

**UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

***Formation Doctorale : Parasitologie  
Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé***

présentée et soutenue publiquement

par

**Marcelo Gonzalez**

Le 23 Novembre 2005

**Etude de la réponse immunitaire chez l'huître  
*Crassostrea gigas* : caractérisation et fonctions de  
protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs  
antimicrobiens.**

**JURY**

Pr. Catherine BRETON, Université de Montpellier II.	Président
Pr. Franck VANDENBULCKE , Université Sciences et Technologies de Lille.	Rapporteur
Dr. Philippe BULET, Atheris Laboratoires, Suisse.	Rapporteur
Dr. Guillaume MITTA, Université de Perpignan.	Examineur
Dr. Evelyne BACHERE, IFREMER, Montpellier	Directrice de Thèse

## Avant propos

J'adresse mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur François Bonhomme de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir offert un cadre favorable pour mener à terme ce travail.

Ma profonde et sincère gratitude s'adressent à Madame Evelyne Bachère, ma directrice de thèse, d'abord pour m'avoir accepté dans son équipe et d'avoir dirigé cette thèse, pour son encadrement scientifique, pour ses conseils opportuns, pour sa confiance, pour m'avoir montré une bonne façon de travailler en équipe, pour sa sincérité et sa franchise.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur Yannick Gueguen pour m'avoir apporté ses compétences professionnelles et son soutien pendant toute cette thèse ainsi que pour son amitié sincère.

Je remercie vivement Monsieur Jean Pierre Dedet pour m'avoir accueilli au sein de sa formation doctorale, ainsi que Monsieur Demaille pour avoir bien voulu me recevoir au sein de son école doctorale.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Messieurs Franck Vandenbulcke et Philippe Bulet d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse en dépit de leurs nombreuses obligations.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Catherine Breton pour avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse. Je tiens par ailleurs à exprimer mes remerciements à Monsieur Guillaume Mitta pour sa présence dans le jury de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'équipe des Interaction Moléculaires (UMR5160) et plus particulièrement à Françoise Roquet et Martine Pugniere pour avoir accepté de collaborer ensembles dans cette thèse.

Bernard Romestand

Ce travail de thèse a été soutenu par une bourse de doctorat financée pour le Gouvernement Chilienne – BID, administre pour la Comision Cientifica y Tecnologica (CONICYT). J'exprime donc toute ma reconnaissance aux personnel du CONICYT et plus particulièrement a Monsieur Eugenio Spencer et a sont président Eric Goles.

Spéciale dédicace à mes camarades et ex-camarades du labo pour leur soutien et leur amitié: Julien deL, Géraldine, Julie, Marc, Julien G., Viviane, Brigitte, Jill, Anita, Mike, Jean-Luc.

Amigos chilenos y franceses

## Liste de abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	cADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ALF	Anti-lipopolysaccharide-factor
BGBP	$\beta$ -1,3-glucan-binding protein
BPI	Bactericidal /permeability increasing protein
CETP	Cholesteryl transport protein
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CRP	C Reactive protein
C-terminal	Carboxy-terminal
DD-PCR	Differential Display-PCR
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EST	Expresses Sequence Tag
HDL	High Density Lypoprotein
HNP	Human Neutrophil Peptides
IL	Interleukin
kDa	Kilodaltons
KDO	Acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique
KGD	Lys-Gly-Asp
LBP	Lipopolysaccharides binding protein
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MASP	MBL-Associated Serine Protease
MBL	Mannose Binding Protein
MGD	<i>Mytilus galloprovincialis</i> defensin
MMP	Matrix Metalloproteinases
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
N-terminal	Amino-terminal
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglycanes
PKC	Protein Kinase C
PLTP	Phospholipid transport protein
RGD	Arg-Gly-Asp
SAP	Serum Amyloid Protein
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxide dismutase
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
TLR	Toll Like Receptor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumor Necrosis Factor

## Introduction

L'aquaculture marine mondiale connaît depuis une trentaine d'années une progression régulière de ses productions. La conchyliculture Française occupe une place primordiale dans l'aquaculture marine, la production annuelle avoisine 200.000 tonnes toutes espèces confondues. Il s'agit essentiellement de Mollusques bivalves dont les activités d'élevages (ostréiculture, mytiliculture, vénériculture et pectiniculture) se réfèrent aux noms des genres ou des familles des principales espèces concernées : huîtres (*Ostreidae*), moules (*Mytilidae*), palourdes (*Veneridae*), coquilles Saint-Jacques (*Pectinidae*). Les cultures marines en France sont largement dominées par l'ostréiculture de l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas*, qui est cultivée également au niveau de tous les continents. Sur la base d'une meilleure connaissance de la biologie des bivalves, en particulier sur les processus physiologiques liés à la reproduction et la croissance, des progrès zootechniques considérables ont été réalisés depuis ces dernières années et ont induit une intensification de sa production aquacole qui représente 95% de la production d'huître française (FAO, 2003).

Dans le domaine de l'aquaculture en général, la conséquence directe de l'intensification des élevages et du transfert des animaux entre zones d'élevages a été à l'origine de la propagation et du développement de maladies infectieuses de toutes sortes : bactériennes, virales, protozoaires et mycosiques, à l'origine parfois de lourdes pertes économiques. Pour remédier à ces problèmes, les différents pays producteurs ont mis en place des règles zoo-sanitaires relatives aux eaux et aux coquillages, des contrôles dans les écloséries et des mesures relatives aux élevages. Cependant, au-delà de mesures prophylactiques et de diagnostic mises en place sur la base d'avancées faites en pathologie (Bachère, 2000), et afin d'améliorer la résistance de ces animaux, une orientation complémentaire est de se focaliser sur la compréhension du fonctionnement du système immunitaire de ces animaux en identifiant et caractérisant les processus moléculaires et génétiques impliqués dans les réactions de défense.

Dans ce contexte, mes travaux de recherches réalisés à l'UMR GPIA, CNRS-IFREMER-Université de Montpellier 2, ont porté, sur l'approfondissement des connaissances des mécanismes humoraux et cellulaires de défense de l'huître creuse *Crassostrea gigas* par la caractérisation de gènes, et des protéines correspondantes, impliqués dans les mécanismes immunitaires. Le premier chapitre de ce manuscrit fait un bref rappel sur l'anatomie et la physiologie de notre modèle d'étude, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et sur ses différentes pathologies infectieuses. Puis, nous décrivons les principaux mécanismes cellulaires et

humoraux recensés dans la littérature des invertébrés et des vertèbres ainsi que l'apport des données de génomique dans la compréhension des mécanismes de défense.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes efforcés de démontrer que, chez l'huître *C. gigas*, cette réponse immunitaire innée, basée sur la reconnaissance du non soi faisait intervenir des molécules de communication cellulaire (ligand/récepteur). Nous avons ainsi recherché la présence de molécules plasmatiques déjà décrites chez les vertébrés et invertébrés. L'accent a été mis surtout sur celles qui seraient impliquées dans la reconnaissance aux LPS, substances caractéristiques de la paroi des bactéries gram(-) impliquées dans des cas de mortalités de *C. gigas* (Huvet *et al.*, 2004).

La troisième partie de ce manuscrit concerne la caractérisation d'effecteurs antimicrobiens de l'immunité. Pour cela, nous avons eu à disposition deux banques EST (« Expressed Sequences Tag ») de *C. gigas*. L'une réalisée au laboratoire à partir d'hémocytes de *C. gigas*, soumis à une infection expérimentale (Gueguen *et al.*, 2003), nous a permis d'identifier la première protéine de type « Bactericidal/Permeability Increasing protein » (BPI) chez un invertébrés. La seconde banque EST, réalisée à partir de manteau de l'huître, et provenant de l'UMR Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins (IFREMER – Université de Caen), nous a permis d'isoler et de caractériser pour la première fois chez l'huître, un peptide antimicrobien de type défensine.

Enfin, dans une quatrième partie, les principaux résultats de nos recherches seront résumés et les champs d'investigations ouverts par ces travaux seront proposés. Une discussion générale viendra éclairer les principaux points forts de ce travail ainsi que les applications éventuelles de cette étude pour la conchyliculture.

## Chapitre I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. Rappels anatomiques et physiologiques des huîtres.

Les huîtres *Crassostrea gigas* sont des métazoaires protostomiens classés parmi les mollusques bivalves. La coquille à valves inégales présente un contour irrégulier très variable et les individus sont généralement fixés par la valve gauche qui est convexe. La valve droite à peu près plate est souvent écailleuse. La coquille est sécrétée par la face extérieure et le bord libre du manteau. Elle est constituée de conchyoline et de calcite. Les valves sont reliées au niveau de la partie antérieure par la charnière et par le ligament qui prolonge la charnière. La fonction de celui-ci est purement mécanique : il permet la séparation des deux valves quand le muscle adducteur se relâche et une fermeture parfaite des deux valves quand le muscle est contracté.

Le corps est enveloppé entre les deux pans du manteau dont le bord est composé de trois replis. Ces replis vont être impliqués dans la formation des différentes couches externes de la coquille, mais ont aussi un rôle sensoriel.

La masse céphalique est absente (animaux acéphales) et n'est plus représentée que par la bouche et les palpes labiaux. L'estomac forme un long cæcum où se trouve le stylet cristallin qui est animé de mouvements de rotation et libère des enzymes digestives. L'estomac se prolonge par l'intestin et le rectum qui longe le muscle adducteur et débouche sur l'anus. L'huître possède une paire de branchies lamellaires (lamelibranches) qui s'étendent de l'anus à la bouche, chaque lame étant constituée de 2 feuillets. Ceux-ci sont constitués de filaments insérés de façon parallèle entre eux. On observe également des vaisseaux afférents et efférents, des muscles et des faisceaux nerveux. Les branchies assurent les fonctions de respiration mais aussi de nutrition. L'huître ne possédant pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine, l'oxygène est transporté, dissous dans l'hémolymphe, des branchies vers les organes. Les branchies participent également à l'excrétion de certains déchets.

L'huître possède un organe musculaire, le muscle adducteur, servant à l'ouverture et à la fermeture de la coquille. Il s'agit d'un organe massif, situé dans la partie postéro-dorsale du corps. Il est fermement attaché à chaque valve par une couche de cellules spécialisées. L'ensemble de l'organe est soutenu par une enveloppe de tissu conjonctif. L'huître possède également de nombreux faisceaux musculaires dans le manteau pour sa rétraction, dans les branchies pour assurer les courants d'eau et la circulation de l'hémolymphe, dans le cœur et

autour des artères pour assurer la distribution de l'hémolymphe et autour de l'estomac et dans les palpes labiaux probablement pour participer à la digestion.

Les huîtres sont des organismes hermaphrodites successifs. Les gonades sont situées au niveau de la masse viscérale, entre le manteau et la glande digestive. Elle s'étend de l'œsophage jusqu'à la zone péricardique formant deux lobes englobant la glande digestive. La gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales, pour arriver à maturité sexuelle au cours de l'été.

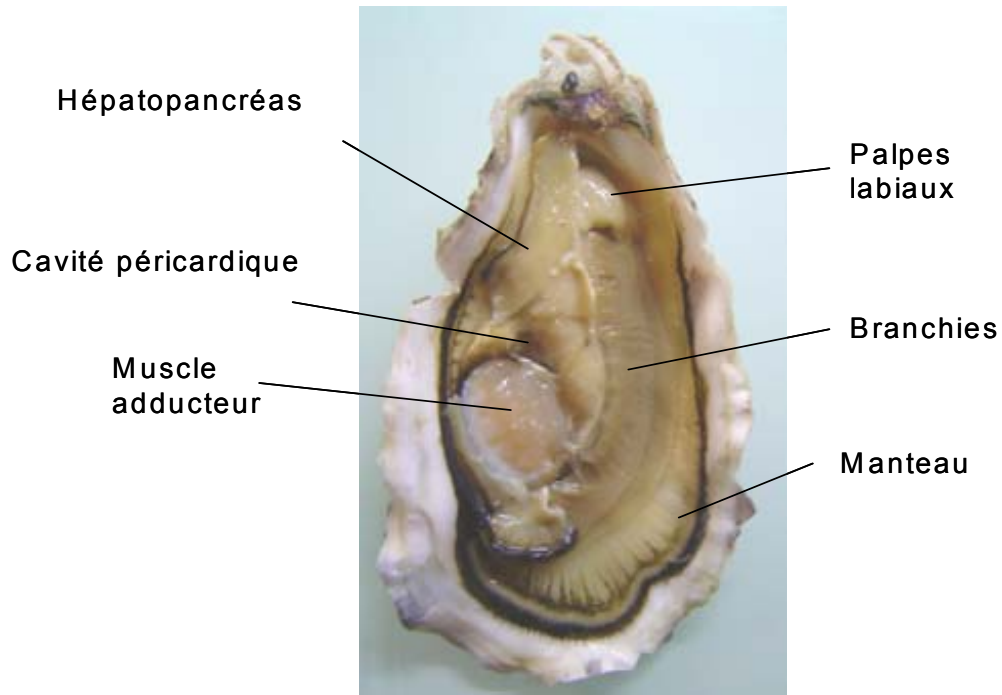
Les huîtres ont un système circulatoire partiellement clos. L'hémolymphe n'est pas confinée aux vaisseaux mais circule au travers de sinus veineux et peut baigner les tissus et organes. Le cœur est situé contre le muscle adducteur dans la cavité péricardique. Il est composé d'un ventricule et de 2 oreillettes. Le ventricule expulse l'hémolymphe dans les aortes antérieures et postérieures et la dirige vers la masse viscérale et le muscle adducteur où un système veineux recrute l'hémolymphe pour la conduire jusqu'aux branchies et au rein (Figure 1).

## **2. Pathologies et problèmes de mortalités estivales des huîtres.**

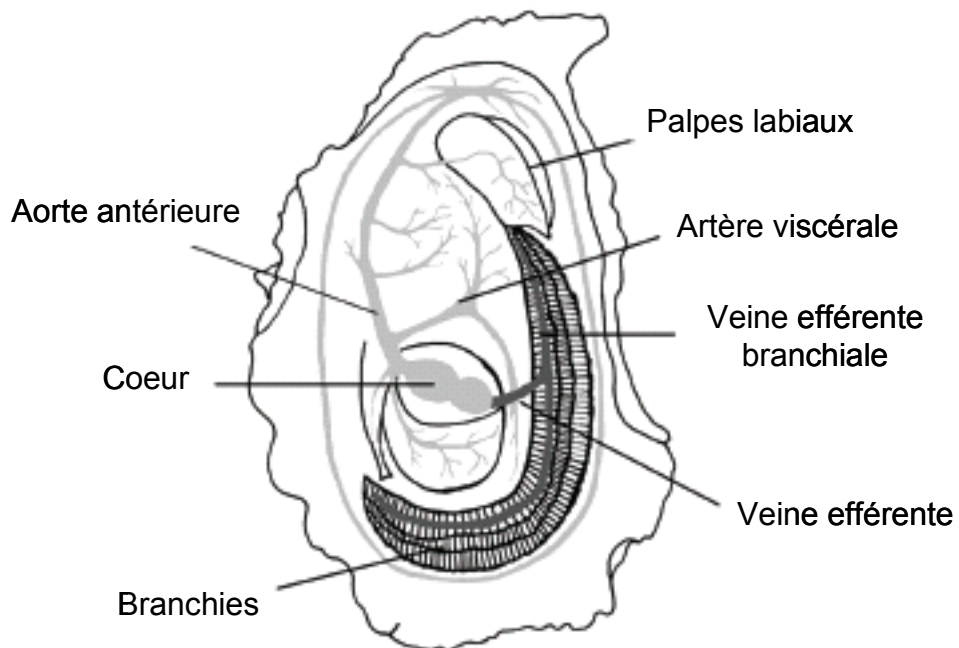
Plusieurs protozoaires parasites ont été décrits dans les différentes espèces d'huîtres. Ainsi, *Perkinsus marinus* est responsable chez l'huître *Crassostrea virginica* de la maladie dite de «Dermo» et cause d'importantes mortalités sur la côte ouest des Etats-Unis et le Golfe du Mexique (Andrews, 1988). Un autre protozoaire *Mikrocytos mackini* est un parasite présent dans le tissu conjonctif (Farley *et al.*, 1988). La maladie due à ce parasite se développe au printemps et se traduit par la présence de pustules vertes sur le manteau et les palpes labiaux. *Haplosporidium nelsoni* est un parasite de l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica* qui est à l'origine de fortes mortalités suite à la destruction progressive de l'épithélium des diverticules digestifs (Ford and Haskin, 1982).

En Europe, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*, sont deux protozoaires parasites de l'huître plate *Ostrea edulis*. Alors que *M. refringens* est localisé dans la glande digestive des huîtres (Grizel *et al.*, 1974), *B. ostreae* est un parasite intra hémocytaire (Comps *et al.*, 1980). Au niveau macroscopique, la bonamiose peut s'accompagner d'ulcérations branchiales. D'un point de vue anatomopathologique, l'infection se caractérise par l'accumulation d'hémocytes dans les lacunes de tous les tissus conjonctifs. Le parasite se présente sous la forme de petites cellules de 2 à 3 µm de diamètre. La présence de ces cellules

**A**



**B**



**Figure 1. Anatomie interne de l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte. A.** Vue interne des principaux organes de l'huître. La valve droite a été ôtée et le pan gauche du manteau excisé. **B.** Schéma du système circulatoire partiellement clos de l'huître. Le cœur, inclus dans une cavité péricardique, est situé entre la masse viscérale et le muscle adducteur. Le cœur pompe l'hémolymphe et la dirige vers les différents tissus.



est souvent associée à une dégradation du tissu conjonctif et à des ulcérations au niveau des branchies accompagnées d'importantes réactions inflammatoires.

Des fortes mortalités ont également été associées à la présence de virus chez différentes espèces d'huîtres. Un virus de la famille des Iridoviridae a été associé à une grave épizootie qui a conduit à la quasi disparition sur les côtes françaises de l'huître *Crassostrea angulata* (Comps *et al.*, 1976). Une maladie également due à un Iridovirus (maladie du vélum) a également été décrite sur des larves de *C. gigas* en éclosion (Elston and Wilkinson, 1985). En 1992, des mortalités importantes associées à la présence d'un virus de type Herpès ont été observées chez des larves d'huître creuse *C. gigas* en éclosion en Nouvelle Zélande et en France (Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992). Ce virus dénommé OsHV (pour Oyster Herpes Virus) a été décrit comme causant des anomalies au niveau des noyaux et de la chromatine dans des cellules fibroblastiques et les hémocytes chez *C. gigas* (Renault *et al.*, 2000). Plus récemment, des anomalies semblables ont été décrites pour des huîtres d'élevages dans la baie de Tomales en Californie, suggérant que l'OsHV pourrait être associé aux mortalités estivales d'huîtres observées (Friedman *et al.*, 2005).

