

## Activité antibactérienne *in vitro* de l'hémolymphe de deux espèces de Coléoptère (*Oryctes owariensis* et *Rhynchophorus phoenicis*) immunisées par des souches bactériennes

### [ *In vitro* antibacterial activity of two Coleoptera species hemolymph (*Oryctes owariensis* and *Rhynchophorus phoenicis*) immunized with bacteria ]

Sansan KAMBOU, Adjoua Christiane Eunice BOKO, N'goran Parfait N'ZI, and Djédoux Maxime ANGAMAN

Département de Biochimie-Microbiologie, Laboratoire d'Agrovalorisation, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

Copyright © 2023 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** In insects, the hemolymph is the primary site of antimicrobial effectors produced in response to infection. In this study, the antibacterial activity of hemolymph extract from immunized larvae of *Oryctes owariensis* and *Rhynchophorus phoenicis* has been evaluated. The tests were carried out on *in vitro* growth of six bacterial strains including three clinical isolates (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp.) and three strains of food origin (*Escherichia coli* E1, *Staphylococcus aureus* S1 and S2 Meti-R). Activity of the different extracts was detected by diffusion method in a gel medium and quantified by macro-dilution technique in a liquid medium. Results showed that the different extracts demonstrate strong antibacterial activity and bactericidal power. Diameters of inhibition zones varied from 19.12±2.88 mm (*E. coli* ATCC 25922) to 22.58±2.18 mm (*S. aureus* S1) for the extract from *O. owariensis* infected larvae. This extract was more active on Gram positive bacteria with a MIC of 12.5 mg/mL and a MBC between 25 and 50 mg/mL. The extract from *R. phoenicis* infected larvae was very active on all strains with inhibition zone diameters between 26.22±0.69 mm (*B. subtilis*) and 35.30±2, 4 mm (*S. aureus* S1). MIC and MBC were respectively developed at the concentrations of 3.12 mg/mL and 6.25 mg/mL on all the bacterial strains. The sensitivity of bacterial strains to these hemolymph extracts reveals the probable presence of produced antimicrobial peptides.

**KEYWORDS:** Hemolymph extracts, *Oryctes owariensis*, *Rhynchophorus phoenicis*, bactericidal power, zone of inhibition.

**RESUME:** Chez les insectes, l'hémolymphe est le principal siège des effecteurs antimicrobiens produits en réponse à une infection. Dans cette étude, l'activité antibactérienne de l'extrait d'hémolymphe des larves immunisées de *Oryctes owariensis* et de *Rhynchophorus phoenicis* a été évaluée. Les tests ont été réalisés sur la croissance *in vitro* de six souches bactériennes dont trois isolats cliniques (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp.) et trois souches d'origine alimentaire (*Escherichia coli* E1, *Staphylococcus aureus* S1 et S2 Méti-R). L'activité des différents extraits a été détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé et quantifiée par la technique de macro-dilution en milieu liquide. Les résultats ont montré que les différents extraits possèdent une forte activité antibactérienne et un pouvoir bactéricide. Les diamètres des zones d'inhibition variaient de 19,12±2,88 mm (*E. coli* ATCC 25922) à 22,58±2,18 mm (*S. aureus* S1) pour l'extrait des larves de *O. owariensis* infectées. Cet extrait a été plus actif sur les bactéries Gram positif avec une CMI de 12,5 mg/mL et une CMB comprise entre 25 et 50 mg/mL. L'extrait des larves de *R. phoenicis* infectées s'est montré très actif sur toutes les souches avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 26,22±0,69 mm (*B. subtilis*) et 35,30±2,4 mm (*S. aureus* S1). La CMI et la CMB ont été respectivement atteintes aux concentrations de 3,12 mg/mL et 6,25 mg/mL sur toutes les souches bactériennes. La sensibilité des souches bactériennes à ces extraits d'hémolymphe révèle la présence probable de peptides antimicrobiens produits.

**MOTS-CLEFS:** Extraits d'hémolymphe, *Oryctes owariensis*, *Rhynchophorus phoenicis*, pouvoir bactéricide, zone d'inhibition.

