Compétition avec ligands, perturbation de microdomaines membranaires à récepteur: cathélicidine.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique : Activation des cellules immunitaires

Stimulation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) sur les cellules présentatrice d'Ag

Toll-Like Receptor 4–Dependent Activation of Dendritic Cells by β -Defensin 2

Arya Biragyn,^{1*} Pier Adelchi Ruffini,^{1†} Cynthia A. Leifer,² Elena Klyushnenkova,³ Alexander Shakhov,³ Oleg Chertov,⁴ Aiko K. Shirakawa,⁵ Joshua M. Farber,⁵ David M. Segal,² Joost J. Oppenheim,⁶ Larry W. Kwak¹

SCIENCE VOL 298 1 NOVEMBER 2002

Human β -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2

Nicholas Funderburg*, Michael M. Lederman*, Zhimin Feng[†], Michael G. Drago[§], Julie Jadowsky*, Clifford V. Harding[§], Aaron Weinberg[†], and Scott F. Sieg^{†§}

PNAS, November 20, 2007, vol 104, No 47, 18631-18635

Immunité innée muqueuse

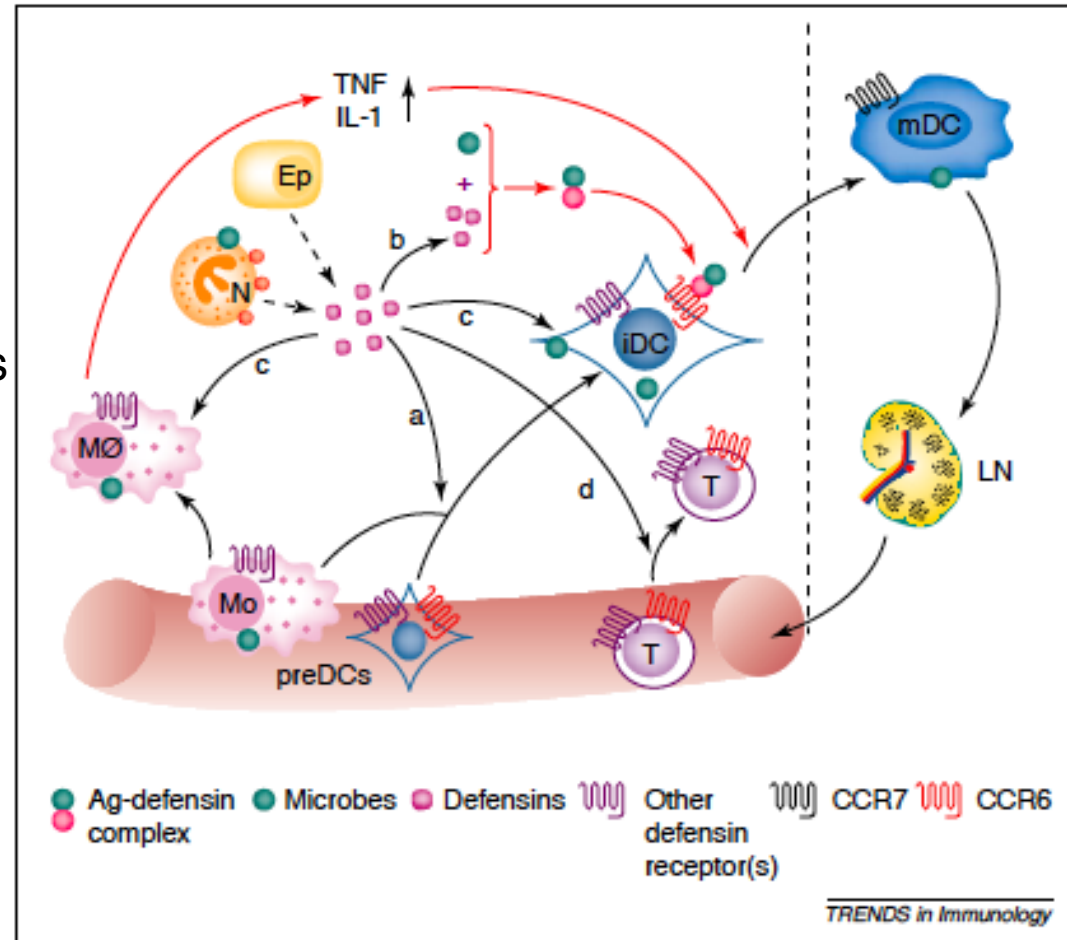
Les peptides antimicrobiens

Activité biologique:

Augmentation de l'immunité adaptative

Les défensines produites par les neutrophiles (N) et les cellules épithéliales (Ep) peuvent:

- a- recruter les précurseurs des cellules dendritiques (preDC).
- b- se lier au pathogènes pour faciliter leur captation par les cellules présentatrices d'Ag.
- c- stimuler la maturation des DC immatures (iDC) directement ou indirectement en induisant la production cytok. inflam. (TNF et IL-1).
- d- favoriser l'afflux de lymphocytes effecteurs (T) spécifiques primés dans les ganglions (LN).