Des infections par un virus de type Papovavirus ont été observées sur la côte du sud de la Corée chez *C. gigas*, se traduisant par une hypertrophie massive des gamètes et de l'épithélium gamétogonique (Choi *et al.*, 2004). Ce virus se réplique dans le noyau de l'hôte et ses caractéristiques morphologiques ressemblent aux inclusions des papovavirus précédemment décrites chez *C. virginica* et *C. gigas* d'Amérique du Nord (Farley, 1978).

Chez les larves d'huîtres, les bactéries du genre *Vibrio* peuvent être associées au développement de nécroses larvaires et être responsables de mortalités. Les vibrioses apparaissent comme des infections opportunistes. Certaines souches se sont révélées particulièrement pathogènes des larves et des juvéniles d'huîtres, parmi lesquelles : *Vibrio anguillarum*, *V. alginoliticus*, *V. splendidus* (S322) et *V. tubiashii* (Sugumar *et al.*, 1998). L'infection par *Vibrio anguillarum* a des effets ciliostatiques et provoque la fermeture de la coquille et l'anoxie (Nottage and Birkbeck 1987).

Des cas de mortalités massives anormales de l'huître creuse *C. gigas* en élevage au cours de la période estivale ne sont pas un phénomène nouveau, puisque de tels épisodes ont été décrits dans la littérature depuis plus de 50 ans. En effet, les premières observations de ce phénomène ont été signalées au Japon (Imai *et al.*, 1965), aux Etats-Unis (Cheney *et al.*, 2000) et en Europe (Gouletquer *et al.*, 1998). En France, de tels épisodes sont apparus dès l'introduction de cette espèce au début des années 1970. Ces épisodes estivaux ont lieu entre juin et septembre avec des pertes pouvant ponctuellement dépasser 50% de la population. En

France, ce phénomène atteint les cheptels de *C. gigas* en élevage pour les juvéniles et les adultes (Goulletquer *et al.*, 1998). Il n'a pas encore été possible d'expliquer de façon systématique les épisodes de mortalité anormale par un agent pathogène et de reproduire la maladie (par un virus ou une bactérie). Des pathogènes opportunistes, dont la pathogénicité serait variable selon les conditions environnementales, ne seraient capables d'infecter l'huître que dans des conditions particulières par exemple affaiblissement de son état physiologique. Ces conditions dépendraient à la fois de son cycle vital et des conditions de son environnement. L'hypothèse de travail serait alors que la mortalité résulte des interactions entre trois composantes : l'environnement, l'hôte et les pathogènes opportunistes (Samain *et al.*, 2003). Les *Vibrios* ont pu être associés aux mortalités estivales. Les vibrioses se traduisent par l'absence de signaux cliniques avant la mort des individus et les mécanismes de déclenchement de phénomènes de virulence des *Vibrios* sont toujours mal compris. Ces difficultés peuvent s'expliquer en partie par la grande diversité des espèces de *Vibrio* impliquées dans les phénomènes de mortalités (Le Roux *et al.*, 2002) (Waechter *et al.*, 2002). Diverses souches de *Vibrio* ont été isolées à partir d'huîtres issues de lots subissant des épisodes de mortalités estivales et identifiées comme apparentées aux *V. splendidus*. Ces souches ont été caractérisées d'un point de vue taxonomique par une approche polyphasique incluant des tests phénotypiques et une analyse phylogénétique. Leur virulence a été évaluée en infection expérimentale, ce qui a permis de fournir un modèle approprié de maladie expérimentale pour de nouvelles études et une meilleure compréhension de l'interaction bactérienne et la pathogénie chez *C. gigas* (Gay *et al.*, 2004a) (Gay *et al.*, 2004b).

### **3. Les hémocytes et les réactions de défense cellulaires**

#### **3.1. Populations hémocytaires**

Les hémocytes sont les cellules sanguines circulantes présentes dans l'hémolymphe des mollusques capables de s'insinuer dans tous les tissus de l'animal. Chez les mollusques bivalves, la classification des hémocytes est basée essentiellement sur des critères morphologiques. La classification la plus utilisée distingue les hyalinocytes, une population d'hémocytes sans granules, et les granulocytes, une population qui se compose de granulocytes basophiles et de granulocytes éosinophiles (Bachère *et al.*, 1988, Ashton-Alcox and Ford, 1998; Goedken and De Guise, 2004).

En effet, chez l'huître *Crassostrea virginica*, Friedl *et al.* (1988) décrivent un type cellulaire, tandis que Fischer et Ford (1988), Ford *et al.*, (1994), Ashton-Alcox *et al.*, (1998), Allam *et al.* (2002), et Goedken (2004) ont identifié trois et même jusqu'à quatre sous populations hémocytaires. Ces travaux illustrent, chez les huîtres et les mollusques en généra, la complexité à définir les types et les lignées hémocytaires sur la seule base de critères physico-chimiques (Figure 2).

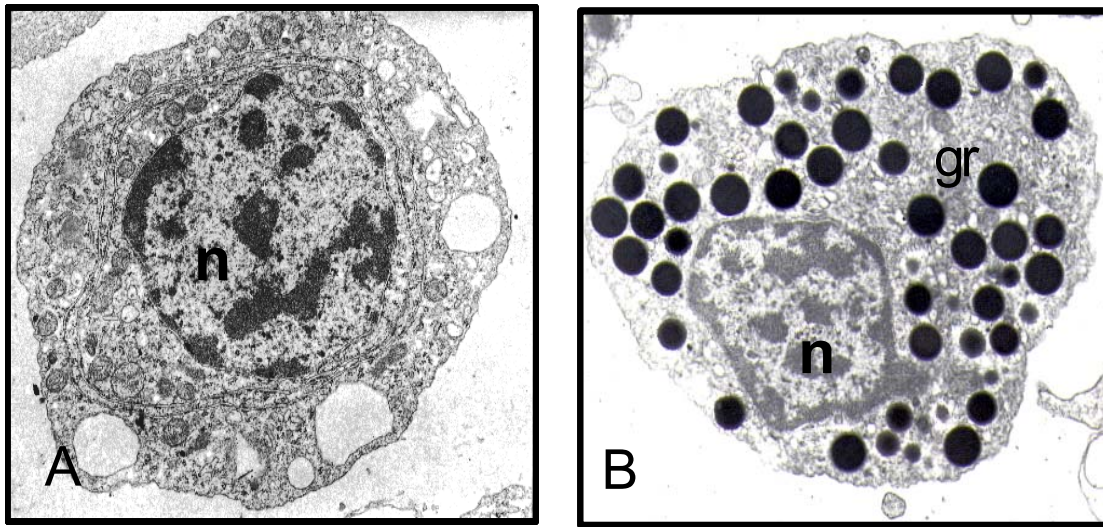
En ce qui concerne la physiologie des huîtres, les hémocytes sont impliqués dans de nombreux processus vitaux comme pour exemple : les réactions de défense, la réparation de lésions, la réparation de la coquille (Mount *et al.*, 2004), la digestion et le transport de nutriments, la respiration ainsi que l'excrétion (Feng, 1988) (Cheng, 1996). Ces fonctions reposent presque entièrement sur les capacités de recrutement des hémocytes vers les sites d'infection ou de lésion, où ils s'agrègent pour restreindre l'infection ou la lésion et y transportent des éléments essentiels (calcium pour la réparation de la coquille, nutriments et les molécules de défense). Leur capacité de phagocytose est aussi une des fonctions essentielles des hémocytes pour éliminer des éléments endogènes (cellules mortes, lésées) ou exogènes (pathogènes, nourriture).

### **3.2. La phagocytose**

La phagocytose contribue à l'élimination de particules étrangères de petite taille. C'est un événement du système immunitaire commun aux vertébrés et aux invertébrés. La phagocytose comprend plusieurs étapes qui sont : la reconnaissance des particules étrangères, l'attachement, la formation de pseudopodes, l'ingestion dans le phagosome, la dégradation par des mécanismes dépendants de l'oxygène ou indépendants de l'oxygène *via* la fusion du phagosome avec des lysosomes et l'élimination des produits de dégradation (Bayne, 1990). A l'intérieur du phagolysosome néoformé, des enzymes sont libérées comme par exemple des phosphatases acides, le lysozyme et des hydrolases.

Ces phénomènes ont été observés dans les hémocytes de plusieurs mollusques (Cheng, 1981). La phagocytose peut être affectée par des paramètres environnementaux, comme par exemple la diminution de la salinité qui réduit l'activité de phagocytose dans les hémocytes de *C. virginica*, *O. edulis* et *H. rufescens* (Martello *et al.*, 2000).

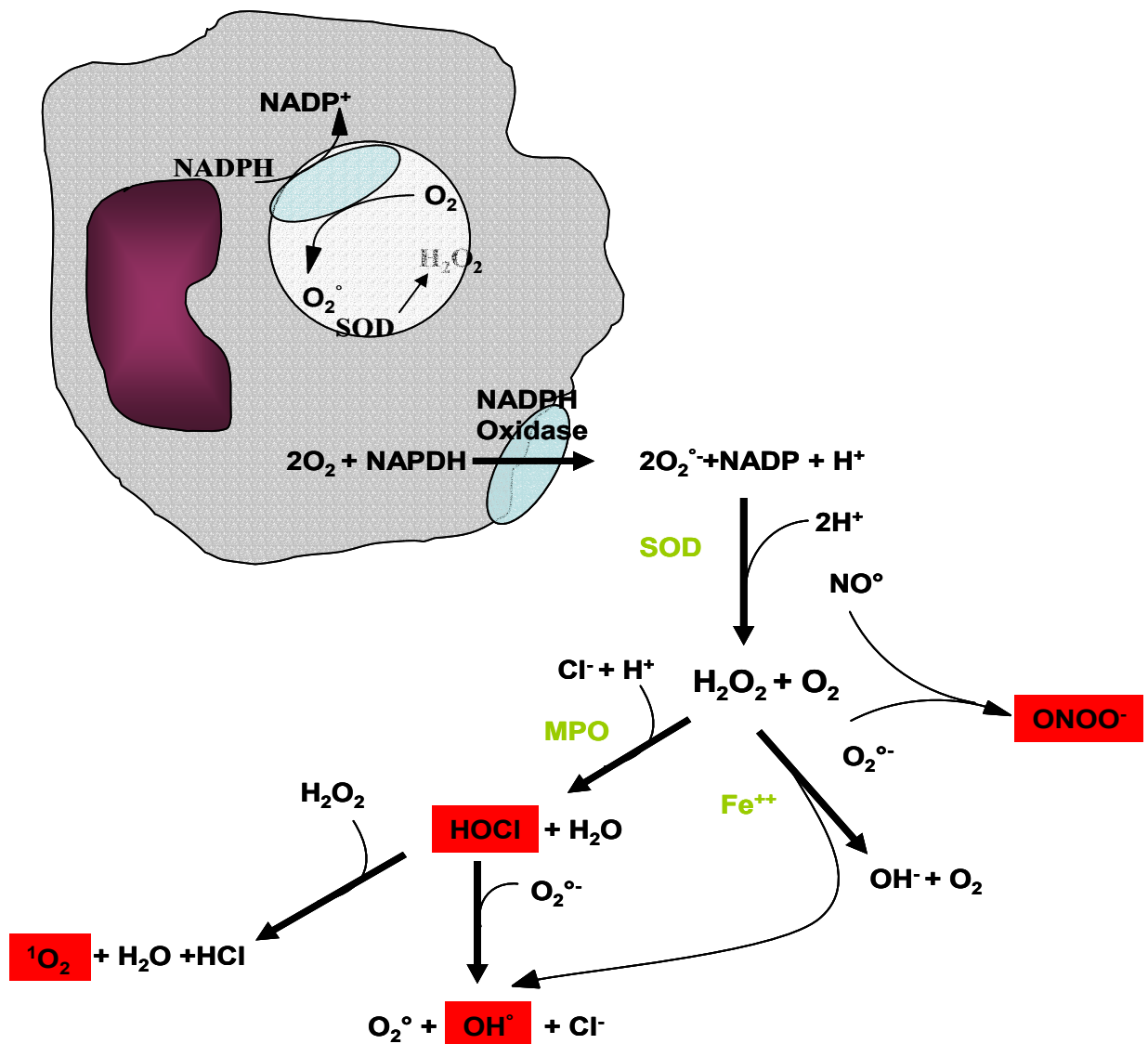
Chez les vertébrés, le métabolisme oxydatif ou choc respiratoire des cellules phagocytaires résulte, suite à un stimulus, en l'activation de la NADPH-oxydase



**Figure 2. Types hémocytaires chez *Crassostrea gigas*.** A. Hyalinocyte, présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé caractérisé par le manque des granules de grande taille dans son cytoplasme. B. Granulocyte caractérisé par un rapport nucléo-cytoplasmique faible contenant une grande quantité de granules denses aux électrons. n, noyau ; gr, granules. (Agrandissement X15000) (Bachère *et al.*, 2004).

membranaire, conduisant à une augmentation de la consommation d'oxygène et à la surproduction de radicaux libres (anions super oxydes, radicaux hydroxyles, peroxyde d'hydrogène, oxygènes singulets, anions hypochlorite,...). Tous ces radicaux dérivés de l'oxygène ont de forts pouvoirs microbicides et sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior, 1984). La NADPH oxydase catalyse la réduction univalente de l'oxygène moléculaire en super oxyde. Ceux-ci peuvent être convertis en peroxyde d'hydrogène soit spontanément soit via la super oxyde dismutase (Figure 3). Comme les cellules de vertébrés, chez les huîtres, la capacité des hémocytes à générer un métabolisme oxydatif a été mise en évidence et étudiée par différentes méthodes (Bachère *et al.*, 1991) (Lambert *et al.*, 2003) (Goedken and De Guise, 2004). Les interactions entre les hémocytes et divers pathogènes, comme des protozoaires parasites (Hervio *et al.*, 1989) ou des bactéries (Lambert and Nicolas, 1998) ont été analysées en considérant l'activation de ces capacités microbicides. Récemment, la capacité de production de radicaux libres de l'oxygène a été étudiée chez des hémocytes de *C. virginica* en fonction de la température (Hégaret *et al.*, 2003). Par ailleurs, chez *C. gigas*, un effet inhibiteur des capacités métaboliques oxydatives a pu être mis en évidence après incubation des hémocytes avec des produits extracellulaires de *V. aesturianus*, révélant un effet cytotoxique de ces bactéries (Labreuche *et al.*, 2005).

Compte tenu de l'importance des réactions de phagocytose chez les mollusques bivalves, il est assez surprenant de constater qu'il y a encore relativement peu d'études sur les bases moléculaires de l'activation de cette fonction. La stimulation des macrophages des mammifères par des LPS ou des bactéries est souvent accompagnée par l'activation d'une voie très conservée appelée « Extracellular-signal Regulated Kinase » (ERK), qui peut réguler positivement ou négativement certaines réactions immunitaires comme la phagocytose dans les macrophages (Weinstein *et al.*, 1992). Ainsi le rôle de la PKC (Protéine Kinases C) dans la réaction immunitaire innée des mammifères a été le centre de beaucoup de recherches et, dans les macrophages, il a été montré que cette famille d'enzymes était en mesure de réguler des processus comme l'adhésion, l'attachement cellulaire, la phagocytoses et la production d'oxygène réactif. Chez le gastéropode *Lymnaea stagnalis* il a été montré que les LPS produisent la modulation de l'expression de la PKC (Walker and Plows, 2003). Les voies ERK et p38 MAPK ont été récemment identifiées dans les hémocytes de mollusques bivalves, *Mytilus galloprovincialis* (Canesi *et al.*, 2002). Il a été démontré que la présence de cette voie ERK dans les hémocytes de *L. stagnalis* est un élément clé indispensable pour assurer l'efficacité de la phagocytoses de bio particules (Plows *et al.*, 2004).



**Figure 3. Mécanismes du métabolisme oxydatif des phagocytes.** La figure résume les voies de destruction des micro-organismes par les espèces oxygénées réactives (ROS) issues de la voie « NADPH-oxydase » lors de la phagocytose. Le complexe enzymatique NADPH transfère des électrons du NAPH cytosolique à l'oxygène de la membrane plasmatique (c'est-à-dire dans l'espace extracellulaire et dans les phagosomes). Quand un macrophage ou un hémocyte phagocyte une bactérie ou un corps étranger, le complexe enzymatique est activé et cette activation correspond à une élévation rapide du métabolisme de l'oxygène et la production des anions super oxydes et autres radicaux toxiques.

On sait que l'internalisation de pathogènes par un phagocyte exige des interactions successives multiples entre le phagocyte et sa cible, l'internalisation est en grande partie réalisée par des protéines membranaires de la famille des intégrines, qui correspondent à une classe de récepteurs superficiels hétérodimériques exprimés sur presque toutes les cellules de la plupart des eucaryotes (Hudson *et al.*, 2005). Dans les hémocytes de l'insecte (*Ceratitis capitata*) il a été démontré que l'internalisation des LPS de bactéries gram (-) dépend d'un processus d'interaction avec une  $\beta$ -intégrine qui permet l'activation d'une voie de transduction de signal Ras/MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase) (Foukas *et al.*, 1998).