## 1 INTRODUCTION

Les insectes sont apparus à l'ère primaire, il y a environ 420 millions d'années et ont atteint aujourd'hui un nombre impressionnant. En réalité, ils sont le groupe de métazoaires le plus important de tous les écosystèmes terrestres avec actuellement près de 1,3 million d'espèces décrites soit 55 % de la biodiversité des espèces et 85 % de la biodiversité animale [1]. Ces animaux sont dotés d'un système de défense remarquable qui leur permet de résister aux bio-agresseurs [2]. A l'instar de tous les arthropodes, ils ne possèdent seulement qu'une immunité innée mais basée sur un système de défense complexe, qui met en jeu des réactions cellulaires et humorales coordonnées. En effet, la cuticule constitue la première barrière physique contre les invasions de micro-organismes et les parasites potentiellement pathogènes présents dans le milieu aquatique ou terrestre [3]. Cependant, suite à une blessure ou lors de la mue, cette barrière n'est plus étanche et les micro-organismes envahissants entrent directement dans la circulation générale puisque le système circulatoire des arthropodes est ouvert [4]. Cela déclenche des réactions cellulaires impliquant directement les constituants de l'hémolymphe [5]. L'activation de ces derniers provoque deux types de réponses liées. L'une relève d'une cascade de réactions purement cellulaires à savoir la phagocytose, la formation de nodules et l'encapsulation des micro-organismes pathogènes ou des corps étrangers [6]. L'autre se manifeste par une libération dans le plasma de molécules intervenant dans différentes réactions immunitaires telles que la mélanisation et la coagulation localisée [7]. Parallèlement, un second mécanisme s'installe et aboutit à la synthèse des peptides antimicrobiens par le corps gras [8]. Après synthèse, ces composés sont libérés dans l'hémolymphe des insectes où ils participent à sa défense contre les agents pathogènes notamment les bactéries, champignons, virus et parasites [9]. Ce sont donc des antibiotiques naturels qui détruisent rapidement les membranes bactériennes et fongiques par une action de type détergente, un mécanisme d'action qui réduit le risque d'apparition du phénomène de résistance chez les microorganismes [2]. Or, des efforts sont présentement déployés pour explorer de nouvelles voies de lutte contre la propagation des maladies infectieuses et la résistance aux antimicrobiens en dehors du paradigme des antibiotiques [10]. Par conséquent, le recours à ces peptides antimicrobiens des insectes s'avère une solution prometteuse. S'inscrivant dans cette logique, cette étude vise à évaluer les propriétés antibactériennes de l'hémolymphe des larves de deux espèces de coléoptères (*Oryctes owariensis* et *Rhynchophorus phoenicis*) immunisées par des bactéries.

## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 MATÉRIEL

#### 2.1.1 ESPÈCES D'INSECTE ÉTUDIÉES

Cette étude a été réalisée sur les larves (cinquième stade) de deux espèces de coléoptères de l'entomofaune ivoirienne à savoir *Oryctes owariensis* et *Rhynchophorus phoenicis* (Fig. 1). Les larves ont été collectées dans la région du Haut Sassandra (Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire) dans les tiges de palmier en décomposition.



*Larves de Oryctes owariensis*



*Larves de Rhynchophorus phoenicis*

**Fig. 1.** Photos des différentes larves étudiées

#### 2.1.2 SOUCHES BACTÉRIENNES

Le tableau 1 ci-dessous présente le matériel bactérien utilisé dans le cadre de cette étude. Les travaux ont été réalisés sur six (06) souches bactériennes dont trois (03) isolats cliniques (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* 1A786 et *Salmonella* spp. A517) et trois (03) souches provenant des salades de quatrième gamme (*Escherichia coli* E1, *Staphylococcus aureus* S1 et *Staphylococcus aureus* S2). Les souches de *staphylococcus aureus* (S1 et S2) sont multi-résistantes à la Méricilline.

Tableau 1. Souches bactériennes étudiées

Espèce bactérienne	Source	Profil
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Clinique	Sauvage
<i>Bacillus subtilis</i> 1A786	Clinique	Sauvage
<i>Salmonella</i> ssp.	Clinique	Sauvage
<i>Escherichia coli</i> E1	Salade de carotte	Sauvage
<i>Staphylococcus aureus</i> S1	Salade de carotte	Méti-R*
<i>Staphylococcus aureus</i> S2	Salade Méli-Melo	Méti-R