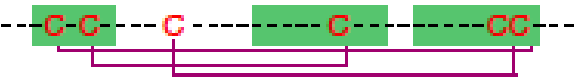




Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Activité biologique, selon les familles de défensines

Table 1. Classification, size, structure and activity of mammalian defensins

Mammalian defensins	Size ^a	Structure ^b	Activities related to host defense
α	29–35		Microbicidal activity, antiviral effect, chemotactic effect, activating macrophages, histamine release, cytokine induction, regulating C1 activation, corticostatic effect, immunoenhancing effect.
β	38–42		Microbicidal activity, chemotactic effect, activating mast cells, immunoenhancing effect.
θ	18		Microbicidal activity.

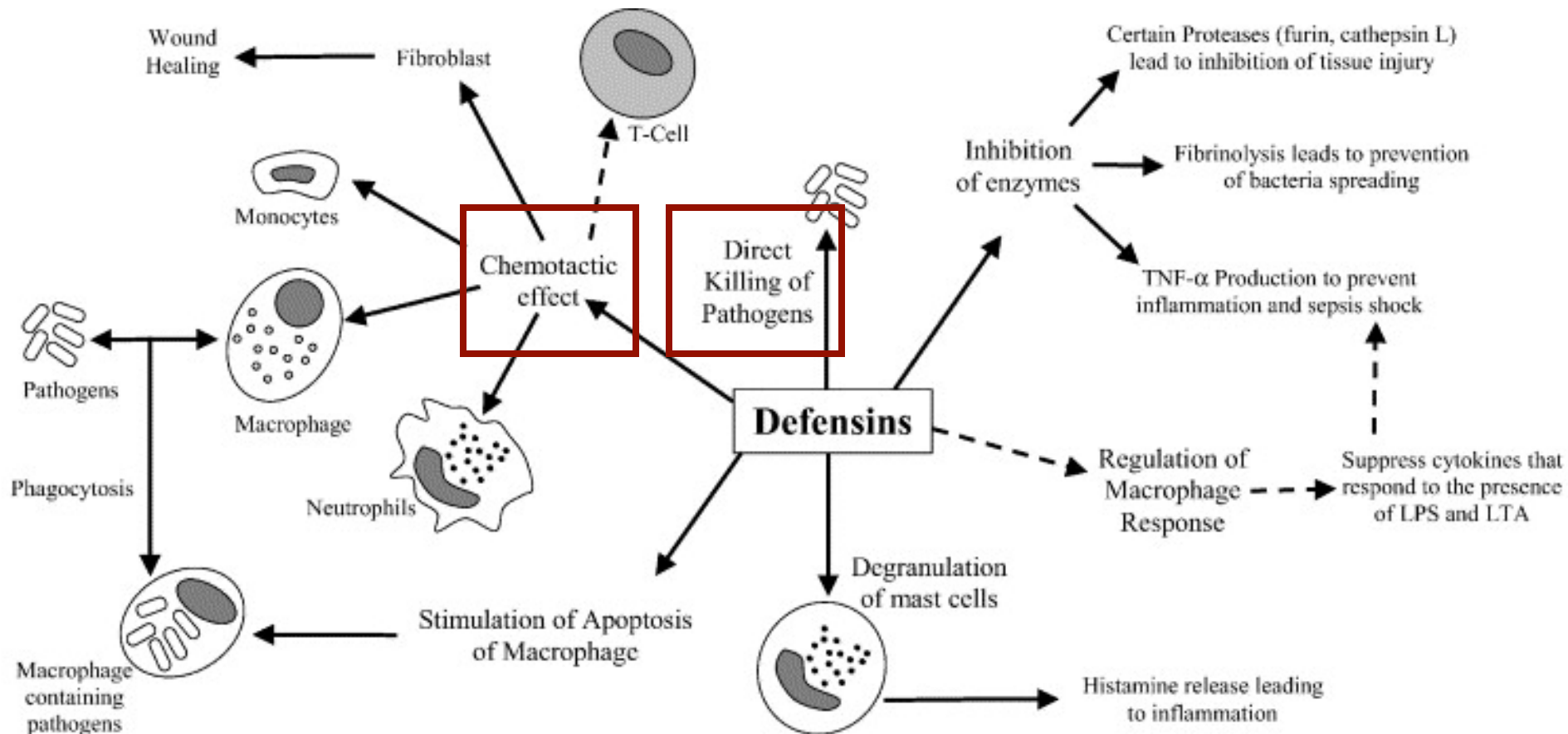
^aThe size given is the number of amino acid residues.