### **3.3. L'encapsulation.**

L'encapsulation permet l'élimination de particules de taille supérieure à celle des hémocytes. Elle correspond à une accumulation d'hémocytes organisés en couches successives autour du corps étranger. La formation des capsules d'origine hémocytaire vis-à-vis de parasites a été étudiée chez les huîtres *C. virginica* (Cheng, 1996) et les palourdes comme *Tapes semidecussatus* (Montes *et al.*, 1995), ou le clam *Mercenaria mercenaria* (Smolowitz *et al.*, 1998). Cette réponse comprend la formation de quelques couches concentriques, formées par les hémocytes et les fibres qui sont sécrétées. Les hémocytes granuleux ont été considérés comme les principaux responsables de la formation des capsules chez les mollusques. Le modèle le plus étudié est le mollusque gastéropode *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) chez qui les hémocytes sont impliqués dans la réponse immune vis-à-vis des larves de trématodes *Schistosoma mansoni* (van der Knaap and Loker, 1990). Alors que la reconnaissance serait réalisée par les hémocytes, l'encapsulation et la réponse cytotoxique semblent être en partie régulées par des facteurs humoraux (Bayne *et al.*, 2001). Un effet modulateur a été démontré pour larves de *S. mansoni*, avec la modification de plusieurs paramètres hémocytaires comme : la suppression de la phagocytose par les hémocytes, le changement de leur mobilité, leur variation du nombre, leur cyto-adhérence et leur capacité métabolique (Noda and Loker, 1989a) (Noda and Loker, 1989b) (Connors and Yoshino, 1990) (Lodes and Yoshino, 1990). Plus récemment, la production de radicaux libres a été étudiée dans des hémocytes de *B. glabrata* résistants ou susceptibles à *S. mansoni*. Ces travaux ont révélé que, dans les hémocytes issus des animaux résistants, l'abondance des transcrits de superoxyde dismutase de type cytosolique était le double que celle observée dans des hémocytes d'animaux susceptibles (Hahn *et al.*, 2001) (Goodall *et al.*, 2004) (Bender *et*

*al.*, 2005). Des approches moléculaires et biochimiques ont été réalisées principalement chez *B. glabrata* pour identifier des gènes impliqués dans la réponse hôte-parasite. Parmi les molécules caractérisées, nous pouvons citer un groupe de protéines de type fibrinogène (FREPs), une sous-unité  $\beta$ -intégrine, des inhibiteurs de cysteine-protéase ou encore une lectine du type C, Bg-Sel (Hertel *et al.*, 2005) (Guillou *et al.*, 2004, Mitta *et al.*, 2005; Vergote *et al.*, 2005;).

#### **4. Apport de la génomique pour la compréhension de la réponse immunitaire de l'huître.**

Au cours des dernières années le développement d'approches de génomique a permis de progresser sur la caractérisation de gènes chez des modèles biologiques peu ou mal connus, tels que les huîtres. Ces approches ont pour but d'isoler des transcrits de gènes orthologues à des gènes déjà décrits dans d'autres organismes. De ce fait, des fonctions possibles peuvent être assignées aux gènes isolés, par la recherche d'homologies dans des bases de données. Ainsi des effecteurs immunitaires potentiels et certaines catégories fonctionnelles impliquées dans une réponse immunitaire ont pu être mis en évidence. Des techniques permettant d'acquérir un grand nombre de transcrits de gènes exprimés dans un organisme ou un tissu donné sont basées sur la réalisation de banque d'ADN complémentaires (ADNc), leur séquençage en masse (programme EST: «Expressed Sequence Tag») et leur identification par recherche d'homologies sur les bases de données. D'autres approches de génomique cherchent quant à elles à isoler des séquences codant des gènes selon leurs expressions différentielles entre des échantillons biologiques, sur la base de profils d'expression au cours d'une réaction donnée afin de comprendre comment la réponse immunitaire se met en place dans le temps et quels sont les effecteurs impliqués dans une réaction de défense donnée (Chen *et al.*, 2004).

##### **4.1. Recherche de gènes différentiellement exprimés chez l'huître.**

Des approches ciblées sur l'identification de gènes plus spécifiquement impliqués dans des réactions ou mécanismes donnés ont été développées. En particulier, ces approches ont été entreprises afin de comprendre quels acteurs et comment ces acteurs interviennent au cours d'une réaction de défense.



L'une des premières techniques utilisées est le «Differential Display-PCR» (DD-PCR), permettant de comparer simultanément les profils d'expression provenant de différents échantillons biologiques. Cette technique permet d'isoler dans un même temps les gènes qui seraient sur et sous-exprimés entre les échantillons analysés, sans avoir de connaissances préalables sur leurs séquences. Le DD-PCR est basé sur l'amplification par PCR des ADNc issu des échantillons à comparer dans des conditions peu stringentes, afin d'obtenir suffisamment de matériel dont les profils d'amplification seront comparés sur gel d'électrophorèse à haute résolution. Les fragments potentiellement différenciellement représentés sont isolés, clonés et séquencés pour leur identification. Cependant, cette technique de DD-PCR conduit à l'obtention d'une importante proportion de faux positifs estimée à 50% (Martin and Pardee, 1999), le problème majeur étant le risque de co-purification de fragments constitutivement exprimés recouvrant l'unique fragment différenciellement exprimé (Mathieu-Daude *et al.*, 1996).

Dans le cadre de l'étude des mécanismes de défense des huîtres, la méthode de DD-RT-PCR a été appliquée pour isoler des gènes potentiellement surexprimés au cours d'une stimulation de *C. gigas* par un mélange de bactéries tuées. Ces travaux ont conduit en particulier à la caractérisation d'un gène codant pour une sérine-thréonine kinase de la famille des IKKs (Escoubas *et al.*, 1999). Cette protéine de type oIKK pour «oyster IκB Kinase» est exprimée de façon constitutive dans différents tissus comme chez les mammifères. Les expériences d'expression transitoire en lignée humaine pour oIKK, ont montré que cette protéine est fonctionnellement homologue aux protéines IKKs de mammifères (Escoubas *et al.*, 1999). Avec la même technique de DD-PCR, une séquence codant une protéine de 221 acides aminés a été identifiée homologue à des inhibiteurs de métalloprotéinases. Cette protéine a été appelée *Cg*-TIMP pour «*Crassostrea gigas* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase» et il a été établi qu'au cours d'une stimulation par des *Vibrios* ou par une lésion de la coquille son expression dans les hémocytes circulants est induite (Montagnani *et al.*, 2001). Un gène impliqué dans la prolifération cellulaire a également été identifié par cette approche différentielle présentant des homologies avec une famille de facteurs de transcription et a été appelé *Cg*-Tal (Barreau-Roumiguière *et al.*, 2003). Chez les vertébrés, l'activation d'expression de Tal1/SCL est essentielle pour l'initiation de l'hématopoïèse et la formation de cellules souches hématopoïétiques (Porcher *et al.*, 1996).

Une autre approche repose la préparation de banques soustractives qui permettent d'obtenir un nombre important de séquences de transcrits préférentiellement exprimés dans une condition donnée. Des étapes d'hybridations soustractives (SSH, «Suppression

Subtractive Hybridization») permettant d'éliminer les transcrits communs aux échantillons analysés. Les fragments soustractifs sont alors amplifiés par deux étapes de PCR afin de normaliser l'abondance des séquences isolées. Les fragments de transcrits ainsi obtenus sont clonés et un programme de séquençage de type ESTs est appliqué afin d'identifier ces séquences. Le nombre de séquences isolées par cette technique reste toutefois moins important que par la réalisation d'une banque d'ADNc classique, mais peut cependant conduire à l'identification de plusieurs centaines de séquences. Par ailleurs, la digestion des ADNc inhérente à la technique conduit à l'isolement de séquences partielles de transcrits dont la taille (500 nucléotides en moyenne) permet néanmoins leur identification par comparaison sur les bases de données.

Chez les huîtres, cette technique a été appliquée à partir de branchies et d'hémocytes chez *C. virginica* et *C. gigas* infectées par le protozoaire parasite *Perkinsus marinus* afin d'isoler les gènes surexprimés et de comprendre la réponse immunitaire pour ces deux espèces d'huîtres (Tanguy *et al.*, 2004). En effet, *C. virginica* est sensible à ce parasite alors que *C. gigas* apparaît réfractaire aux infections. Chez *C. virginica*, différentes molécules impliquées dans l'immunité et exprimées dans les hémocytes ont pu être identifiées. Nous mentionnerons :, un récepteur de type «Toll-like receptor 4» et des lectines comme la « $\beta$  galactoside-binding lectin». Par contre, chez *C. gigas* une protéine de reconnaissance comme la « $\beta$ 1, 3-D glucan-binding protein» a été identifiée. En utilisant la même approche, la « $\beta$ 1,3-D glucan-binding protein» a été aussi mise en évidence dans des huîtres soumises à un stress par contamination par des hydrocarbures ou des pesticides, ainsi que des séquences codant des inhibiteurs de protéases, telles qu'une  $\alpha$ 2-macroglobuline et une procathepsine exprimées dans la glande digestive et les branchies (Boutet *et al.*, 2004), (Tanguy *et al.*, 2005). Ces inhibiteurs de protéases pourraient intervenir dans l'inhibition des protéases de pathogènes ou de bactéries opportunistes apparaissant lors de ce type de stress.

#### **4.2. Programmes ESTs chez les huîtres *Crassostrea*.**

L'analyse d'ESTs constitue une méthode d'identification à haut débit de gènes, permettant de caractériser un type tissulaire ou un état physiologique par l'analyse de leur transcriptome. Chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas*, sur la base de recherche d'homologies de séquences avec des gènes déjà caractérisés dans d'autres groupes, deux programmes ESTs ont permis d'acquérir un certain nombre de transcrits de gènes à partir de différents organes.

Ces programmes ont été développés à partir de banques d'ADNc, provenant d'hémocytes ou de larves d'huîtres obtenus soit à partir d'un seul individu, soit à partir d'un pool d'animaux. Ainsi, dans le cas de *C. virginica*, les projets d'EST ont été réalisés à partir d'animaux non stimulés (Jenny *et al.*, 2002); par contre chez *C. gigas* une banque d'ADNc a été construite à partir d'hémocytes collectés sur des animaux 12 heures après une injection d'un mélange de bactéries (*V. anguillarum*, *V. metshnikovii*, *V. tubiashii* et *V. splendidus* S322) (Gueguen *et al.*, 2003). Ces programmes d'ESTs ont contribué à d'importantes avancées dans la caractérisation moléculaire d'effecteurs de l'immunité exprimés dans les hémocytes des huîtres. Les séquences identifiées ont pu être classées en différentes catégories selon leur fonction potentielle (Jenny *et al.*, 2002) (Gueguen *et al.*, 2003).

Chez *C. gigas*, parmi les ESTs présentant des homologies de séquence avec gènes potentiellement impliqués dans des systèmes de défense, les séquences de *Cg-Timp*, l'inhibiteur de métalloprotéases, sont fortement représentés dans la banque (19 ESTs de 55), suggérant un rôle dans la réaction immunitaire. Comparativement, aucune séquence de cet inhibiteur n'a été identifiée dans les banques d'ESTs d'hémocytes de *C. virginica* (Jenny *et al.*, 2002). Par ailleurs, deux protéases, une métalloprotéase et une cystéine-protéase (cathepsine) et des inhibiteurs des protéases, telles que serpine et  $\alpha$ 2-macroglobuline, ont pu être isolés ainsi que le récepteur de l' $\alpha$ 2-macroglobuline (Gueguen *et al.*, 2003). Chez *C. gigas*, l'établissement de banques d'ESTs a permis de mettre en évidence quatre ADNc homologues à des membres de la voie de transduction de signal de type Rel/NF- $\kappa$ B (Gueguen *et al.*, 2003), comme MyD88, TRAF, ECSIT ainsi que Cactus, un homologue chez la drosophile de I $\kappa$ B (Aderem and Ulevitch, 2000) (Hoffmann and Reichhart, 2002). Ces données, en plus des gènes précédemment caractérisés (oIKK et *Cg-Rel*), tendent à confirmer l'existence de la cascade Rel/NF- $\kappa$ B chez l'huître. En outre, des molécules impliquées dans la reconnaissance cellulaire ont été également isolées, appartenant au groupe des lectines (Ficolin, Galectine et Manose binding C-type lectin) (Gueguen *et al.*, 2003).

Chez les huîtres, à ce jour, aucun site d'hématopoïèse n'a encore été identifié et les phénomènes de prolifération hémocytaire sont largement inconnus, alors qu'ils apparaissent être un composant important de la réaction immunitaire chez les invertébrés (Bachère *et al.*, 2004). Dans la banque d'ESTs de *C. gigas*, deux clones ont été identifiés comme faisant partie des gènes régulateurs du cycle cellulaire, spécifiquement exprimés dans des cellules hématopoïétiques. Le premier clone est homologue à LckBP1, une protéine de souris seulement produite dans des cellules souches hématopoïétiques (Takemoto *et al.*, 1995). Un deuxième est homologue à la protéine de drosophile Drac3, une petite GTPase de la famille

Rho, connue comme impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire et d'apoptose. Drac3 est fortement exprimé dans des précurseurs d'hémocytes de la drosophile et il est un élément essentiel pour leur développement dans des cellules matures (Sasamura *et al.*, 1997).

Chez les huîtres l'ensemble de ces programmes a conduit à l'acquisition de données de séquences qui sont disponibles sur des bases de données publiques, et ouvre des perspectives de recherches ciblées ou globales. En outre, il est intéressant de noter la création de bases de données (<http://www.ifremer.fr/GigasBase/>; <http://www.marinegemonics.com>) regroupant les séquences recueillies par les programmes ESTs réalisés chez *C. virginica* et *C. gigas* ainsi que leurs caractéristiques, facilitant grandement leurs analyses ainsi que la recherche de séquences particulières. Les résultats présentés dans le cadre de ce travail de thèse ont reposé largement sur des données issues des programmes ESTs obtenus chez *C. gigas*.

## **5. Mécanismes généraux de l'immunité innée chez les vertébrés et invertébrés**

### **5.1. La reconnaissance des microorganismes ou du non-soi.**

Les mécanismes de reconnaissance du non-soi sont une étape primordiale pour la mise en oeuvre de réactions de l'immunité et l'élimination des corps étrangers. Dans le cadre de l'immunité innée, la reconnaissance de certains motifs moléculaires des polysaccharides présents à la surface des microorganismes conduit au déclenchement des mécanismes de défense. Parmi ces composants, il faut citer les lipopolysaccharides (LPS) constituant la paroi des bactéries à Gram (-) ou les  $\beta$ -1,3-glucanes de la paroi des champignons, l'acide lipotéchoïque, des lipoarabinomannanes, des lipopeptides ou l'ADN bactérien (Beutler, 2004). Des molécules de reconnaissance liant ces différents motifs ont été décrits chez différentes espèces d'invertébrés. Elles peuvent être circulantes, se présenter sous forme soluble dans l'hémolymphe, où se localiser dans les hémocytes au niveau des granules ou associées aux membranes.

Les LPS sont les composants essentiels des bactéries à Gram (-) qui activent fortement le système immunitaire inné (Miyake, 2004). Les LPS sont des complexes macromoléculaires présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram (-). Sur le plan structural, les LPS sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique débordant de la membrane externe des bactéries. Le lipide A est doué de propriétés toxiques et il correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram (-) qui n'est libérée, de manière massive, qu'après la lyse de la bactérie. La fraction polysaccharidique est constituée d'un noyau (ou

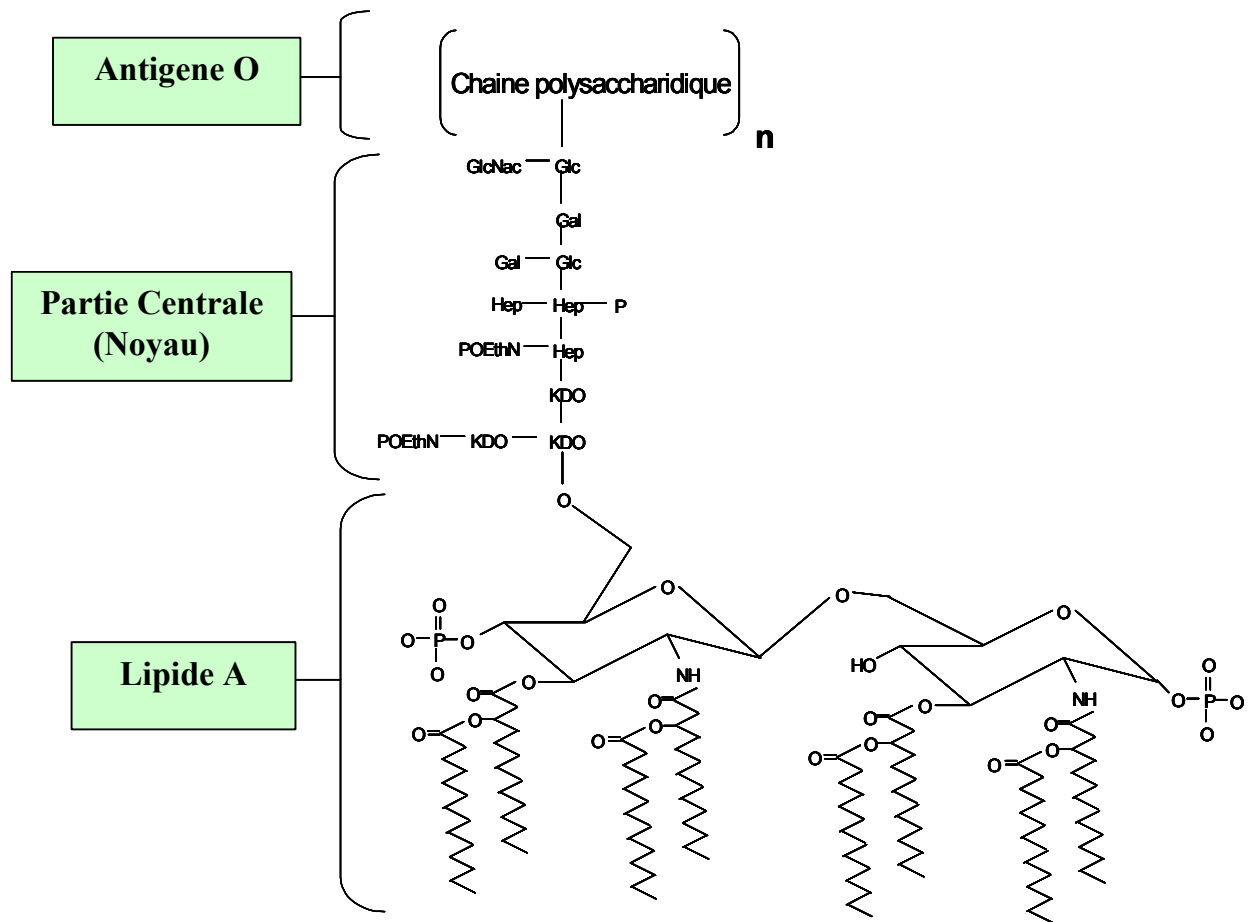
core) interne lié au lipide A et d'un noyau (ou core) externe lié à une chaîne polysaccharidique terminale appelée aussi chaîne O-spécifique (Figure 4). La structure du core est semblable pour les souches d'une même espèce mais varie selon les espèces. Le noyau interne contient deux sucres inhabituels, l'heptose et l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO). Le KDO est toujours présent dans le LPS. Un résidu de KDO est lié par covalence au lipide A et selon les espèces le nombre de résidus de KDO est variable (généralement deux ou trois). Le noyau ou core externe est constitué d'un nombre variable de résidus d'hexoses ou d'hexosamines. La chaîne O spécifique est la partie la plus variable du LPS (REFYG). Elle est constituée de chaînons répétitifs comprenant chacun 3 à 8 sucres et dont le nombre varie de 20 à 40 par exemple chez les salmonelles (Westphal *et al.*, 1983).