\*Méti-R: multi-résistantes à la pénicilline

## 2.2 MÉTHODES

### 2.2.1 IMMUNISATION DES LARVES

Deux types de bactéries ont été utilisés pour l'immunisation des larves selon la méthode [11]. Il s'agit de *Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Staphylococcus aureus* S1. Pour ce faire, les bactéries ont été cultivées sur le milieu gélosé Mueller Hinton pendant 16 h à 37 °C. Ensuite, une colonie de la culture bactérienne a été prélevée et déchargée dans 10 mL de Bouillon Mueller Hinton (BMH) et incubé sous agitation (600 rpm) à 37 °C pendant 24 h. Cent microlitres de cette pré-culture a été de nouveau ensemencés dans 10 mL de BMH et incubé pendant 3h sous agitation (600 rpm). Cette culture a été centrifugée pendant 5 minutes à 13000 rpm/min et le culot bactérien est récupéré. Avant l'injection, le culot est lavé dans du tampon PBS afin de limiter les agrégats bactériens puis centrifugé (5 min à 13000 rpm/min). L'inoculum a été dilué dans le tampon PBS à une concentration finale de  $10^3$  UFC/mL. Les larves du cinquième stade ont été immunisés avec 5  $\mu$ L du mélange de l'inoculum bactérien (1: 1, v: v) à l'aide d'une aiguille fine (diamètre 0,35 mm, longueur 40 mm) par ponction abdominale. Les animaux ont été mis séparément dans des boîtes de Pétri stérile et conservé sous une hotte ventilée pendant 24 heures.

### 2.2.2 COLLECTE DE L'HÉMOLYMPHE

Pour le prélèvement de l'hémolymphe les larves ont été soigneusement lavées à l'eau du robinet pour éliminer les débris alimentaires, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 0,5 % (dans l'eau du robinet, v/v) et de l'éthanol à 70 % (dans de l'eau distillée, v/v). Ensuite, elles ont été anesthésiées sur de la glace, et percées entre le dernier et l'avant-dernier métamère avec une aiguille stérile. L'hémolymphe a été recueilli dans des tubes eppendorfs stériles en présence du dithiothréitol (DTT) comme inhibiteur de protéases. Chaque expérience a été réalisée en regroupant des échantillons d'hémolymphe prélevés sur 25 larves et conservés à -80 °C. L'hémolymphe des larves non infectées ont été considérés comme témoins pour toutes les expériences réalisées.

### 2.2.3 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

La méthode utilisée pour étudier l'activité antibactérienne des différents extraits d'hémolymphe est inspirée de l'antibiogramme classique employée en bactériologie [12]. L'activité antibactérienne des différents extraits d'hémolymphe a été évaluée qualitativement par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé et quantitativement par la technique de dilution en milieu liquide suivie d'un ensemencement par stries sur gélose.

#### 2.2.3.1 DÉTECTION D'ACTIVITÉ PAR DIFFUSION SUR UN MILIEU GÉLOSÉ

Cette technique permet de détecter la présence d'inhibition de croissance bactérienne par diffusion de composés antimicrobiens sur un milieu gélosé [13]. Les tests ont été réalisés sur les six (06) souches bactériennes présentées dans le tableau 1. Environ 20 mL du milieu gélosé Mueller Hinton sont coulés dans une boîte de Pétri (90 mm de diamètre). Après solidification, le milieu est ensemencé avec un inoculum bactérien d'opacité équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO de 0,08 à 0,1 lue au spectrophotomètre ( $\lambda = 625$  nm). Ensuite, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés par aspiration à vide à l'aide d'une pipette pasteur en verre stérile. Dans chaque puits est déposé 50  $\mu$ L des différents extraits d'hémolymphe à tester à une concentration de 100 mg/mL préparé dans un mélange de tween/eau (1: 10). L'incubation des boîtes s'est faite pendant 24 h à 37 °C. Un témoin constitué uniquement du mélange tween/eau (1: 10) a été réalisé en parallèle pour s'assurer de la non toxicité de l'émulsifiant (tween 20). L'inhibition de la croissance est détectée par la présence d'un halo d'inhibition autour des

puits contenant les échantillons à tester. L'importance de l'inhibition est évaluée par mesure de la taille du halo d'inhibition (diamètre d'inhibition) à l'aide du logiciel ImageJ.exe. Les hémolymphes des larves infectées ont été retenus pour la détermination des paramètres bactériens (CMI et CMB).

### 2.2.3.2 DÉTERMINATION DE LA CMI ET DE LA CMB

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée par la technique de dilution en milieu liquide selon [14]. A partir de la concentration mère (100 mg/mL), une gamme de concentrations décroissantes par dilutions successives de raison 2 a été effectuée pour obtenir huit (08) différentes concentrations (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78). Ensuite, un inoculum bactérien à la concentration  $10^5$  UFC/mL a été préparé à partir d'une colonie jeune de 24 h dans le bouillon Mueller Hinton. Un millilitre (1 mL) de l'inoculum bactérien est mis en contact avec 1 mL de chaque concentration dans des tubes à hémolyse. Les tubes ont été incubés pendant 24 h à 37 °C. La concentration du premier tube ne présentant ni trouble ni culot bactérien a été considéré comme la CMI.