^bThe consensus of each defensin is illustrated by conserved cysteines (C) linked by a dashed line (one dash represents one residue). Disulfide bonds are illustrated by solid lines. Green and light blue highlight amino acid residues that form β -strands and α -helices, respectively.

Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

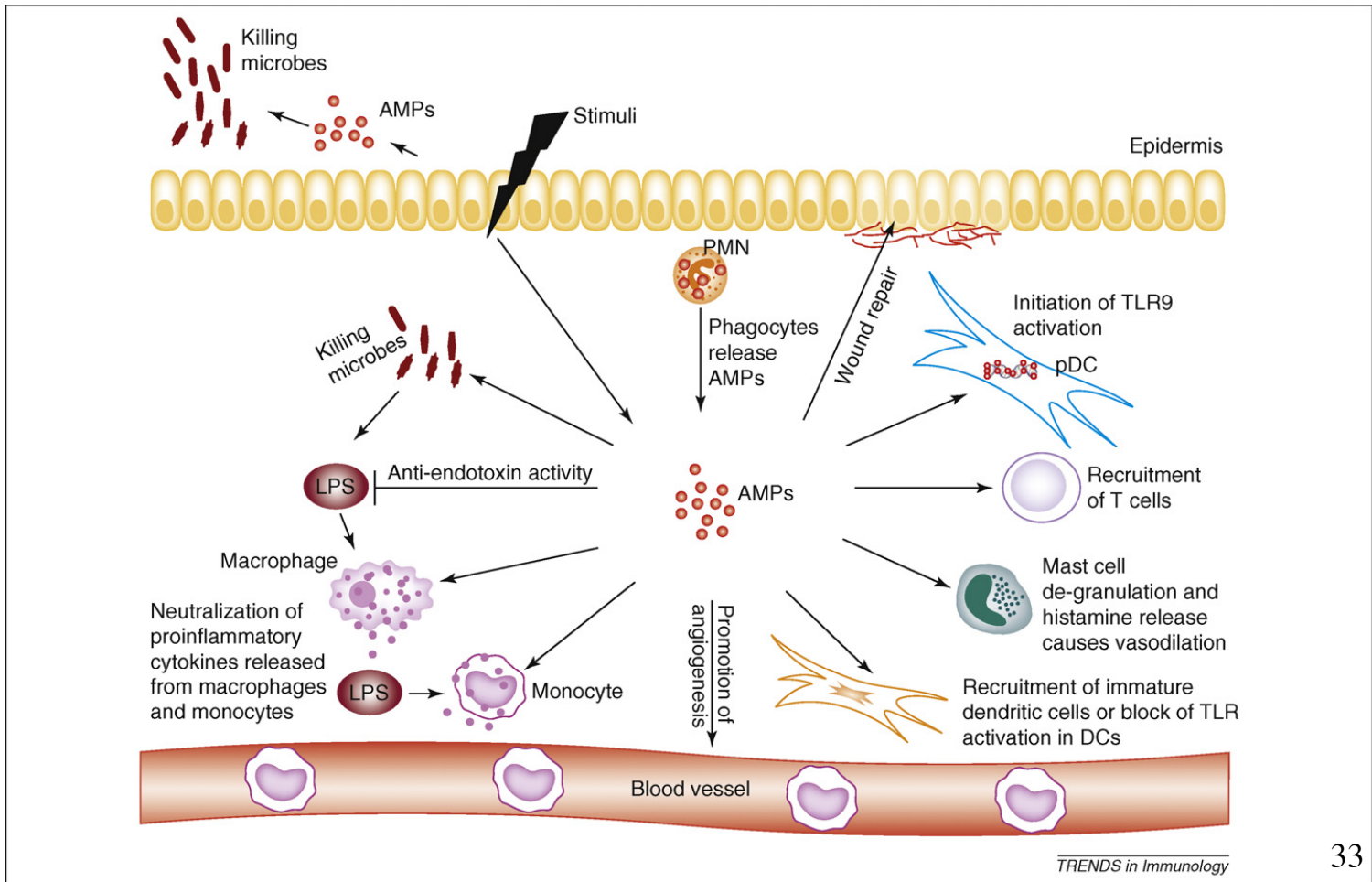
Activité biologique: résumé schématique



Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

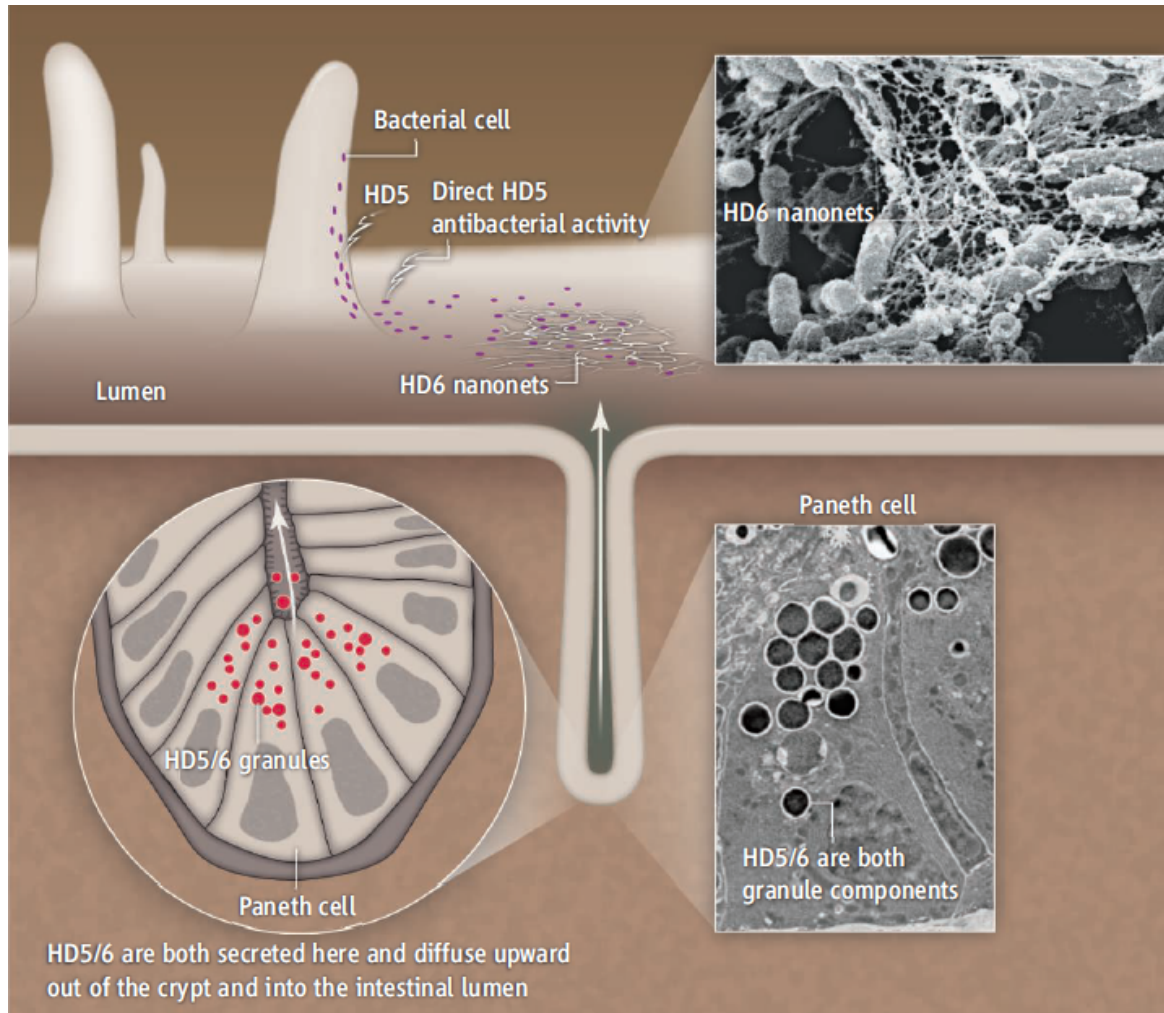
Activité biologique: résumé schématique



Immunité innée muqueuse

Les peptides antimicrobiens

Une nouvelle activité révélée en 2012: hD6 nanonets



Hiutung Chu et al.,
Human α -Defensin 6
Promotes Mucosal
Innate Immunity
Through Self-
Assembled Peptide
Nanonets.
Science 2012
Vol 337: 477.