De nombreux travaux ont été effectués sur l'identification de molécules qui reconnaissent des LPS (Chaby, 2004). Chez les vertèbres et plus particulièrement chez les mammifères, un intérêt particulier s'est porté sur les molécules de reconnaissance des endotoxines ou des LPS des bactéries à Gram (-) dont les infections peuvent provoquer des septicémies ou des chocs septiques (Lazaron and Dunn, 2002). Chez les invertébrés, et plus particulièrement chez les arthropodes, de nombreuses protéines plasmatiques capables de lier les LPS ont également été caractérisées (Iwanaga, 2002) (Kim *et al.*, 2000) (Lee *et al.*, 2000) (Beschlin *et al.*, 1998) (Metheniti *et al.*, 2003).

## **5.2 Peptides et protéines solubles liant les LPS.**

### **5.2.1. Les peptides antimicrobiens**

Chez les vertébrés, parmi les molécules stockées dans les granules des neutrophiles, nous pouvons citer les lysozymes, les cathepsines G, les azurocidines, d'autres polypeptides, et les peptides antimicrobiens (défensines et cathélicidines) (pour revue, Ganz and Lehrer, 1998). Les défensines, dénommées chez l'homme HNP (Human Neutrophil Peptides) au nombre de 4 (HNP1-4), sont des peptides cationiques de 3-4 kDa, présentant des activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries, des champignons et des virus, ainsi que des activités cytotoxiques (Ganz *et al.*, 1990). Chez l'homme les  $\alpha$ -défensines peuvent également se lier aux LPS (Levy *et al.*, 1995). La capacité de liaison peut être due à l'exposition de acides aminés chargés et non polaires localisés sur différentes faces de la molécule (Wimley *et al.*, 1994).



**Figure 4. Diagramme représentant l'organisation chimique d'un lipopolysaccharide issu d'une bactérie Gram-négative.** On distingue trois parties : Lipide A, zone centrale appelée « noyau » et chaîne répétitive de l'antigène O.

Les cathélicidines forment un groupe de peptides antimicrobiens structurellement diversifiés, caractérisés exclusivement chez les mammifères et comportant des caractéristiques communes. Les cathélicidines correspondent à la partie C-terminale active d'un précurseur stocké dans les granules spécifiques des neutrophiles alors que les défensines sont localisées dans les granules azurophiles. Outre la partie cathélicidine, les précurseurs comportent une région N-terminale de 128 à 143 acides aminés dénommée cathéline qui est le seul point commun à toutes les cathélicidines connues chez diverses espèces elle est cependant dépourvue d'activité microbicide (pour revue voir Zanetti *et al.*, 1995). Ainsi, le polypeptide antimicrobien CAP-18 /LL-37 (18 kDa), présente une activité antimicrobienne et une capacité de liaison aux LPS (Gutsmann *et al.*, 2000). Le peptide antimicrobien de mouton SMAP-29 contient dans sa séquence deux sites de liaison aux LPS, un site de haute affinité pour les LPS constitué par RGLRRLGR et localisé à l'extrémité N-terminale du peptide, et un site de faible affinité aux LPS positionné dans la région C-terminale (Tack *et al.*, 2002).

Chez la limule, *Tachypleus tridentatus*, de nombreuses molécules de défenses solubles synthétisées par les hémocytes (ou amébocytes) ont été caractérisées (Iwanaga, 2002). Lors d'un contact avec des LPS, les hémocytes subissent un phénomène de dégranulation et relarguent un certain nombre d'effecteurs contenus dans les granules cytoplasmiques, granules-L (pour «Large»), granules-S (pour petits granule). Certains peptides antimicrobiens, contenus dans les petits granules, comme la tachyplésine et la polyphémusine neutralisent alors l'activité des LPS (Iwanaga, 2002). Par ailleurs, un polypeptide, anti-LPS factor (ALF), contenu dans les granules-L avec un ensemble de plusieurs facteurs de coagulation et des inhibiteurs de protéases, est également libéré. L'ALF présente des activités antimicrobiennes contre divers types des bactéries Gram (-) et une forte activité de liaison aux LPS (Hoess *et al.*, 1995).

Chez les insectes, on peut trouver également des peptides capables de se lier aux LPS. Ainsi, la cécropine A peut se fixer dans le plasma de *Drosophila* au diphosphoril lipide A et aux LPS de bactéries à Gram (-) (De Lucca *et al.*, 1995). La sarcotoxine IA, produite chez la mouche de la viande *Sarcophaga peregrina*, peut se lier au lipide A des LPS via deux résidus du domaine N-terminal (Okemoto *et al.*, 2002). Egalement, la melittine produite par l'abeille est capable de liaison avec le lipide A (David *et al.*, 1992).

### **5.2.3. La protéine C impliquée dans la cascade de coagulation chez les invertébrés.**

Les arthropodes possèdent un système circulatoire ouvert qui les oblige à réagir rapidement face à des pertes d'hémolymphe ou/et à des pénétrations de microorganismes lors de blessures, notamment par des réactions de coagulation (Söderhäll and Cerenius, 1992).

Les granules des amoebocytes de la limule, *Limulus polyphemus* ou la limule japonaise (*Tachypleus tridentatus*), contiennent le facteur C, qui est libéré par exocytose en réponse à la présence de micro-organismes. Ce facteur C est libéré en faible quantité, de l'ordre du femtogramme. Les lysats d'amoebocytes de limule ont été utilisés pendant des décennies comme méthode très sensible pour détecter de faibles concentrations de LPS (Saladino *et al.*, 1994). Le facteur C est caractérisé par un domaine N-terminal ayant la propriété de liaison aux LPS, et un domaine C-terminal qui présente une activité sérine-protéase (Tan *et al.*, 2000).

### **5.2.4. Protéines transporteuses des lipides.**

La protéine transporteuse de lipides (PLTP) et la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP) sont des protéines transporteuses de lipides que l'on retrouve dans le plasma des vertébrés, associée à la protéine apo A1. Ces protéines ont pour fonction le transfert ou l'échange de lipides (phospholipides, esters de cholestérol et triglycérides) entre les lipoprotéines plasmatiques (Tall, 1995). Les deux protéines, CETP et PLTP, peuvent fixer les LPS, et dans le cas de PLTPs, ces LPS peuvent être neutralisés. Ces protéines de transfert de lipides présentent des homologies (autour de 26 %) avec deux autres protéines capables de lier les LPS, la BPI (« Bactericidal/Permeability Increasing protein ») et LBP (« LPS-binding protein ») (Guyard-Dangremont *et al.*, 1999). La PLTP est capable de transférer les LPS vers les particules de lipides, mais elle est incapable de transférer les LPS vers CD14 (Hailman *et al.*, 1994).

### **5.2.5 Protéines de reconnaissance des LPS**

Un autre type de protéine plasmatique peut agir en association avec apo A1, il s'agit du LBP (LPS-binding protein). Les LBPs ont la capacité de reconnaître spécifiquement les LPS des bactéries à Gram (-) (Thomas *et al.*, 2002). La protéine LBP fonctionne comme un véritable récepteur aux endotoxines signalant la présence de bactéries en se liant aux



molécules CD14. En augmentant la sensibilité aux LPS, elle participe à l'élimination des bactéries dans la circulation et permet l'activation de la production de cytokines pro inflammatoires par l'intermédiaire de la voie Toll de signalisation cellulaire (Amura *et al.*, 1998). LBP montre 24 % d'identité avec PLTP et 23 % avec CETP. LBP est principalement produit par les hépatocytes, où il est synthétisé dans les cellules sous la forme d'un précurseur de 50 kDa qui est libéré dans le plasma comme une glycoprotéine mature de 60 kDa. Il a été montré que l'activité de liaison aux LPS est localisée dans la région N-terminale de LBP où plusieurs domaines de liaison aux LPS ont été identifiés (Dankesreiter *et al.*, 2000). Une deuxième fonction de LBP est celle d'augmenter l'interaction entre les LPS avec le CD14 de type soluble, que permet la formation d'un complexe tri moléculaire stable qui est obtenu par l'intermédiaire de l'extrémité C-terminal de LBP (Thomas *et al.*, 2002). Finalement, une troisième fonction de cette protéine est d'assurer le transport de phospholipides (Yu *et al.*, 1997).

La protéine CD14 est une glycoprotéine de 55 kDa que lie des LPS et permet des réponses LPS dépendantes pour une grande variété de cellules (Wright *et al.*, 1990). CD14 existe sous deux formes : (1) une protéine membranaire CD14 (mCD14) qui est exprimée à la surface des monocytes, macrophages et neutrophiles (Chaby, 2004); (2) une protéine soluble. Le CD14 membranaire est ancré dans la membrane par l'intermédiaire d'un glycosyl phosphoinositol (GPI). Ne présentant pas de domaine transmembranaire traditionnel, elle ne peut fournir directement de signalisation à la cellule cible (Haziot *et al.*, 1993). Le CD14 associé à son ligand est alors capable d'interagir avec TLR4 (Toll-like receptor). Le TLR 4 comprend un domaine extracellulaire avec des répétitions riches en leucines qui interagissent avec le CD14 complexé au LPS. Le CD14 sous forme soluble existe également dans le plasma, il est à l'origine des réponses pour les cellules qui n'expriment pas le CD14 membranaire, comme les cellules endothéliales, les astrocytes et les cellules épithéliales (Arditi *et al.*, 1993). Le facteur soluble CD 14 est une protéine simple qui contient des ponts disulfures intramoléculaires,, il est caractérisée par une extrémité C-terminale riche en leucines. À la différence de mCD14 qui exige l'interaction avec LBP, sCD14 peut directement lier les LPS (Akashi *et al.*, 2003). La région N-terminale de sCD14 contient quatre motifs ou régions impliquées dans la liaison aux LPS (Shapiro *et al.*, 1997). En conséquence, le complexe LPS-CD14 peut agir sur l'activation de cellules normalement déficientes en CD14 membranaire, comme par exemple les cellules endothéliales (Frey *et al.*, 1992). Des mutations effectuées dans les régions impliquées dans l'interaction aux LPS/CD14 par des substitutions en alanines, ont montré une diminution de la réponse cellulaire vis-à-vis

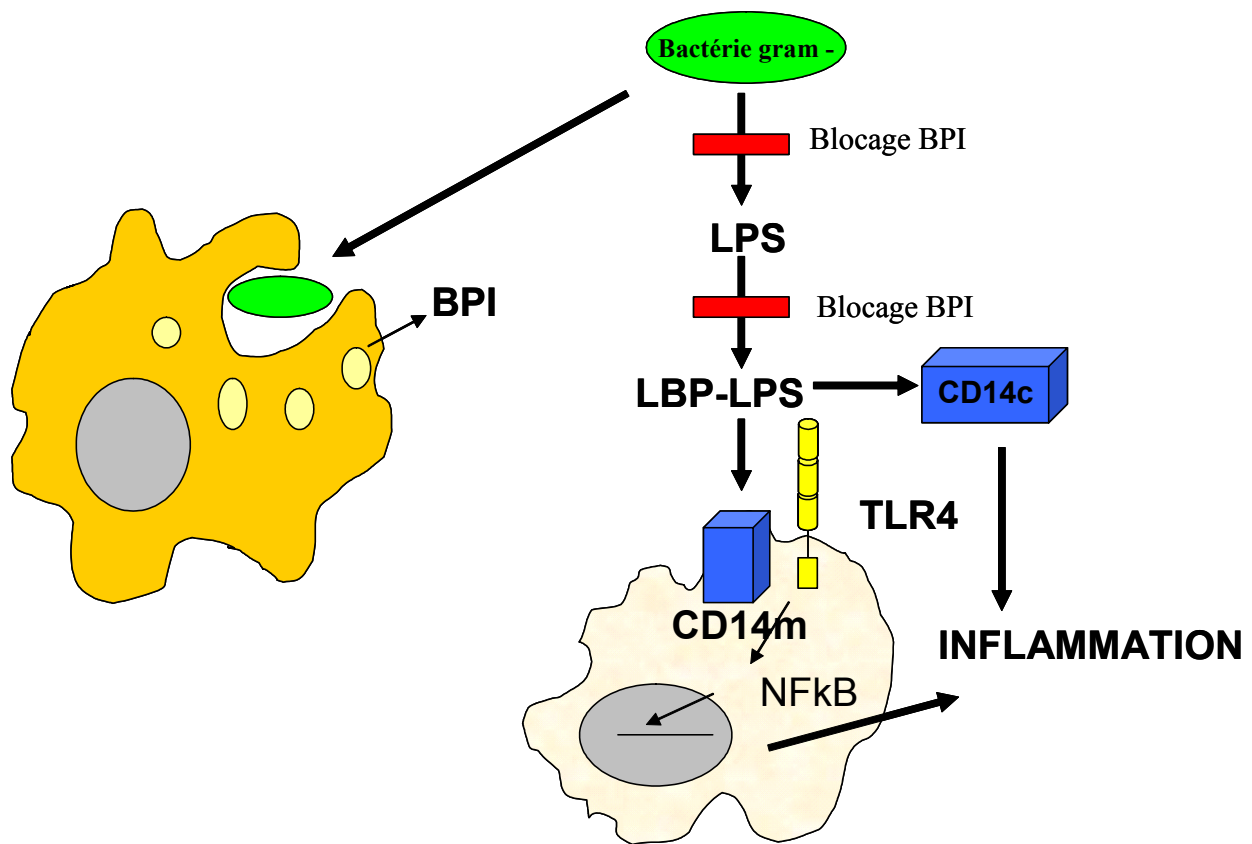
de la protéine non mutée (Juan *et al.*, 1995) (Stelter *et al.*, 1999). En ce qui concerne l'interaction entre CD14 et le récepteur TLR-4, les régions exigées dans cette association pour l'activation de NF- $\kappa$ B ont été définies par Muroi *et al.* (Muroi *et al.*, 2002) (Figure 5).

TLR4 est la première protéine homologue trouvée chez les mammifères, elle est homologue de la protéine Toll caractérisée chez la drosophile (Medzhitov and Janeway, 1997). Des études récentes ont révélé que l'identification LPS est complexe et implique TLR4, cependant, TLR4 seul n'est pas suffisant pour déclencher une réaction immunitaire totale. Les composants complémentaires du complexe d'identification LPS par TLR4 sont le CD14 et MD-2. Bien que TLR4 soit indispensable pour la signalisation de LPS, des études « *in vitro* » ont suggéré qu'une autre molécule était indispensable, il s'agit d'un polypeptide monomérique de 18.4 kDa dénommé MD-2. MD-2 est une glycoprotéine sécrétée de 18.4 kDa qui se lie au domaine extra cellulaire du récepteur TLR4, et qui est nécessaire pour l'activation par les LPS (Mullen *et al.*, 2003). MD-2 appartient à une grande famille de protéines qui a un domaine de reconnaissance de lipides, mais ne présente pas d'homologie avec le groupe de protéines transporteuses de lipides comme ceux de la famille des PLTP/LBP (Inohara and Nunez, 2002). Chez l'homme, une région de la MD-2 riche en résidus basiques et aromatiques contient plusieurs configurations communes à d'autres protéines de liaison aux LPS. Plus précisément, MD-2 contient une séquence (FSFKGIKFSKGGKYK) qui à la fois présente une liaison aux LPS et une activité antibactérienne (Mancek *et al.*, 2002).

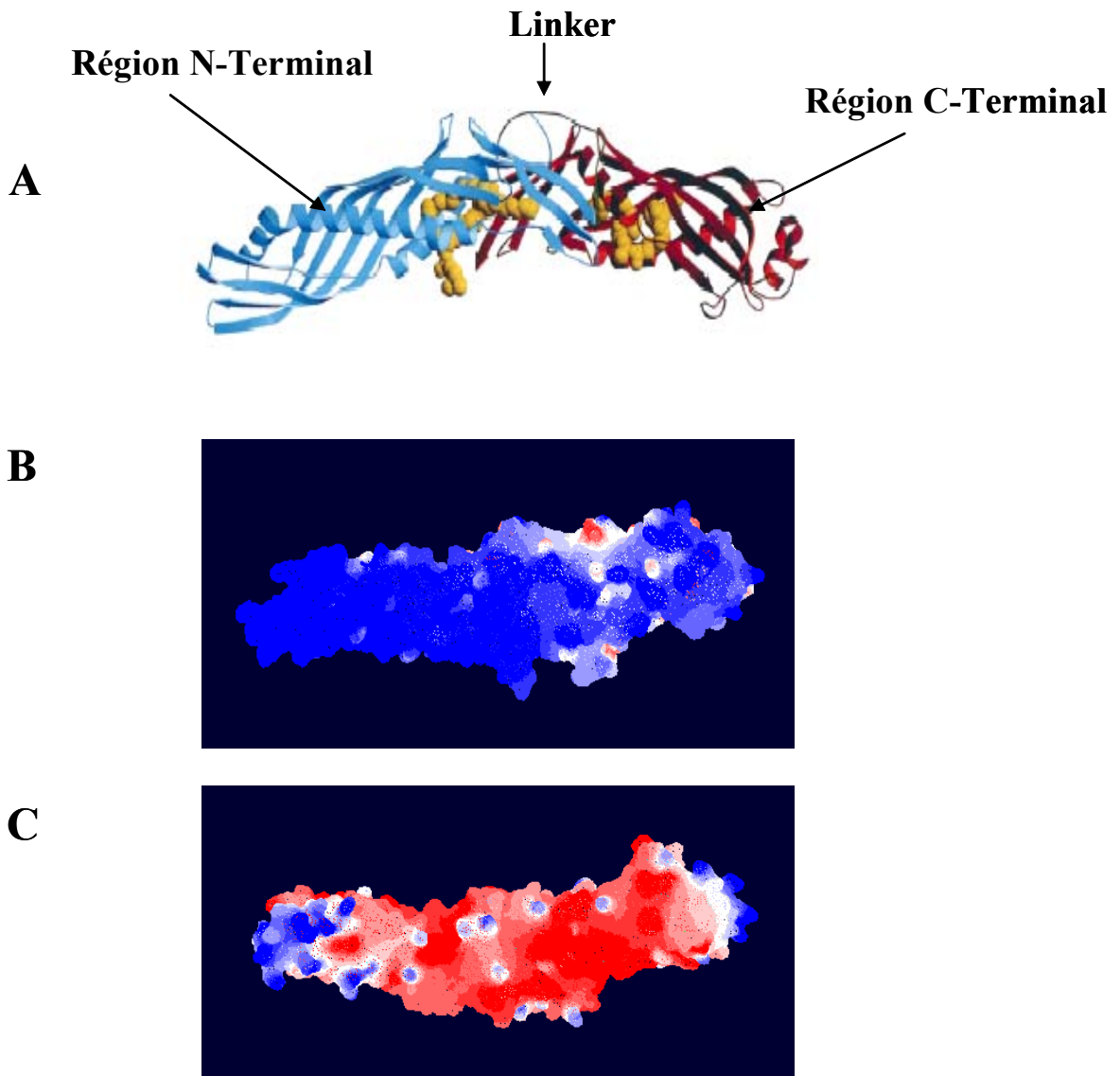
### 5.2.6. Protéines produites dans les granules neutrophiles de vertébrés.