Après lecture de la CMI, la gélose Mueller Hinton a été coulée dans des boîtes de Pétri et ensemencée en stries par 100  $\mu$ L des contenus des tubes ayant une concentration  $\geq$  CMI dans la série de dilution précédente. Dans les mêmes conditions, des dilutions décimales de l'inoculum de départ ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) ont été effectuées et ensemencées. La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est déterminée après une incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h. C'est la plus petite concentration qui inhibe totalement la croissance. L'effet antibactérien sera jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport CMB/CMI.

### 2.2.4 ANALYSES STATISTIQUES

Les données brutes recueillies ont été reportées sur une base de données « Excel, 2013 » puis traitées et analysées statistiquement à l'aide du logiciel R (R  $\times$ 64 4.1.2). L'analyse des variances (ANOVA à un facteur) et le test de Tukey ont été utilisés pour comparer les diamètres des zones d'inhibition obtenues. Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type. Les valeurs de probabilité  $P < 0,05$  ont été considérées statistiquement significatives.

## 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 RÉSULTATS

#### 3.1.1 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES DIFFÉRENTS EXTRAITS D'HÉMOLYMPHE EN MILIEU SOLIDE

De grandes zones d'inhibition ont été observées sur toutes les boîtes après incubation. Les diamètres de ces zones d'inhibition sont consignés dans le tableau 2. Pour l'espèce *O. owariensis*, les valeurs varient de  $19,12 \pm 2,88$  mm (*E. coli* ATCC 25922) à  $22,58 \pm 2,18$  mm (*S. aureus* S1) avec l'hémolymphes des larves infectées et de  $18,23 \pm 1,20$  mm (*E. coli* ATCC 25922) à  $21,69 \pm 2,88$  mm (*S. aureus* S1) pour celui des larves témoins. Aucune différence significative n'a été observée entre les diamètres induits par chacun des deux extraits d'hémolymphes sur les souches et entre les diamètres induits par les deux extraits sur une souche bactérienne donnée.

Au niveau de *R. phoenicis*, une différence significative est observée entre les diamètres d'inhibition provoqués par l'hémolymphes des larves infectées et ceux induits par l'hémolymphes des larves témoins. Les zones d'inhibition sont plus importantes avec l'hémolymphes des larves infectées. Elles varient de  $26,22 \pm 0,69$  mm (*Bacillus subtilis*) à  $35,30 \pm 2,4$  mm (*S. aureus* S1) contre  $15,84 \pm 0,61$  mm (*Bacillus subtilis*) à  $22,46 \pm 3,11$  mm (*Salmonella* ssp.) pour celui des larves témoins.

Tableau 2. Diamètres d'inhibition induits par les différents extraits d'hémolymphes sur les souches bactériennes

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	O <sub>i</sub>	O <sub>T</sub>	Rh <sub>i</sub>	Rh <sub>T</sub>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19.12 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	18.23 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>	32.03 $\pm$ 2.06 <sup>b</sup>	18.74 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> 1A786	20.48 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>	19.45 $\pm$ 2.38 <sup>a</sup>	26.22 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	15.84 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> ssp A517	22.55 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	21.21 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	34.35 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	22.46 $\pm$ 3.11 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> (E1)	21.82 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	19.12 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	34.03 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup>	20.58 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> (S1)	22.58 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	21.69 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	35.30 $\pm$ 2.42 <sup>b</sup>	21.19 $\pm$ 2.63 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> (S2)	21.52 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	19.43 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup>	27.73 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	18.02 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>

**Oi:** extrait d'hémolymphe des larves de *Oryctes owariensis* infectées

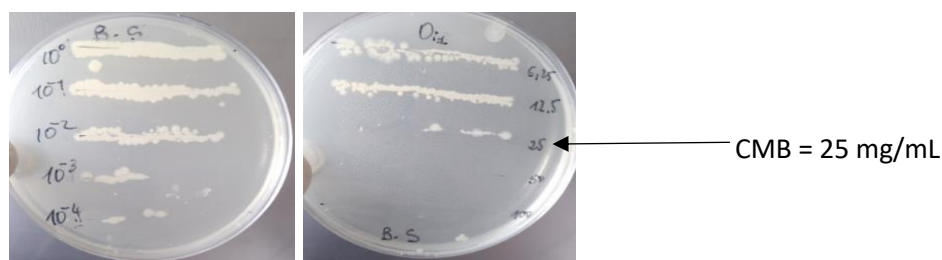
**O<sub>r</sub>:** extrait d'hémolymphe des larves de *Oryctes owariensis* non infectée (témoin)