**BPI (« Bactericidal/Permeability Increasing protein »)** est une protéine de 50 kDa qui a été isolée pour la première fois dans les granules azurophiles des neutrophiles par Weiss *et al.*, 1978. Ainsi BPI manifeste sélectivement des multiples activités contre les bactéries Gram(-): (1) activité cytotoxique par des effets séquentiels sur la membrane lipidique externe et interne. (2) opsonisation pour accroître la phagocytose par les neutrophiles et (3) neutralisation des LPS des bactéries ou endotoxines (Levy, 2000a). La structure 3D de BPI (456 résidus) a été déterminée par cristallographie (Beamer *et al.*, 1997). Ainsi la molécule de BPI, tout comme celle de LBP, a une structure en forme de «boomerang», qui comporte deux domaines similaires sensiblement de même taille. Les deux domaines N- et C-terminaux montrent une forme semblable, composés par des feuilletts  $\beta$  antiparallèles et deux hélices  $\alpha$

qui sont fortement repliées (Figure 6). Chaque domaine est associé par un « linker » riche en prolines. Le domaine N-terminal a deux résidus cystéines



**Figure 5. Schéma représentant le mécanisme d'interaction entre BPI, LBP et CD14 en réponse la présence des LPS de bactéries Gram(-).** Les LPS bactériens s'associent à une protéine plasmatique, la LBP, le complexe étant capturé par la molécule CD14, caractéristique de la surface des macrophages. L'interaction possible de CD14 avec TLR4 permet une telle signalisation. L'interaction entre CD14-TLR4 est complexe, aboutissant à l'activation d'un facteur de transcription, NF-κB, capable d'activer de nombreux gènes, tels ceux des cytokines participant à la réaction inflammatoire. BPI bloque cette réponse inflammatoire par association aux LPS ou empêchant la formation du complexe LBP - LPS.



**Figure 6. Structures tridimensionnelles de la protéine « Bactericidal/Permeability-Increasing protein » (BPI) humaine.** La vue (A) permet de visualiser la forme caractéristique de « boomerang » de BPI, composée de deux domaines similaires, en rouge et bleu, plus deux molécules de phosphatidylcholine, en jaune, qui sont placées dans des poches hydrophobiques de chaque domaine (Beamer *et al.*, 1998). (B) Potentiel électrostatique de surface de la protéine BPI humaine. La vue (C) permet de visualiser la distribution de charges de la protéine LBP humaine. La couleur bleue représente la distribution de charges positives et la couleur rouge les charges négatives. Les vues (B) et (C) ont été modélisées par le logiciel Swiss-PDBViewer. Les modèles sont orientés avec le domaine N-terminal vers la gauche.

très conservés dans la famille des protéines LTP/LPS binding et qui forment un pont disulfure reliant la structure feuillet  $\beta$  à une hélice  $\alpha$  (Beamer, 2003). Tandis que la région N-terminale de BPI est fortement cationique et contient les propriétés antibactérienne et de neutralisation des endotoxines, la région C-terminale joue un rôle dans l'opsonisation pour les bactéries Gram-(-) (Iovine *et al.*, 1997). BPI et LBP sont homologues à 44 % mais leurs activités biologiques sont différentes, alors que BPI est bactéricide pour les bactéries à Gram -, LBP n'a pas d'activité antimicrobienne. Cependant, à l'inverse de LBP, BPI ne peut servir d'intermédiaire pour la fixation de LPS à CD14 ou HDL. Plusieurs études ont montré que le domaine N-terminal de BPI présente comme LBP, les trois régions impliquées dans la reconnaissance des LPS (Gray *et al.*, 1989), (Little *et al.*, 1994).

**La Lactoferrine** est une protéine multifonctionnelle qui lie le fer, l'héparine, les protéoglycane, l'ADN, les oligodéoxynucléotides et les LPS (Appelmelk *et al.*, 1994). Cette molécule a été trouvée au niveau des muqueuses et dans des liquides biologiques. Elle est libérée par les granules des neutrophiles et les cellules de la muqueuse épithéliale en réponse à un stimulus inflammatoire (Masson *et al.*, 1969). Sur cette molécule, deux sites de fixation aux LPS ont été identifiés : une région située à l'extrémité N-terminale composée de quatre arginines (<sup>1</sup>GRRRR<sup>5</sup> la seconde se localisant dans la boucle (<sup>28</sup>RKVR<sup>31</sup>)) (Elass-Rochard *et al.*, 1998).

**L'héparin-binding protein**, est une protéine antibactérienne de 37 kDa (aussi appelée CAP37 ou azurocidine) produite par les granules des neutrophiles (Pereira, 1995). Cette protéine multifonctionnelle a un site de liaison à l'héparine et aux protéoglycane et une haute capacité de fixation au Lipide A (Brackett *et al.*, 1997).

**Le Lysozyme** est une protéine cationique contenue dans les granules des neutrophiles. Il a été caractérisé pour sa capacité de liaison aux LPS (Ohno and Morrison, 1989). Dans un premier temps, il se lie par interaction électrostatique au groupe phosphate du Lipide A, suivi par une interaction hydrophobe (Brandenburg *et al.*, 1998).

### **5.3. Les protéines impliquées dans la reconnaissance d'autres motifs structuraux.**

#### **5.3.1. Protéines de reconnaissance de peptidoglycane (PGRP).**

Les peptidoglycane (PGN) sont particulièrement abondants dans des bactéries Gram-(+), dans lesquelles ils représentent approximativement la moitié de la masse de la paroi

cellulaire. Dans des bactéries Gram(-), la couche de PGN est relativement mince et entoure la membrane cytoplasmique au-dessous du lipopolysaccharide (LPS). Les PGNs correspondent à des polymères alternant la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'acide N-acétylmuramique (MurNAc) avec un lien  $\beta(1-4)$ , lié transversalement par des peptides courts (Steiner, 2004). La partie glycane est constituée de chaînes linéaires où alternent la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique qui est l'ester lactique de la N-acétyl glucosamine. Ces résidus, sous la forme pyranoside, sont liés par des liaisons bêta-1,4. La longueur des chaînes est variable, elles sont constituées de 20 à 100 résidus de N-acétylglucosamine. Chez les staphylocoques, le carbone en position 6 de l'acide muramique est acétylé ce qui confère à ces bactéries une résistance au lysozyme.

Le nom de protéine de reconnaissance de PGNs a été d'abord utilisé par le groupe d'Ashida (Yoshida *et al.*, 1996). Ils ont découvert et purifié une protéine de 19kDa présente dans l'hémolymphe et la cuticule de *Bombyx mori*, qui lie des bactéries Gram (+) et les PGN, cette substance est capable d'activer la cascade de prophénoloxidase (Yoshida *et al.*, 1996). Chez les insectes, sur la base des structures attendues des produits du gène, les PGRPs ont été regroupées selon leur taille en deux classes : PGRPS court (PGRP-S), il s'agit de petites protéines extracellulaires (19-20 kDa) semblables à l'original PGRP ; PGRP long (PGRP-L), dont les transcrits codent des protéines intracellulaires ou transmembranaires avec des domaines extra ou intracellulaires (Dziarski, 2004). Des PGRPs ont été aussi décrits chez *D. melanogaster* et *Anopheles gambiae* (Werner *et al.*, 2000) (Liu *et al.*, 2001).

Les PGRPs sont fortement conservés depuis les insectes jusqu'aux mammifères, ils lient les PGN avec une forte affinité et sont importants pour la défense des organismes contre les infections bactériennes. Chez la drosophile, deux PGRPs activent deux voies de signalisation différentes qui déclenchent la production de peptides antimicrobiens (Gobert *et al.*, 2003).

Chez les invertébrés marins, des protéines de reconnaissance des motifs  $\beta$ -1,3-glucans présents à la surface des cellules fongiques, ont été caractérisées. Ces substances dénommées BGBP («  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein ») ont été décrites chez la limule (Seki *et al.*, 1994), l'écrevisse (Cerenius *et al.*, 1994) et plus récemment chez les crevettes *Litopenaeus vannamei* (Romo-Figueroa *et al.*, 2004) et *Penaeus monodon* (Sritunyalucksana *et al.*, 2002). La BGBP de limule, appelée aussi facteur G, contient deux sous-unités, l'une comprenant un domaine glucanase et l'autre un domaine sérine protéase. Après liaison de son ligand, le facteur G déclenche une cascade protéolytique conduisant à la formation d'un gel dont le rôle est de limiter l'infection.

### 5.3.2. Lectines

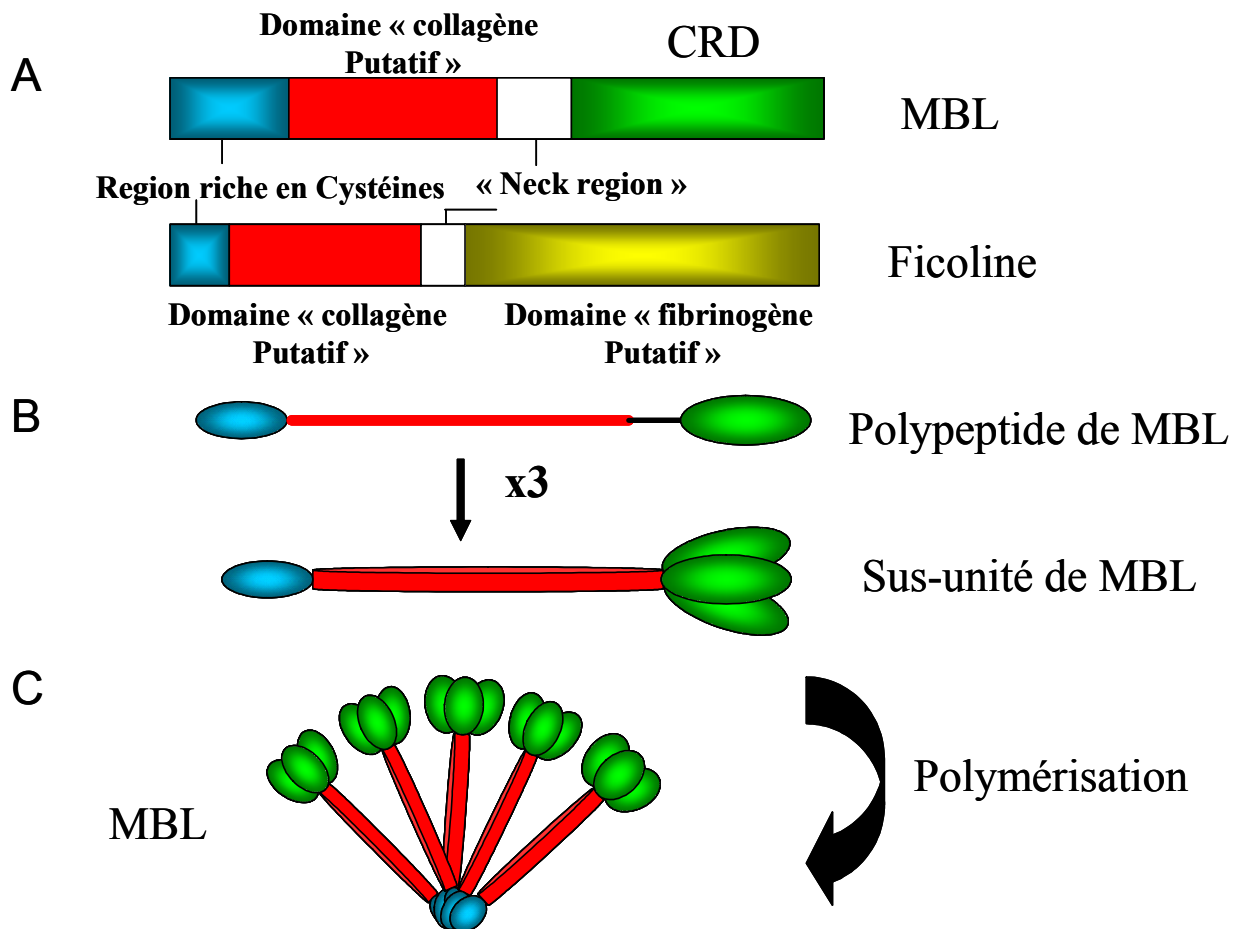
Les lectines possèdent un large spectre de reconnaissance. Ce sont des glycoprotéines capables de se lier aux composés glucidiques (hydrates de carbone) présents dans différents microorganismes. Elles possèdent des propriétés opsonisantes, d'agglutination permettant d'immobiliser des pathogènes et d'être impliquées dans les mécanismes cellulaires de phagocytose ou d'encapsulation. Elles sont ubiquitaires dans le règne vivant.

**Les pentraxines** sont dénommées ainsi en raison de leur structure moléculaire cyclique pentamérique. Elles comprennent la CRP « C Reactive Protein » et la SAP « Serum Amyloid Protein » synthétisées dans le foie des vertébrés au cours de la réaction inflammatoire (Szalai *et al.*, 1995), (Noursadeghi *et al.*, 2000). La CRP possède les propriétés de liaison aux polysaccharides microbiens, elle induit la phagocytose, et a la propriété d'activer la cascade du Complément. Des mollusques et des arthropodes possèdent des molécules homologues aux CRPs (Mandal *et al.*, 1991). Chez les arthropodes, les limules *T. tridentatus* et *L. polyphemus*, les domaines fonctionnels des CRPs sont conservés mais la structure tertiaire semble être différente de celle des vertébrés (Liu *et al.*, 1994) (Shrive *et al.*, 1999). Outre une fonction opsonisante des lectines, chez *T. tridentatus*, les CRPs possèdent également une fonction cytolytique (Iwaki *et al.*, 1999).

Les lectines de type **Ficoline** et « **Manose-Binding Lectin** » (**MBL**) sont des récepteurs de reconnaissance des agents infectieux, qui déclenchent l'activation de la voie alternative des lectines, par l'activation de diverses serines protéases MASP « MBL-Associated Serines Protéases », qui sont capables de cliver des composants de la cascade du complément (Fujita *et al.*, 2004). D'autres lectines, les galectines ont également été identifiées comme des activateurs du complément. La MBL et la ficoline sont des oligomères constituées par des sous-unités structurales identiques, chaque sous-unité est composée respectivement de trois polypeptides de 32kDa et 35 kDa respectivement. MBL et ficoline contient une région N-terminale riche en cystéines, un domaine collagène putatif, cependant MBL montre un domaine CRD « Carbohydrate Recognition Domain » dans son domaine C-terminal. Alors que dans les protéines de type ficoline l'extrémité C-terminale montre un domaine similaire au fibrinogène « Fibrinogen-like domain » (Figure 7).

Des protéines de type MBL ont été identifiées chez les tuniciers (*Clavelina picta*). Elles possèdent des séquences nucléiques et protéiques fortement similaires aux séquences de vertébrés (Vasta *et al.*, 1999), (Nonaka, 2001).. Ces protéines semblent être capables de





**Figure 7. Domaine et structure oligomérique des protéines « Mannose-Binding-Lectine » (MBL) et « Ficoline ».** **A.** Chaque polypeptide, MBL et Ficoline, présente une région N-terminale riche en cystéines, un domaine collagène et une région « connective ». MBL possède dans son extrémité C-terminale un domaine CRD « Carbohydrate Recognition Domain ». La Ficoline possède en plus un domaine fibrinogène putatif. **B.** Une sous-unité de MBL est composée de trois polypeptides identiques de 32 kDa. **C.** La protéine MBL forme différentes tailles d'oligomères, comme par exemple une structure pentamérique.

reconnaître et de se lier aux composants des membranes microbiennes, mais auraient un rôle secondaire en se liant aux composants de ses propres tissus, ayant ainsi deux fonctions, d'immobilisation des pathogènes pour leur destruction et de réparation des lésions tissulaires. Récemment, chez l'ascidie solitaire *Halocynthia roretzi*, une protéine de liaison aux polysaccharides a été purifiée, cependant elle se lie préférentiellement au glucose et non à la mannose ou GlcNAc, elle a été désignée de ce fait comme une « Glucose-Binding Lectin » (GBL). L'analyse de sa séquence a révélé que la moitié carboxy-terminale contient un domaine d'identification d'hydrate de carbone (CRD) qui est homologue au C-type lectine, mais il manque d'un domaine semblable au collagène qui est présent dans MBL des mammifères (Sekine *et al.*, 2001), (Fujita *et al.*, 2004).

Dans les ficolines les fonctions du domaine putatif dévolues au fibrinogène, ne sont pas entièrement comprises (Figure 7). Cependant, les nombreuses observations mettent en évidence que ce domaine est capable de lier les hydrates de carbone. Récemment, ont été obtenus quatre ADNc dans l'ascidie solitaire *H. roretzi* (Kenjo *et al.*, 2001). Leurs séquences en acides aminés déduits des ficolines ont révélé la conservation des domaines putatifs de collagène et du fibrinogène. Le domaine putatif du fibrinogène de l'ascidie montre une identité à 47-62 % avec les ficolines de mammifères. A l'heure actuelle, on ne sait pas si ces ficolines sont associés au MASPs et si elles peuvent activer le complément. Des observations indiquent que les ficolines aussi bien que GBL, agissent comme des molécules d'identification du système du complément chez l'ascidie et d'une façon semblable à la voie de lectines des mammifères (Fujita *et al.*, 2004).

**Les galectines** constituent une autre famille de lectines. Elles forment un groupe de lectines animales caractérisées par leur spécificité pour les sucres de type  $\beta$ -galactosides (Cooper and Barondes, 1999). Il existe différentes galectines, classées en fonction de leur structure allant de polypeptides contenant un CRD pouvant former des homodimères (galectines -1 et -2) ou des monomères (-5,-7,-10). Leur implication dans l'immunité est parfois encore mal définie. Chez les vertébrés, les galectines pourraient être impliqués dans une variété des processus cellulaires déterminant le destin de la cellule, l'interaction entre les cellules, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Rabinovich and Gruppi, 2005).

Dans le cas des invertébrés, chez *C. elegans* deux galectines ont été isolées et montrent la capacité de liaison aux galactosides (Arata *et al.*, 1997). En ce qui concerne les insectes, chez *D. melanogaster* et *A. gambiae* ont été caractérisées plusieurs séquences qui montrent

des homologues avec les galectines (Pace and Baum, 2004). La première galectine caractérisée chez un insecte correspond à une protéine de taille de 58 kDa capable de lier des sucres (Pace *et al.*, 2002). La séquence de l'acide aminé a montré des similitudes avec d'autres galectines d'invertébrés et de vertébrés et en plus elle contient les acides aminés (motif consensus : HNRVNWER) qui sont cruciaux pour lier les sucres de type  $\beta$ -galactosides (Pace and Baum, 2004).

Chez l'huître *C. gigas*, deux lectines (gigalin-E et H) ont été caractérisées possédant des propriétés d'agglutination de bactéries opportunistes *V. anguillarum*. Les **gigalines** possèdent une activité opsonisante accrue *in vivo* en réponse à des injections bactériennes suggérant son implication dans l'élimination des pathogènes (Olafsen *et al.*, 1992). Enfin, des séquences de ficoline (BQ426875) et quatre séquences de galectine (BQ426390) ont été identifiées dans les banques ESTs d'hémocytes de *C. gigas*. Une nette augmentation de l'abondance de transcrits de galectine a pu être mise en évidence dans les hémocytes d'huîtres en réponse à une injection de bactéries (Gueguen *et al.*, 2003).

## **6. La communication cellulaire et l'amplification de la réponse immunitaire.**

L'adhésion cellulaire est essentielle dans l'immunité des invertébrés, comme par exemple pendant la réponse d'encapsulation et la formation des nodules. Dans la réponse d'encapsulation, certaines catégories d'hémocytes sont organisées en couches successives autour du corps étranger. Comme les hémocytes circulent librement dans l'hémolymphe, ceux qui identifient la cible (non soi) doivent changer de morphologie et passer d'une cellule de type non-adhésif à une cellule adhésive (Beutler, 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires spécifiques qui contrôlent l'activité des hémocytes pendant la formation de la capsule sont encore inexplicables.

### **6.1. Contact cellulaire**

Avant que les micro organismes puissent être phagocytés et détruits, les cellules immunocompétentes circulantes ou tissulaires doivent être capables d'atteindre le tissu infecté. Ainsi le recrutement de leucocytes au site d'inflammation entraîne une cascade d'événements cellulaires parmi lesquels : un attachement initial faible (margination), roulement des leucocytes, adhérence suivie d'une migration trans-endothéliale (diapédèse) et chimiotactisme positif des cellules vers le site d'infection (Springer, 1994).

Chez les vertébrés, les membres de la famille des **sélectines** correspondent à des molécules d'adhérence qui sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et agissent réciproquement avec des glycoprotéines sur les leucocytes pour obtenir par médiation la phase précoce d'attachement, c'est-à-dire les interactions adhésives faibles (Lawrence and Springer, 1991). Par contre, les membres de la sous-famille des **intégrines  $\beta 2$**  dans les leucocytes, aussi bien que d'autres sous-familles des intégrines, reconnaissent leurs ligands du type CAM et une adhérence ferme de leucocytes vis-à-vis de la cellule endothéliale est réalisée (Beutler, 2004).

La faible adhérence initiale apportée par les leucocytes dans l'environnement immédiat d'une infection locale doit être renforcée pour la sécrétion de diverses cytokines ou chimio-attractants produits par les cellules endothéliales, comme l'interleukine 8 (IL-8) et le facteur activant les plaquettes sanguines (PAF). Ceux-ci transforment des signaux par leurs récepteurs couplés de protéine G qui activent l'intégrine pour inciter l'adhésion du leucocyte à la cellule endothéliale (Laudanna *et al.*, 2002). Ainsi, l'intégrine  $\alpha M\beta 2$  peut reconnaître le fibrinogène déposé sur la surface endothéliale ou aux sites d'inflammation pour promouvoir l'accumulation de leucocytes (Languino *et al.*, 1993).

Chez les invertébrés, une sélectine a été clonée chez *B. glabrata*, elle correspond à une protéine de masse moléculaire apparente de 36-kDa (BgSel) . La partie C-terminale de la protéine montre un domaine lectine putatif. La protéine BgSel a pu être détectée par immunocytochimie au niveau des hémocytes et dans les cellules embryonnaires de *B. glabrata*, mais la fonction de cette sélectine reste encore à déterminer (Duclermortier *et al.*, 1999).

## 6.2. Molécules d'adhésion cellulaire

Plusieurs protéines solubles ayant la capacité de s'associer à des récepteurs de membrane de type **intégrines** ont été décrites chez les invertébrés (Burke, 1999). Ce phénomène d'adhésion est associé à la présence dans les séquences protéiques d'un motif RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp). C'est le cas de la BGBP qui en s'associant aux  $\beta$ -1,3-glucanes forme un complexe capable de se lier à la surface des hémocytes elle est ainsi reconnue par des récepteurs aux facteurs d'adhésion cellulaires tels que les intégrines (Sonnenberg, 1993). Chez *P. leniusculus*, la présence d'une intégrine- $\beta$  a été mise en évidence au niveau de la membrane des hémocytes (Holmblad *et al.*, 1997), mais son interaction avec

la BGBP n'a pas été démontrée. Les mécanismes d'adhésion cellulaire sont des éléments clés de la réponse immunitaire (Johansson, 1999). Parmi les facteurs d'adhésion les mieux caractérisés, il faut citer la péroxinectine qui, chez l'écrevisse, est l'un des facteurs libérés par exocytose des cellules semi-granuleuses et granuleuses après activation du système proPO (Johansson *et al.*, 1995). La péroxinectine présente des activités de peroxydase, d'adhésion cellulaire et d'opsonisation. Elle agit comme facteur d'activation de dégranulation et d'encapsulation (Johansson, 1999). La péroxinectine présente dans sa séquence un motif KGD. Ainsi, une fois libérée et activée, la péroxinectine pourrait adhérer via les intégrines à la surface des hémocytes et les stimuler induisant la formation de capsules ou de nodules par les cellules semi-granuleuses et granuleuses, ou activant la phagocytose des cellules hyalines (Kobayashi *et al.*, 1990).

D'autres protéines comme la «  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein » (Ochiai and Ashida, 2000) et une LBP (BmLBP) appartenant à la superfamille des lectines de type C (Koizumi *et al.*, 1999) chez *B. mori* possède des motifs KGD. Chez un autre insecte (Lépidoptère) *Hyphantria cunea*, une protéine de type lectine, possède également un motif KGD (Shin *et al.*, 2000). Enfin, une galectine isolée chez le nématode parasite *Haemonchus contortus* contient également un motif KGD (Newlands *et al.*, 1999).

Les **intégrines** sont des récepteurs impliqués dans le contact cellule-cellule et les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire. Les intégrines correspondent à des protéines hétérodimériques qui comprennent une association non covalente entre deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Chez des vertébrés, les intégrines sont engagées dans plusieurs fonctions de système immunitaire, y compris l'adhérence des leucocytes aux protéines de la matrice extracellulaire et l'attache des lymphocytes T cytotoxiques aux cellules cibles (Hughes *et al.*, 2001). Les intégrines agissent non seulement comme les médiateurs simples d'adhésion cellulaire, mais elles peuvent aussi transmettre des signaux à travers les membranes. Les intégrines peuvent fonctionner comme des récepteurs capables de moduler la croissance et la mobilité des cellules ainsi que l'expression de gènes (Juliano *et al.*, 2004). Ces mécanismes de signalisation intracellulaire peuvent être impliqués dans la prolifération cellulaire (Schwartz and Assoian, 2001). Chez les mollusques, des séquences présentant de fortes homologues avec les sous-unités  $\beta$  des intégrines ont été identifiées respectivement chez *B. glabrata* (Davids *et al.*, 1999) et *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003), mais aucune activité fonctionnelle n'a été démontrée jusqu'à présent.

## 7. Effecteurs de la réponse antimicrobienne.

### 7.1. Les inhibiteurs de protéases

Des nombreuses molécules de la phase aiguë appartiennent à la famille des inhibiteurs de protéases et sont fortement conservées chez les invertébrés. Un des rôles de ces inhibiteurs est d'éviter l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes (composées en partie de protéases à sérines) qui génèrent des composés toxiques (quinones, complexe d'attaque membranaire) pouvant conduire à des dommages tissulaires pour l'hôte. D'autre part, ces inhibiteurs agissent contre les protéases de bactéries, procaryotes et protozoaires pathogènes. Ces protéases constituent de véritables facteurs de virulence permettant aux pathogènes de s'introduire dans l'hôte et d'y proliférer (Lepore *et al.*, 1996).

Parmi les inhibiteurs de protéases les plus connus, l' $\alpha$ 2-macroglobuline a la propriété d'inhiber la plupart des protéases en raison de son mode d'action bien particulier de « piégeage » des protéases (Hibbetts *et al.*, 1999). Sous l'action d'une protéase, la conformation de l' $\alpha$ 2-macroglobuline change, exposant un domaine servant de ligand aux récepteurs des phagocytes. Chez la limule *L. polyphemus*, l' $\alpha$ 2-macroglobuline représente un composant majeur de l'hémolymphe ayant une fonction inhibitrice homologue à celle des molécules de vertébrés (Kawabata and Tsuda, 2002). Cet inhibiteur de protéases a également été cloné, purifié et son activité détectée chez divers mollusques, comme *B. glabrata* (Bender and Bayne, 1996), *Helix pomatia* (Yigzaw *et al.*, 2001) mais également chez le clam *Chlamys farreri* (Ma *et al.*, 2005). Chez *C. gigas*, des ADNc codant une  $\alpha$ 2-macroglobuline ainsi que son récepteur ont été identifiés par approche ESTs exprimés dans les hémocytes de l'huître (Gueguen *et al.*, 2003).

Les **serpines** « serine-protease inhibitor » constituent une large famille d'inhibiteurs de protéases à sérines connus chez les vertébrés. Elles participent notamment à la régulation des protéases à sérines au cours de l'inflammation, de la coagulation, et de l'activation du complément. La présence de serpines a été décrite chez plusieurs invertébrés (*C. elegans*, *Tachyplexus tridentatus*, et *Drosophila sp.*) par identification biochimique, par des programmes d'EST ou par des séquençages de génomes (Silverman *et al.*, 2001). Chez la limule des serpines hémocytaires jouent également un rôle important dans la régulation des cascades protéolytiques de type coagulation (Miura *et al.*, 1994). Chez *Manduca sexta*, deux types de serpines (4 et 5) sont impliquées dans la régulation de l'activation de la cascade prophénoloxydase (Tong and Kanost, 2005). Une séquence de serpine a pu être identifiée

dans la base d'ESTs d'hémocytes de *C. gigas* mais sa fonction n'a pas encore été définie à ce jour (Gueguen *et al.*, 2003).

Les **inhibiteurs de métalloprotéases** (TIMP) ont pour rôle principal de réguler l'activité de métalloprotéases de la matrice extracellulaire et de ce fait d'intervenir dans la réparation tissulaire MMPs, « Matrix Metalloproteinases » (Nagase and Woessner, 1999). Chez les invertébrés, les études menées chez les insectes (*Galleria mellonella*) montrent que les TIMPs peuvent agir comme des effecteurs directs des mécanismes de défense, en inhibant les métalloprotéases permettant aux pathogènes de pénétrer et de proliférer chez l'hôte (Lepore *et al.*, 1996). Chez l'huître *C. gigas*, l'abondance des transcrits de *Cg-Timp* est fortement accrue dans des hémocytes d'huîtres en réponse à des injections de bactéries mais surtout en réponse à des injections de surnageants de *Vibrio* pathogènes suggérant bien une implication dans la réponse de l'huître à l'infection bactérienne (Montagnani *et al.*, 2001).

## 7.2. Peptides et protéines antimicrobiennes

Les peptides antimicrobiens, effecteurs de l'immunité innée, sont conservés au cours de l'évolution et largement répandus dans tous les phyla du règne vivant, incluant les vertébrés, invertébrés (Bulet *et al.*, 2004), les plantes (Castro and Fontes, 2005) et les microorganismes (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2002). Ces effecteurs immunitaires présentent une grande diversité structurale, d'activités biologiques, de fonctions ainsi que dans leur localisation tissulaire et leur expression. Les peptides antimicrobiens sont en général des molécules cationiques et amphipatiques codés par des gènes, mais des résultats récents révèlent que des peptides peuvent résulter de l'hydrolyse de macro-molécules présentant des fonctions différentes.

Plus de 1000 peptides antimicrobiens ont été décrits à ce jour au niveau de leur structure primaire (Bulet *et al.*, 2004). Ces effecteurs sont classés en trois groupes majeurs : (1) les peptides linéaires formant des hélices amphipatiques  $\alpha$  ; (2) les peptides cycliques contenant des résidus cystéine impliqués dans des ponts disulfures avec pour représentants majeurs les défensines qui sont présentes dans de nombreux groupes animaux et végétaux; (3) les peptides qui sont caractérisés par une surreprésentation en certains acides aminés, comme les proline, arginine, glycine ou histidine.

La compréhension de la réponse immunitaire modulée par les peptides antimicrobiens a largement bénéficié des travaux réalisés chez les insectes et plus particulièrement chez la drosophile sur la régulation des gènes codant des peptides antimicrobiens (Leclerc and

Reichhart, 2004). Cependant, selon les espèces étudiées, les mécanismes de régulation de l'expression, de synthèse et de sécrétion de ces molécules ou encore leur localisation apparaissent très diversifiés. La production de peptides antimicrobiens peut être assurée par des cellules tissulaires ou circulantes, l'expression des gènes codant ces effecteurs pouvant être induite ou constitutive. Les peptides sont soit exprimés et libérés immédiatement après leur synthèse, soit stockés et libérés par exocytose dans l'environnement immédiat des cellules productrices en réponse à un stimulus, ou encore peuvent participer à une réponse systémique.

### 7.2.1 Les peptides antimicrobiens des vertébrés.

Les peptides antimicrobiens circulants chez les vertébrés sont produits par les neutrophiles, cellules phagocytaires circulantes les plus abondantes dans le sang. Les neutrophiles possèdent des mécanismes microbicides qualifiés d'oxydatifs ou non oxydatifs. Les mécanismes indépendants de l'oxygène sont médiés par des protéines microbicides stockées dans leurs granules et qui sont déversées dans les vacuoles de phagocytose après ingestion de microorganismes. Parmi les molécules stockées dans les granules des neutrophiles, nous pouvons citer les lysozymes, les cathepsines G, les azurocidines, autres polypeptides, et peptides antimicrobiens (défensines et cathélicidines) (pour revue Ganz and Lehrer, 1998). Les **défensines**, dénommées chez l'homme HNP « Human Neutrophil Peptides » sont au nombre de 4 (HNP1-4). Il s'agit de peptides cationiques de 3-4 kDa, présentant des activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries, des champignons et des virus mais également des activités cytotoxiques (Ganz *et al.*, 1990). Leur mode d'action implique des interactions électrostatiques avec les parties polaires des phospholipides membranaires, suivies d'une insertion et d'une perméabilisation des membranes des cellules cibles pour former des canaux (Kagan *et al.*, 1994). Il a été démontré que cette perméabilisation ne conduit pas forcément à la mort cellulaire, à moins que les défensines ne pénètrent à l'intérieur des cellules cibles en provoquant des dégâts intracellulaires (Ganz and Lehrer, 1999). Ces molécules antimicrobiennes participent aux mécanismes microbicides en agissant à l'intérieur des phagolysosomes ou dans leur environnement immédiat après exocytose contrôlée. Les défensines et cathélicidines peuvent agir de façon synergique ou avec d'autres protéines telles que les BPI comme cité précédemment (Levy, 2000b). Cependant, les défensines libérées à l'extérieur des cellules perdent leur activité antimicrobienne du fait de concentrations élevées en NaCl et en cations bivalents (Ganz and Weiss, 1997). Les



défensines présentent diverses fonctions. Libérées dans le milieu, les défensines- $\alpha$  présentent des propriétés de chimiotactisme vis-à-vis des monocytes et des lymphocytes ; elles favorisent la phagocytose et activent la réponse adaptative via la production de IFN $\gamma$  et d'IL-5 par les lymphocytes T (Bals, 2000). La présence de défensines libres dans le plasma serait le reflet d'un état d'activation des neutrophiles et donc d'un état inflammatoire. Dans le milieu extérieur, les défensines peuvent se complexer à l' $\alpha$ 2-macroglobuline conduisant à leur élimination de la circulation sanguine (Panyutich and Ganz, 1991), mais elles peuvent également se lier à des serpinines avec lesquelles elles s'inactivent mutuellement (Panyutich *et al.*, 1995).

Deux autres types de défensines sont connus chez les vertébrés. Les défensines- $\alpha$  et les défensines- $\beta$  ont été caractérisées à l'origine chez les leucocytes bovins et leur expression a été reportée à posteriori dans les épithélia de différents tissus (pour revue voir Periathamby and Dentino, 2002). Les défensines- $\alpha$  sont exprimées dans les cellules de Paneth de l'intestin moyen, les cellules épithéliales et le tractus urinogénital, et les défensines- $\beta$  sont exprimées au niveau des tractus génital et respiratoire, au niveau de la peau, des reins et dans les surfaces épithéliales externes et internes du corps humain (Bals, 2000). Les défensines- $\alpha$  (HD-5 et HD-6 ; HD pour défensine humaine) (Ouellette, 1999) sont exprimées et stockées dans les cellules de Paneth, cellules granuleuses du tissu épithélial (cryptes de Lieberkühn) de l'intestin moyen des mammifères (Ouellette, 1999). Ces défensines sont appelées cryptdines chez la souris (Ouellette and Selsted, 1996). Les cryptdines sont synthétisées et stockées sous forme de précurseurs dans les cellules de Paneth. L'acquisition de l'activité antimicrobienne s'effectue lors de la maturation du propeptide. Le clivage conduisant à la libération du peptide actif est déclenché par la présence de LPS bactérien et s'effectue pendant ou après la sécrétion par exocytose du peptide dans la lumière de l'intestin (Bevins *et al.*, 1999). Libérés dans l'intestin, ces peptides assurent une fonction antimicrobienne.