**Rhi:** extrait d'hémolymphe des larves de *Rhynchophorus phoenicis* infectées

**Rh<sub>r</sub>:** extrait d'hémolymphe des larves de *Rhynchophorus phoenicis* non infectées (témoin)

### 3.1.2 CMI ET CMB DE L'EXTRAIT D'HÉMOLYMPHE DES LARVES DE O. OWARIENSIS INFECTÉES

Les valeurs des paramètres bactériens de l'extrait d'hémolymphe des larves de *O. owariensis* infectées sont consignées dans le tableau 3. La CMI a été atteinte à la concentration de 12,5 mg/mL pour les bactéries Gram positif (*Bacillus subtilis* 1A786, *S. aureus* S1 et *S. aureus* S2) et à 50 mg/mL pour les Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* E1 et *Salmonella* ssp. A517). Les différentes valeurs de CMB obtenues sont: 25 mg/mL pour *Bacillus subtilis* 1A786 (Fig. 2) et *S. aureus* S2, 50 mg/mL pour *S. aureus* S1 et 100 mg/mL pour les bactéries Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* E1 et *Salmonella* ssp. A517). Toutefois, le rapport CMB/CMI calculé montre que cet extrait d'hémolymphe a un pouvoir bactéricide sur toutes les bactéries testées.



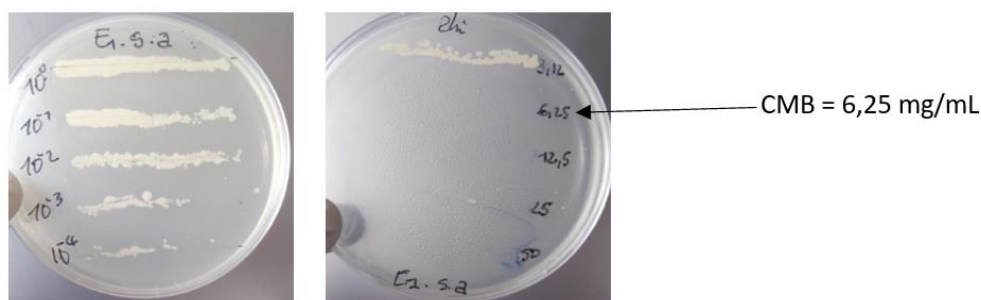
**Fig. 2.** Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait d'hémolymphe des larves de *O. owariensis* infectées sur *Bacillus subtilis* 1A786. La fig.2 montre le résultat de la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait d'hémolymphe des larves de *O. owariensis* infectées sur *Bacillus subtilis* 1A786. En se référant au témoin de batéricidie (présenté à gauche sur la fig. 2), la concentration ayant moins de 0,01 % de bactéries viables (CMB) par rapport à l'inoculum de départ est 25 mg/mL

**Tableau 3.** Paramètres bactériens de l'extrait de l'hémolymphe des larves de *Oryctes owariensis* infectées sur les souches bactériennes étudiées

	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI/CMB	Pouvoir
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	100	2	Bactéricide
<i>Bacillus subtilis</i> 1A786	12,5	25	2	Bactéricide
<i>Salmonella</i> ssp. A517	50	100	2	Bactéricide
<i>E. coli</i> (E1)	50	100	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> (S1)	12,5	50	4	Bactéricide
<i>S. aureus</i> (S2)	12,5	25	2	Bactéricide

### 3.1.3 CMI ET CMB DE L'EXTRAIT D'HÉMOLYMPHE DES LARVES DE R. PHOENICIS INFECTÉES

Les différentes souches bactériennes étudiées ont présenté une grande sensibilité vis-à-vis de l'extrait d'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* infectées (Tableau 4). La CMI et la CMB ont été respectivement atteintes aux concentrations de 3,12 mg/mL et 6,25 mg/mL sur toutes les souches bactériennes comme indiqué sur la fig. 3. Le rapport CMB/CMI est égal à 2 pour toutes les souches, ce qui indique un pouvoir bactéricide de l'extrait sur chacune des bactéries étudiées.



**Fig. 3.** Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait d'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* infectées sur *Staphylococcus aureus* S1, Méti-R. La fig. 3 montre le résultat de la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait d'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* infectées sur *Staphylococcus aureus* S1, Méti-R. En se référant au témoin de bactéricidie (présenté à gauche sur la fig. 3), la concentration ayant moins de 0,01 % de bactéries viables (CMB) par rapport à l'inoculum de départ est 6,25 mg/mL

**Tableau 4.** Paramètres bactériens de l'extrait de l'hémolymphe des larves de *Rhynchophorus phoenicis* infectées sur les souches bactériennes étudiées

	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI/CMB	Pouvoir
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,12	6,25	2	Bactéricide
<i>Bacillus subtilis</i> 1A786	3,12	6,25	2	Bactéricide
<i>Salmonella ssp</i> A517	3,12	6,25	2	Bactéricide
<i>E. coli</i> (E1)	3,12	6,25	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> (S1)	3,12	6,25	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> (S2)	3,12	6,25	2	Bactéricide

### 3.2 DISCUSSION

L'activité antibactérienne des extraits d'hémolymphe des deux espèces de coléoptères a été évaluée sur la croissance *in vitro* de six (6) souches bactériennes dont trois souches cliniques de référence, deux souches multi résistantes et une souche sensible. La croissance de ces souches bactériennes a été inhibée par les différents hémolymphe testés avec des diamètres de zones d'inhibition relativement grands. Ceux obtenus avec l'hémolymphe des larves de *O. owariensis* infectées variaient de  $19,12 \pm 2,88$  mm (*E. coli* ATCC 25922) à  $22,58 \pm 2,18$  mm (*S. aureus* S1) et sont statistiquement identiques à celui des larves témoins. Pour l'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* infectées, les diamètres variaient entre  $26,22 \pm 0,69$  mm (*Bacillus subtilis*) et  $35,30 \pm 2,4$  mm (*S. aureus* S1) contre  $15,84 \pm 0,61$  mm (*Bacillus subtilis*) et  $22,46 \pm 3,11$  mm (*Salmonella ssp.*) pour celui des larves témoins. Ces résultats montrent que les différents extraits d'hémolymphe testés possèdent une forte activité antibactérienne confirmant ainsi une présence probable de peptides antimicrobiens qui seraient produit en réponse à l'infection expérimentale comme rapporté par plusieurs chercheurs ([8], [15], [16], [11]). Par contre, la présence de composés antimicrobiens dans l'hémolymphe des larves naïves (témoins) pourrait être le résultat d'une infestation naturelle avant l'expérimentation. En effet, ces espèces vivent dans des conditions hygiéniques médiocres où elles sont naturellement exposées à l'attaque de nombreuses bactéries pathogènes présentes dans l'environnement. Ceci pourrait provoquer leur amorçage immunitaire aboutissant à la synthèse de ces composés antibactériens ([17], [18]).

L'activité antibactérienne des hémolymphe des larves infectées a été quantifiée à travers la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ainsi que le ratio CMB/CMI. Au niveau de l'espèce *O. owariensis*, les plus petites valeurs de CMI et de CMB ont été obtenues sur les bactéries Gram positif (*Bacillus subtilis*, *S. aureus* S1 et *S. aureus* S2) à la concentration de 12,5 mg/mL pour la CMI et de 25 mg/mL pour la CMB. Cette sensibilité des bactéries Gram positif aux extraits de substances naturelles a été rapportée par plusieurs chercheurs ([19], [20]). En effet, la paroi des bactéries Gram positif est dépourvue de membrane externe et semble être sensible aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels [21]. Aussi, l'activité de cette hémolymphe pourrait être due à l'action de certains peptides antimicrobiens des insectes notamment les défensines qui sont plus actifs sur les bactéries Gram positif ([22], [23]). Les composés antimicrobiens produits par les insectes sont de natures diverses, ils peuvent être spécifiques à un groupe de microorganismes ou avoir une action dirigée contre une large gamme de pathogène, ce qui pourrait être le cas avec l'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* infectées dont la CMI et la CMB ont été

respectivement atteintes à 3,12 mg/mL et 6,25 mg/mL sur toutes les souches bactériennes. L'activité de ce dernier sur les deux types de bactérie (Gram+ et Gram-) pourrait être le résultat d'une action combinée de plusieurs peptides sécrétés lors de l'infection ou d'un groupe de peptides ayant un spectre d'activité large. Des études ont rapporté que certains peptides antimicrobiens des insectes tels que les cécropines pouvaient être bactéricides aussi bien sur des germes à Gram positif que négatif ([24], [25]).