Les mécanismes d'expression des défensines  $\beta$  produites dans les tissus semblent différents de ceux rencontrés au niveau des neutrophiles. Chez l'homme, l'expression des gènes de h $\beta$ D-1 « human  $\beta$  défensin » semble constitutive. Par contre, l'expression de gènes codant la h $\beta$ D-2 dans différents épithélia apparaît régulée transcriptionnellement par des facteurs de transcription de la famille NF-kB (pour revue voir Bals, 2000). Ainsi, les LPS, microorganismes et médiateurs inflammatoires (TNF  $\alpha$  et Interleukines IL-1 $\alpha$  et I-1 $\beta$ ) peuvent induire l'expression des gènes codant les h $\beta$ D-2 d'origine tissulaire (Bals, 2000), (Periathamby and Dentino, 2002). La sur-expression de h $\beta$ D-2 dans les épithélia des vertébrés

en présence de microorganismes et des médiateurs inflammatoires souligne le rôle de ces molécules dans la défense de l'hôte contre les microorganismes au niveau de sites critiques de confrontation.

Enfin il faut aussi citer les **cathélicidines** qui forment un groupe de peptides antimicrobiens structurellement diversifiés, caractérisés exclusivement chez les mammifères. Les cathélicidines correspondent à la partie C-terminale active d'un précurseur stocké dans les granules spécifiques des neutrophiles alors que les défensines sont localisées dans les granules azurophiles. Outre la partie cathélicidine, les précurseurs comportent une région N-terminale de 128-143 acides aminés nommée cathéline qui est le seul point commun à toutes les cathélicidines connues chez diverses espèces, et qui n'est pas microbicide (pour revue voir Zanetti *et al.*, 1995). Les cathélicidines peuvent agir intracellulairement dans les phagolysosomes après maturation par l'élastase contenue dans les granules azurophiles ou dans l'environnement immédiat des cellules productrices. Les activités microbicides des cathélicidines sont très diverses, reflétant probablement la diversité des molécules du groupe: elles sont antibactériennes, antifongiques et antivirales (pour revue voir Ramanathan *et al.*, 2002). Comme les défensines, les cathélicidines qui sont libérées à l'extérieur des neutrophiles peuvent assurer des fonctions autres qu'antimicrobiennes, comme le chimiotactisme pour les lymphocytes T, l'interaction avec les LPS et l'inhibition des réactions inflammatoires. Les cathélicidines interviendraient dans les processus de cicatrisation et de réparation tissulaire (Ramanathan *et al.*, 2002).

### **7.2.2 Les peptides antimicrobiens des insectes**

La grande majorité des peptides décrits proviennent des insectes (Tossi and Sandri, 2002, Bulet *et al.*, 2004;), et le modèle *Drosophila* a été particulièrement étudié, conduisant à la caractérisation de sept groupes de peptides antimicrobiens. Ces peptides sont produits par le corps gras (équivalent fonctionnel du foie des vertébrés) et libérés dans la circulation suite à une stimulation bactérienne, ce qui constitue la réponse humorale systémique des insectes ou réponse de phase aiguë (Hoffmann and Reichhart, 1997). Ces peptides antimicrobiens sont également produits au niveau de différents organes (glandes salivaires, intestin, organes reproducteurs), au niveau de cellules circulantes, ou être régulés localement sur les surfaces épithéliales de plusieurs tissus (Tzou *et al.*, 2000), comme décrits dans les épithélia des mammifères.

Le corps gras est le principal centre de production d'une batterie de peptides antimicrobiens, comme la diptéricine, la cécropine, l'attacine, la drosocine, la défensine, la drosomycine, et la metchnikowine (Hoffmann and Reichhart, 1997). Les 5 premiers présentent des activités antibactériennes, la drosomycine présente des activités antifongiques et la metchnikowine révèle à la fois des activités antibactériennes et antifongiques (Bulet *et al.*, 1999). La réponse humorale antimicrobienne de ces peptides est contrôlée au niveau transcriptionnel (Hoffmann and Reichhart, 2002). Chez les animaux non stimulés, les gènes codant ces peptides antimicrobiens sont silencieux ou très faiblement exprimés. Des infections déclenchent leur transcription conduisant à une augmentation rapide et généralement transitoire des ARNm codant les peptides antimicrobiens (Hoffmann and Reichhart, 2002). Chez les insectes, il est admis que les peptides sont immédiatement «maturés» et sécrétés dans l'hémolymphe par les cellules productrices. La plupart de ces peptides sont produits sous forme de précurseurs composés d'un peptide signal, suivis d'une pro-région anionique et d'une partie correspondant au peptide mature. Toutefois, il existe des cas rares comme pour la diptéricine où le précurseur est dépourvu de pro-région (Reichhart *et al.*, 1989) ou pour la drosomycine où la pro-région est placée en position carboxy-terminale (Bulet *et al.*, 1993). La caractérisation des gènes codant ces peptides a permis d'identifier dans leurs séquences promotrices des motifs GATA et  $\kappa$ B, séquences cis-régulatrices présentes dans des promoteurs de gènes induits au cours de la réponse immunitaire des vertébrés (Hoffmann and Reichhart, 1997), (Meister *et al.*, 1997). L'utilisation de souches mutantes de drosophile et des expériences de transgénèse ont permis d'établir la présence d'au moins deux voies de régulation transcriptionnelle : Toll et Imd. La voie Toll qui participe à la mise en place de l'axe dorso-ventral lors du développement précoce de la drosophile, contrôle également la régulation de nombreux gènes de la réponse immunitaire humorale (Meister *et al.*, 1997). Cette voie de transduction du signal contrôle la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram (+) et induit notamment l'expression de peptides antifongiques (gène de la drosomycine) (Hoffmann and Reichhart, 2002). La deuxième voie Imd, dont 6 composants ont été récemment identifiés (Tzou *et al.*, 2002) est impliquée dans l'expression de la diptéricine, cécropine, drosocine, attacine et gouverne les réactions de défense vis-à-vis des infections bactériennes à Gram (-). Par ailleurs, ces deux voies présentent des similitudes avec les cascades TLR «Toll like receptor» et TNF «Tumor necrosis factor» qui régulent l'activité de facteurs de transcription de la famille NF- $\kappa$ B chez les vertébrés, ce qui suggère la conservation des voies de signalisation de la réponse immunitaire au cours de l'évolution (Hoffmann and Reichhart, 2002).

Alors que le corps gras est le principal tissu producteur de peptides, les épithélia d'insectes sont également impliqués dans l'expression de peptides antimicrobiens lorsqu'ils sont exposés à des microorganismes (Ferrandon *et al.*, 1997) (Richman *et al.*, 1996). Toutefois, à la différence de ceux produits par le corps gras, les peptides exprimés par les épithélia sont relativement moins nombreux. L'utilisation de drosophiles transgéniques a permis de démontrer que tous les épithélia expriment de façon tissu-spécifique au moins deux peptides présentant des spectres d'activités antimicrobiennes complémentaires. Ainsi, dans la région orale des larves et des adultes, la défensine est co-exprimée avec la metchnikowine alors qu'au niveau du tractus respiratoire, la drosocine et le peptide antifongique, drosomycine, sont co-exprimés (Tzou *et al.*, 2000). Le contrôle de l'expression tissu-spécifique de ces gènes dans les épithélia reste encore à élucider. En effet, l'inductibilité des gènes codant les peptides dans le tractus digestif est apparue limitée aux parties antérieures de l'intestin et certaines zones de l'intestin médian alors que des bactéries étaient présentes à tous les niveaux du tube digestif. Ces résultats révèlent que d'autres mécanismes de régulation de la production des peptides doivent intervenir au niveau des épithélia, contrôlant de façon tissu-spécifique la concentration des peptides. Ainsi, la voie Toll ne serait pas impliquée dans la régulation de peptides antimicrobiens dans ces tissus, alors qu'elle régule l'expression de la drosomycine, cécropine et attacine dans le corps gras. Par contre, l'expression de ces gènes dans les épithélia semble contrôlée par la voie Imd (Tzou *et al.*, 2000). L'ensemble des données chez les mammifères et les insectes suggèrent que la réponse épithéliale représenterait le système ancestral de défense antimicrobienne (Hoffmann and Reichhart, 2002).

### **7.2.3. Les peptides antimicrobiens chez la limule.**

L'hémolymphe de limule renferme des molécules de défense solubles et un grand nombre d'hémocytes, qui répondent à des stimuli par des phénomènes d'exocytose. Les hémocytes granuleux représentent 99% des hémocytes circulants. Ils renferment deux types de granules. Les granules-L (pour « Large ») stockent sélectivement plus de 20 molécules de défense dont des facteurs de coagulation, des inhibiteurs de protéases, des lectines et protéines antimicrobiennes comme la «big-défensine» et le facteur D, protéase intervenant également dans la coagulation. Les petits granules, granules-S, renferment les peptides antimicrobiens, tachyplésine, big-défensine, tachycitine et tachystatine (pour revue Iwanaga, 2002). Outre des propriétés de liaison au LPS déjà citées précédemment, certains de ces effecteurs

antimicrobiens présentent la propriété de se lier à la chitine et non aux autres polysaccharides, tels que cellulose, mannane, xylane et laminarine. Parmi les peptides caractérisés chez la limule, la tachyplésine est le peptide sur lequel les études sont les plus avancées. La tachyplésine est principalement synthétisée par les hémocytes sous forme d'un précurseur composé d'un peptide signal, du peptide mature et d'une extension C-terminale anionique. Les tachyplésines sont stockées sous forme mature dans les granules.

Les hémocytes circulants, après détection de LPS ou  $\beta$ -glucanes, libèrent le contenu de leurs granules par exocytose ménagée dans l'hémolymphe (Toh *et al.*, 1991), ce qui détermine l'initiation de la cascade de coagulation. La cascade de coagulation, chez la limule, a été très bien décrite. Elle implique l'action de sérine-protéases, enzymes de coagulation et le coagulogène (Iwanaga *et al.*, 1998). Les peptides antimicrobiens libérés se retrouvent avec d'autres substances dans le gel de coagulation insoluble, où ils participent à l'activité microbicide vis-à-vis des microorganismes immobilisés.

#### **7.2.4. Les peptides antimicrobiens des crustacés.**

Chez les invertébrés, mis à part les diptères et les lépidoptères, la plupart des peptides antimicrobiens ont été isolés à partir des hémocytes où ils seraient exprimés constitutivement (Bachère *et al.*, 2004). Chez les crustacés, différentes molécules antimicrobiennes ont également été isolées essentiellement à partir des hémocytes. Les premiers peptides antimicrobiens caractérisés chez les crevettes pénéides ont été les pénaeidines (Destoumieux *et al.*, 1997). Récemment, des polypeptides homologues de « anti-lipopolysaccharide factors » (ALFs) de la limule (Aketagawa *et al.*, 1986) ont été isolés dans des banques d'ADNc d'hémocytes de crevettes comme *Penaeus monodon* (Supungul *et al.*, 2004), *Litopenaeus stylirostris* (de Lorgeril *et al.*, 2005) ou *L. vannamei* (Gross *et al.*, 2001). La production d'une des séquences d'ALF en système recombinant a permis d'établir son spectre d'activité antimicrobienne, révélant des activités vis-à-vis de bactéries à Gram (-) et notamment de souches de *Vibrio* (Somboonwiwat *et al.*, 2005). Comme ALF, diverses molécules antimicrobiennes ont été récemment isolées par des approches de génomique chez différentes espèces de crevettes pénéides, révélant le caractère ubiquitaire des peptides antimicrobiens chez les pénéides. Ainsi, outre les pénaeidines et ALF, sont retrouvées présentes des séquences de lysozyme (Rojtinnakorn *et al.*, 2002), (de Lorgeril *et al.*, 2005), des crustines, polypeptides de 11 kDa riches en cystéines (Bartlett *et al.*, 2002), (de Lorgeril *et al.*, 2005), également présents chez les crabes (Relf *et al.*, 1999). Enfin, des peptides antifongiques ont

été isolés à partir de plasma des crevettes *L. vannamei* et *L. stylirostris*, résultant, en réponse à une infection microbienne, du clivage de la partie carboxy-terminale de l'hémocyanine impliquée notamment dans le transport d'oxygène (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que aucun peptide de la famille des défensines n'a été caractérisé à ce jour chez un crustacé.

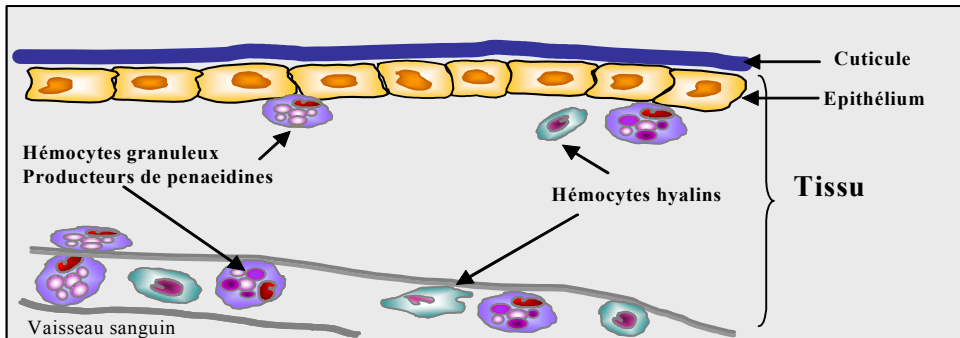
Les **pénaeidines** sont les peptides antimicrobiens les plus étudiés à ce jour chez les crustacés. Cette famille de peptides est caractérisée par une structure originale, constituée d'un domaine amino-terminal riche en résidus proline non structuré et d'un domaine carboxy-terminal structuré comprenant six cystéines organisées en deux doublets (Yang *et al.*, 2003). Les pénaeidines présentent des activités antimicrobiennes essentiellement vis-à-vis de bactéries Gram + et de champignons filamenteux (Destoumieux *et al.*, 1999) (Cuthbertson *et al.*, 2004) et des spécificités de cibles ont été mises en évidence. Ces peptides apparaissent soit bactéricides soit bactériostatiques en fonction des souches bactériennes (Destoumieux *et al.*, 1999). Outre une activité relativement faible *in vitro* vis-à-vis des bactéries Gram (-), les pénaeidines ont des propriétés d'agglutination et d'opsonisation de *Vibrios*, favorisant la phagocytose de ces bactéries par les cellules hyalines (Munoz *et al.*, 2002). Ces peptides ont en outre une propriété de liaison à la chitine (Destoumieux *et al.*, 2000).

Les pénaeidines sont produites biologiquement actives à partir de précurseurs formés d'un peptide signal placé en position amino-terminale du peptide mature (Destoumieux *et al.*, 1997) et ils sont exprimés exclusivement dans les hémocytes granuleux des crevettes (Destoumieux *et al.*, 2000). Stockés dans les granules cytoplasmiques, les peptides matures sont libérés dans la circulation après une stimulation du système immunitaire (Munoz *et al.*, 2002) ou lors d'infection par une bactérie pathogène chez *L. stylirostris* (Munoz *et al.*, 2004). L'étude approfondie de l'expression et la localisation des pénaeidines au cours d'une stimulation ou d'une infection bactérienne a permis de progresser sur la réponse immunitaire des crevettes et de définir deux phases (Figure 8).

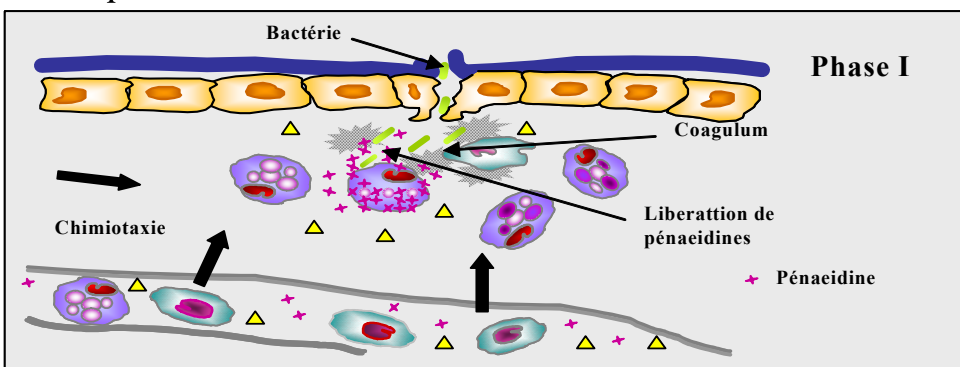
### **Phase I : recrutement hémocytaire**

Une première phase de la réponse immunitaire des pénaeidines à une infection bactérienne, correspondant aux 6 ou 12 premières heures post-stimulation, est caractérisée par une diminution dans les populations circulantes des hémocytes exprimant des pénaeidines c'est-à-

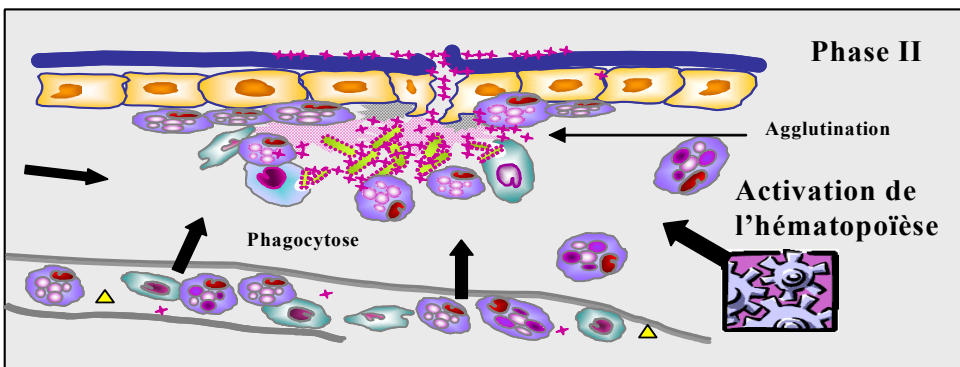
### A. Conditions normales



### B. Réponse locale



### C. Réponse systémique



**Figure 8. Modèle de la réponse antimicrobienne des crevettes pénéides, impliquant les hémocytes et les peptides antimicrobiens de la famille des pénaéidines.** A. Dans des conditions normales, les hémocytes producteurs de pénaéidines sont présents dans la circulation et dans les tissus. La réponse à une infection microbienne peut être divisée en deux phases. B. La phase I est une réponse locale, caractérisée par une migration massive des hémocytes au site d'infection et une libération massive de pénaéidines. C. La phase II est une réponse systémique, caractérisée par une accumulation massive d'hémocytes produisant des pénaéidines dans les tissus et provenant de l'activation de l'hématopoïèse. Des pénaéidines sont détectées, liées aux surfaces cuticulaires (Bachère et al., 2004).

dire les cellules granuleuses (Destoumieux *et al.*, 2000). Ces cellules quittent le système circulatoire mais également la plupart des tissus de la crevette, et migrent vers les tissus infectés où ils libèrent leur contenu par un phénomène original de lyse cellulaire, ce qui correspond à une forte réponse antimicrobienne locale (Munoz *et al.*, 2002, Munoz *et al.*, 2004;).