Toutes les souches bactériennes étudiées, qu'elles soient de Gram positif ou négatif, de phénotype sauvage ou résistant ont présenté une sensibilité vis-à-vis des différentes hémolymphe. Ces espèces bactériennes sont responsables de plusieurs types de maladies chez les humains pouvant aller jusqu'aux infections graves et mortelles tels que les septicémies, les infections du tube digestif et des voies urinaires, les fièvres brutales, les méningites et même les atteintes pulmonaires ([26], [27]). De plus, elles font partie des bactéries qui possèdent les mécanismes de résistance les plus redoutés en ce 21<sup>ème</sup> siècle ([28], [29]). En effet, les souches de *Staphylococcus aureus* multi-résistantes à la Mécilline (SARM), de *E. coli* et de salmonelle multi-résistantes aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération sont devenues une préoccupation majeure en milieu hospitalier et même en médecine communautaire ([30], [31], [32], [33]). Ces phénomènes constituent une menace croissante pour la santé du fait de la diffusion des souches résistantes et du manque d'un remède efficace pour le traitement des infections résultantes. Alors, ces antibiotiques naturels, au regard de leur action biocide sur les souches multi-résistantes pourraient aider à lutter contre ces phénomènes de résistance.

#### 4 CONCLUSION

Ce travail a été réalisé en vue d'évaluer les propriétés antibactériennes de l'hémolymphe de deux espèces de coléoptères issues de l'entomofaune ivoirienne. Les tests ont concerné des larves de *Oryctes owariensis* et de *Rhynchophorus phoenicis* immunisées par des bactéries Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*E. coli*). L'activité in vitro de l'hémolymphe de ces larves a été évaluée sur la croissance de six (06) souches bactériennes responsables de plusieurs infections courantes en Afrique. Toutes ces bactéries étudiées, qu'elles soient de Gram positif ou négatif, de phénotype sauvage ou résistant ont présenté une sensibilité vis-à-vis des différentes hémolymphe. Les diamètres d'inhibition varient de  $19,12 \pm 2,88$  mm (*E. coli* ATCC 25922) à  $22,58 \pm 2,18$  mm (*S. aureus*, S1) pour l'extrait d'hémolymphe des larves de *O. owariensis* infectées et de  $26,22 \pm 0,69$  mm (*Bacillus subtilis* 1A786) à  $35,30 \pm 2,4$  mm (*S. aureus*, S1) pour celui des larves de *R. phoenicis* infectées. Le pouvoir bactéricide des extraits a été confirmé à de très faible concentration. Les plus petites valeurs de CMI (3,12 mg/mL) et de CMB (6,25 mg/mL) ont été obtenues avec l'extrait de l'hémolymphe des larves de *R. phoenicis* immunisées. Ces résultats montrent que ces hémolymphe contiennent de puissants composés antibactériens pouvant aider à lutter contre les maladies provoquées par ces pathogènes.

#### REFERENCES

- [1] Motte-Florac, Elisabeth. "Entomologie médicale, ethnoentomologie, entomothérapie.", pp. 17-21, 2012
- [2] Folliet, Aurélie. "Les arthropodes: sources de médicaments et de substances d'intérêt médical.", 2006
- [3] Neuberg, Patrick. *Isolement de substances antimicrobiennes d'insectes: Synthèse chimique et préparation d'analogues structuraux*. Diss. Strasbourg 1, 2002
- [4] R. Krautz, B. Arefin and U. Theopold. "Damage signals in the insect immune response." *Frontiers in plant science*, p. 342, (2014)
- [5] Masson, Florent. *Régulations immunitaires et cellulaires impliquées dans le maintien et le contrôle des bactéries endosymbiotiques du charançon des céréales du genre Sitophilus spp*. Diss. INSA de Lyon, 2015
- [6] V. J. Marmaras and M. Lampropoulou, "Regulators and signalling in insect haemocyte immunity." *Cellular signalling*, vol. 21, no. 2, pP. 186-195, 2009
- [7] Y. Carton and A. J. Nappi, "Drosophila cellular immunity against parasitoids." *Parasitology today*, vol. 13, no. 6, pp. 218-227, 1997
- [8] P. Bulet, "Les peptides antimicrobiens de la drosophile." *MS. Médecine sciences*, vol. 15, no. 1, pp. 23-29, 1999
- [9] C. Rosales and E. Uribe-Querol, "Phagocytosis: a fundamental process in immunity." *BioMed research international*, 2017, vol. 2017
- [10] P. Renesto and E. Jouvin-Marche, "L'Antibiorésistance: stratégie de la France face à une menace sanitaire mondiale", 2022
- [11] S. Knutelski, M. Awad and N. Łukasz *et al.*, "Isolation, Identification, and bioinformatic analysis of antibacterial proteins and peptides from immunized hemolymph of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*." *Biomolecules*, vol. 11, no. 1, p. 83, 2021

- [12] F. Jehl, A. Chabaud and A. Grillon, "L'antibiogramme: diamètres ou CMI?." *Journal des Anti-infectieux*, vol. 17, no. 4, pp. 125-139, 2015
- [13] Defer, D., Bourgougnon, N. and Fleury Y., " *Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de l'hémolymphe de Crassostrea gigas et de bactéries associées.*" Diss. Université de Bretagne Sud, 2009
- [14] N. J. Kouadio, N. K. Guessennd, M. W. Kone, B. Moussa, Y. M. Koffi, K. B. Guedé,... and M. Dosso, "Évaluation de l'activité des feuilles de Mallotus oppositifolius (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique." *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol. 9, no. 3, pp. 1252-1262, 2015
- [15] A. J. Nappi and E. Ottaviani, "Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates." *Bioessays*, vol. 22, no. 5, pp. 469-480, 2000
- [16] Anselme, Caroline. *Réponse immunitaire de l'hôte dans la symbiose bactérienne intracellulaire du charançon Sitophilus zeamais*. Diss. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 2006
- [17] A. Dubuffet, C. Zanchi, G. Boutet, J. Moreau, M. Teixeira, and Y. Moret. "Trans-generational Immune Priming Protects the Eggs Only against Gram-Positive Bacteria in the Mealworm Beetle." *PLoS Pathogens* 11, vol. 11, no. 10, p. e10051782015
- [18] J. Dhinaut, M. Chogne, and Y. Moret, "Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect." *Journal of Animal Ecology*, 2018, vol. 87, no. 2, pp. 448-463
- [19] L. Boutabia, S. Telailia, I. Bouguetof, F. Guenadil and A. Chefrou, "Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie)." *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 85, pp. 174-189, 2016
- [20] Ryma, L. A. B. I. O. D. *Valorisation des huiles essentielles et des extraits de Satureja calamintha nepeta: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide*. Diss. Université BADJI Mokhtar Annaba, 2016
- [21] El Harras, Abderrakef. *Analyse d'interaction de peptides, pseudopeptides et glycoconjugués aux activités antimicrobiennes et anti-leishmaniennes avec différents modèles membranaires*. Diss. Université Rennes 1, 2020.
- [22] J. A. Hoffmann, J. M. and Reichhart, "Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective." *Nature immunology*, vol. 3, no 2, pp. 121-126, 2002.
- [23] S. I. Park, J. W. Kim and S. M. Yoe, "Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae." *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 52, no. 1, pp. 98-106, 2015.
- [24] M. C. Hofmann, S. Narisawa, R. A. Hess and J. L. Mill n, "Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen." *Experimental cell research*, vol. 201, no. 2, pp. 417-435, 1992.
- [25] Benmoussa, Khaddouj. *Impact du peptide antimicrobien issu du venin de la fourmi Tetramorium bicarinatum P17 sur la polarisation et l'acquisition des fonctions antifongiques des macrophages humains vis-à-vis de Candida albicans*. Diss. Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2017.
- [26] Y. Millemann, "Le pouvoir pathogène des salmonelles: facteurs de virulence et modèles d'étude." *Veterinary Research*, vol. 29, no 5, p. 385-407, 1998.
- [27] Balière, Charlotte. *Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC*. Diss. Université de Bretagne Occidentale, 2016.
- [28] H. M. Lode, "Clinical impact of antibiotic-resistant Gram-positive pathogens." *Clinical microbiology and infection*", vol. 15, no. 3, pp. 212-217, 2009.
- [29] Amine, Alioua Mohamed. *Les Staphylocoques: sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de Staphylococcus aureus Résistant à la Méticilline*. Diss. Université Badji Mokhtar, 2015.
- [30] A. Manzur, A. M. González, A. Pozos, D. Silva-Herzog and S. Friedman, "Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial." *Journal of Endodontics*, vol. 33, no. 2, pp. 114-118, 2007.
- [31] Allaouchiche, B., Puel, C., Doligez, N., Hayi-Slayman, D., Boselli, E. and Bouvet, L. Infections communautaires chirurgicales graves à staphylocoque: rôle pathogène des SARM. In: *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. Elsevier Masson, p. A223, 2014.
- [32] M. R. Tagajdid, L. Boumhil, M. Iken, M. Adnaoui and A. Benouda, "Étude de la résistance des souches d'Escherichia coli isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération." *Médecine et maladies infectieuses*, vol. 40, no. 2, pp. 70-73, 2015.
- [33] E. J. Klemm, S. Shakoor, A. J. Page, F. N. Qamar, K. Judge, D. K. Saeed, and R. Hasan, "Emergence of an extensively drug-resistant Salmonella enterica serovar Typhi clone harboring a promiscuous plasmid encoding resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins." *MBio*, vol. 9, no. 1, p. e00105-18, 2018.