### **Phase II : prolifération hémocytaire – réaction systémique**

Pendant la seconde phase de la réponse immunitaire, correspondant aux 48-72 heures post-infection, les pénaeidines massivement libérées sont observées à la fois dans le plasma et dans les tissus ainsi que sur les surfaces cuticulaires (Destoumieux *et al.*, 2000). Par ailleurs, une invasion massive d'hémocytes granuleux exprimant des pénaeidines est observée à la fois dans la plupart des tissus et la circulation sanguine révélant une réaction systémique (Munoz *et al.*, 2002). Cette augmentation des hémocytes en phase systémique correspond à la production d'une nouvelle population d'hémocytes granuleux ayant une activité transcriptionnelle accrue de pénaeidines (Munoz *et al.*, 2002). L'activation des processus d'hématopoïèse comme élément de la réponse immunitaire à une infection a été également révélée par une approche SSH « Subtractive Suppression Hybridization » visant à identifier des gènes impliqués dans la survie de crevettes à une infection à *V. penaeicida* (de Lorgeril *et al.*, 2005). Chez ces crevettes ayant survécu au *Vibrio*, les gènes impliqués dans la prolifération et l'hématopoïèse étaient particulièrement représentés parmi les séquences identifiées. L'activation de l'hématopoïèse chez les crevettes pénéides, et probablement chez d'autres invertébrés, apparaît donc comme un élément important de la réponse immunitaire contribuant à une réponse systémique et à la restauration de l'homéostasie chez les animaux soumis à des infections (Bachère *et al.*, 2004).

#### **7.2.5. Les peptides antimicrobiens des mollusques.**

Chez les mollusques, les premiers peptides antimicrobiens ont été caractérisés essentiellement chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996) (Mitta *et al.*, 2000a). Différentes familles de peptides ont pu être identifiées. Ainsi, des défensines, mytilines et mytimicines ont été purifiées à partir des hémocytes de la moule. Ces peptides sont synthétisés sous forme de précurseurs et sont stockés sous forme mature dans différents types de granules hémocytaires. Il s'agit des défensines (MGD1 et MGD2) (Mitta *et al.*, 1999b), des mytilines (Mitta *et al.*, 2000b), des myticines (Mitta *et al.*, 1999a) et les



mytimicines (Mitta *et al.*, 2000a). Ces peptides antimicrobiens sont caractérisés par la présence de 8 cystéines dans leur séquence primaire, à l'exception des mytimicines qui n'en renferment que six. Les peptides de moules montrent des caractéristiques communes, c'est-à-dire un peptide signal cationique, suivi du peptide mature et d'une extension C-terminale anionique (Mitta *et al.*, 2000a). La structure tridimensionnelle de la défensine MGD a été établie, révélant qu'elle présente le motif cystéine stabilisé CS- $\alpha$ - $\beta$  caractéristique des défensines d'arthropodes bien que chez la moule un pont disulfure supplémentaires soit observé dans la séquence (Yang *et al.*, 2000). Chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*, plusieurs isoformes de défensines et de mytilines ont été caractérisés qui se sont révélées présenter des activités antimicrobiennes différentes voire complémentaires. Cette diversité des peptides antimicrobiens exprimés chez la moule pourrait donc contribuer à élargir le spectre d'activité vis-à-vis des pathogènes au cours de la réponse immunitaire (Mitta *et al.*, 2000a).

La localisation et la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens ont été étudiées en détail chez la moule *M. galloprovincialis*, ce qui a permis de mettre en évidence des similitudes entre la réaction anti-infectieuse modulée par les peptides antimicrobiens chez ce mollusque et les mammifères. Les peptides antimicrobiens de moules participent à la réponse immunitaire à deux niveaux : local et systémique (Mitta *et al.*, 1999b, Mitta *et al.*, 2000a). En effet, il a été montré qu'en réponse à une stimulation bactérienne, les hémocytes de moule migrent au site d'infection où des phénomènes de phagocytose interviennent. Les bactéries internalisées dans les hémocytes se retrouvent alors en contact avec les peptides antimicrobiens au niveau des phagosomes comme décrits dans les neutrophiles des vertébrés. Cette réaction locale peut alors être suivie d'une réaction systémique caractérisée par la libération par exocytose dirigée des peptides antimicrobiens et une augmentation notable de leur concentration plasmatique (Mitta *et al.*, 1999b).

A ce jour, aucun peptide antimicrobien n'a pu être purifié et caractérisé à partir des hémocytes d'huître selon les approches développées chez la moule, suggérant que les systèmes d'expression et de synthèse de ces effecteurs de l'immunité pouvaient être totalement différents entre ces deux types de mollusques bivalves.

## Chapitre II

### Caractérisation de deux nouvelles protéines plasmatiques présentant des affinités aux LPS.

#### Publication 1

Evidence in oyster of a plasma Extracellular Superoxide Dismutase which binds LPS (2005)  
*Biochemical and Biophysical Research Communication*, 338: 1089-1097.

#### Publication 2

Identification of a Lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*  
Manuscrit devant être soumis à « *Developmental and Comparative Immunology* »

La phase de reconnaissance d'organismes pathogènes est une composante essentielle de la réponse immunitaire innée. Cette capacité est basée sur un autre aspect fondamental du système immunitaire, la discrimination entre le soi et le non soi. Différentes catégories de molécules sont capables de reconnaître et signaler la présence de microorganismes pathogènes. Elles possèdent des affinités différentes pour les motifs conservés des microorganismes. La base moléculaire de cette reconnaissance repose sur un système de récepteurs et de molécules capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés caractéristiques de microorganismes. Cette conservation implique que ces structures soient partagées par un large groupe de pathogènes. Ces motifs moléculaires sont appelés des PAMPs pour « Pathogen Associated MolecularPattern » (Medzhitov and Janeway, 1997). Les bactéries Gram(-) ont en commun la présence de lipopolysaccharides (LPS), les bactéries Gram(+) des acides téchoïques, et les  $\beta$ -1.3 glucanes sont une caractéristique des cellules fongiques. Les molécules de l'hôte capables de reconnaître les PAMPs de pathogènes sont communément dénommées PRM pour "Pattern Recognition Molecule" ou PRR pour "Pattern Recognition Receptor" (Medzhitov and Janeway, 1997). L'interaction entre les PAMPs des pathogènes et les PRM et PRR de l'hôte provoqueront l'activation des mécanismes de défense.

Les mammifères présentent dans le plasma divers facteurs solubles qui peuvent reconnaître des PAMPs et qui sont impliqués dans les mécanismes de l'immunité non

spécifiques, comme par exemple le lysozyme, la protéine C-réactive et le système du complément et dans l'immunité spécifique. Ainsi, la cascade du complément est chez les vertébrés un exemple de cascades protéolytiques qui repose sur la conversion de pro enzymes par une cascade de protéases à sérines après la reconnaissance d'un motif conservé. Chez les invertébrés, ces cascades sont des composants majeurs de la réponse humorale et mènent, après exposition à un pathogène, à la formation de composés cytotoxiques comme chez les insectes et le crustacés (Söderhäll and Cerenius, 1998). Chez les insectes, l'hémolymphe contient un certain nombre de protéines, qui sont impliquées dans des processus liés au développement, physiologiques ou immunologiques divers. Certaines de ces protéines ont été confirmées comme ayant de fonctions duales dans l'hémolymphe. Par exemple, la protéine de l'hémolymphe apoLp-III qui joue un rôle dans le métabolisme des lipides (Soulages *et al.*, 1996). Par ailleurs, elle participe aussi aux réactions immunitaires comme une protéine de type LBP ou comme un activateur d'activité bactériolytique de l'hémolymphe (Niere *et al.*, 1999).

Au cours de ce chapitre, nous décrirons dans une première partie, l'isolement et la caractérisation d'une protéine plasmatique de type Superoxide Dismutase qui serait impliquée dans les mécanismes oxydatif de l'huître *Crassostrea gigas*. Cette protéine, présentant aussi une activité de fixation au LPS, pourrait être impliquée dans les mécanismes de reconnaissance des bactéries et les phénomènes de communication. Dans une deuxième partie, nous présenterons la purification et la caractérisation d'une seconde protéine plasmatique présentant une affinité pour le LPS et dont la séquence N-terminale en acides-aminés ne correspond à aucune protéine décrite dans les bases de données.



# Identification of a Lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Marcelo Gonzalez<sup>1</sup>, Françoise Roquet<sup>2</sup>, Yannick Gueguen<sup>1</sup>, Martine Pugnère<sup>2</sup>, Evelyne Bachère<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 5171, CNRS-UMII-IFREMER, Génome Populations Interactions Adaptation, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5 (France)

<sup>2</sup> Centre de Pharmacologie et Biotechnologies pour la Santé, Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 5160, 34093 Montpellier Cédex 5, France

\*Corresponding author. Fax: +33 (0)4 67 14 46 22

E-mail address: [evelyne.bachere@ifremer.fr](mailto:evelyne.bachere@ifremer.fr)

**Keywords:** Mollusc bivalve; Marine invertebrate; LPS; plasma; Lipopolysaccharides binding protein.

## Abstract

**Lipopolysaccharide (LPS) is the major constituent of the outer cell wall of gram-negative bacteria. In this study, a 60 kDa protein, named Cg-LBP, was purified by bacterial binding assay using *Escherichia coli* (k l/r) and RP-HPLC from the plasma of the oyster *Crassostrea gigas*. The N-terminal amino sequence of this protein shares no sequence homology with already isolated LPS-binding proteins from invertebrates and vertebrates. BIACORE technology was used to study the specific interaction of Cg-LBP with LPS and lipid A coated onto HPA sensor chip. The protein showed a higher binding capacity for LPS than for Lipid A. This work is the first report on the isolation of a LPS binding protein from the plasma of an oyster.**

## Introduction

There is currently increased interest in resolving questions about the molecular mechanisms of defense in invertebrates, including molluscs, which represent the second largest group of the invertebrate phylum after insects. This is of particular interest for marine organisms with economical importance, in particular the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, which represents 97% of the worldwide oyster production [1] [2] [3]. In bivalves, internal defense is based on an innate, non lymphoid system involving cell-mediated and

humoral reactions, which interplay to recognize and eliminate pathogens [4].

Lipopolysaccharide (LPS) is the major constituent of the outer cell wall of gram-negative bacteria. During a gram-negative infection, LPS, released from bacterial cells, is the well-known activator of the cellular and humoral component of the host defense responses. This cascade is necessary to fight gram-negative infection, but under certain circumstances it can lead to septic shock [5] [6]. LPS molecules are composed of three distinct regions: lipid A, a core oligosaccharide, and the O-antigen region. Lipid A is a highly conserved, hydrophobic structure, which is considered to be the toxic moiety of the LPS molecule [5] [7]. Different LPS-binding proteins, such as the bactericidal increasing protein (BPI), the lipopolysaccharide binding protein (LBP), the serum amyloid P component (SAP) and CD14, have been described, in the mammalian system, to play an important role in both the activation of LPS responsive cells and the detoxification of LPS [5] [8]. In invertebrates, soluble proteins, that recognize the outer membrane of gram-negative bacteria, have also been identified [9] [10]. However, in mollusc plasma protein associated to bacterial patterns recognition remains unknown.

We report here the purification from *C. gigas* oyster plasma of a protein that showed affinity for gram-negative bacteria. We characterised the N-terminal amino sequence of this protein that shares no sequence homology with already known LPS-binding proteins from invertebrates or vertebrates. Using biosensor technology, a powerful tool analyses of real time

molecule interactions, we studied the specific interaction of the purified oyster protein, Cg-LBP, with LPS and Lipid A.

## Materials and Methods

### Animals and hemolymph collection.

Adult oysters, *Crassostrea gigas*, were purchased from a local oyster farm in Palavas-Les Flots (Gulf of Lion, France) and kept in sea water at 15°C. The plasma of *C. gigas* was prepared as described previously [11]. Hemolymph was collected from the pericardial cavity through the adductor muscle under an equal volume of anti-aggregant modified Alsever solution, and immediately centrifuged at 1000g for 10 min (4°C). The plasma protein concentrations were quantified using micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce™) and Bovine Serum Albumin (BSA) was used as a standard.

### In vitro bacterial binding assay on *E. coli*.

The plasmatic protein LPS-binding properties were characterized as described previously [12]. Briefly, *E. coli* K 1/r [13] bacteria were resuspended in 1 ml of 10 mM sodium acetate/acetic acid (NaAc/HAc) buffer, pH 4.0 and incubated 10 min with 100 µg of protein with gentle agitation (4°C). *E. coli* cells were washed twice by centrifugation with 500 µl NaAc/HAc buffer (pH 4.0) and bound proteins were subsequently eluted with 30 µl of 200 mM MgCl<sub>2</sub> in NaAc/HAc buffer (pH 4.0).

### Reverse HPLC plasma eluate.

Magnesium chloride sample eluate obtained was subjected to reverse-phase high-performance-liquid-chromatography (RP-HPLC) on a Symetry® C<sub>4</sub> column (4.6 x 250 mm). Separation of the eluated protein was performed with a linear gradient of 2-100 % acetonitrile in acidified water over 30 min at flow rate of 1 ml/min. Fractions were hand collected, dried under vacuum and reconstituted in ultra pure water (UPW). To ascertain the purity of the protein, one additional step was performed on the same column but the protein was eluted with a linear gradient of 20-100 % acetonitrile in acidified water over 45 min at flow rate of 1 ml/min.

### N-terminal sequencing

N-terminal sequence analysis of purified Cg-LBP, previously subjected to SDS-PAGE and

then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, was performed by automated Edman degradation and detection of the phenylthiohydantoin (PTH) derivatives on an automated Procise Applied Biosystems Sequencer.

### Real time interaction analysis between Cg-LBP and immobilized LPS

The SPR experiments were performed on a BIACORE 3000 apparatus (Biacore AB, Uppsala, Sweden) at 25°C. LPS type O26:B6 from *E. coli* (Sigma) and Lipid A diphosphoryl from *E. coli* F583 Rd mutant (Sigma) were immobilized onto a HPA chip (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Briefly, after cleaning of the surface with 40mM n-octyl-β-D-glucoside (15min, 10 µl/min), sonicated LPS and Lipid A (500 µg/ml) were flown over a HPA flow cell at 2µl /min for 30min. After immobilization, 0.1 M NaOH was injected at 100µl/min into the flow cell to remove excess of LPS and Lipid A, so that, only a monolayer of LPS and Lipid A remained. BSA (0.1mg/ml, Sigma) was used to detect non specific binding on the surfaces coated by LPS and Lipid A. As a control monolayer, POPC liposomes were immobilized in the same way onto another HPA flow cell. For binding experiments, purified Cg-LBP, at (25 and 50 µg/ml), was injected over the LPS, the Lipid A and the control flow cells at a flow rate of 20µl/min. As a binding control, we injected over the flow cells and under similar conditions polymixin B (0.5µg/ml) which is known to bind to lipid A. For all experiments the running buffer was PBS.

The affinity constants were calculated using BIACORE evaluation software version 4.1

## Results and discussion

Animals are constantly threatened by infection from microorganisms. Therefore, they have developed humoral and cellular immune responses to fight these infections. Vertebrates possess innate and acquired immune systems, whereas invertebrates rely only on an innate non-specific immune response. In mollusc bivalves several plasma molecules implicated in immune response have been characterized such as antimicrobial peptides [14], agglutinin-like protein [15] and recently putative antiviral activity has been found in the hemolymph of *Crassostrea gigas* [16]. In oyster, except for the presence of gigalectin H and E [15], virtually nothing is known about the plasma protein implicated in the recognition of bacteria.

The aim of the present work was to purify putative LPS-binding protein from the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. For that, we have applied a simple method that consists in incubating the free-cells hemolymph (plasma) with bacteria, and eluting bound proteins with salts. This method has been used to purify proteins, such as, human BPI from leukocytes [12] and plasma proteins from the insects *Hyalophora cecropia* [17] and *Bombyx mori* [18], [19]. We used *E. coli* K 1/r cells, as affinity particles, for purification of bacterial-recognition proteins from the oyster plasma. After *E. coli*-affinity precipitation, plasma proteins eluted with magnesium chloride were analyzed by SDS/PAGE. Two major proteins (30 kDa and 60 kDa), that showed putative LPS-binding properties, were obtained (Figure 1A). In a previous report, we demonstrated that the 30 kDa protein correspond to an Extracellular Superoxide Dismutase (*Cg*-EcSOD) involves in the respiratory burst and that displays LPS-binding properties. The fraction containing the 60kDa protein was subjected to a second RP-HPLC run on the same column. Then, the pure 60 kDa purified protein collected was subjected to N-terminal amino acid sequencing (Figure 1B). however, the sequence obtained (FPVDEATYRADI) did not match with any known proteins from databases (BLAST search). Different proteins that recognised LPS or peptidoglycane have been found in invertebrates, such as the american cockroach (*Periplaneta americana*) [20], the fruit fly *Drosophila melanogaster* [21], the earthworms (*Eisenia foetida*) [22] and the silkworm *Bombyx mori* [23] [24]. In marines invertebrates, LPS and/or  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from crayfish *Pacifastacus leniusculus* [25], shrimp *Penaeus monodon* [26] and horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* [27] have been characterized.

BIACORE analysis was performed to evaluate the interaction of *Cg*-LBP protein from *C. gigas* plasma with LPS and Lipid A. This technology has already been used to study the specific interaction of lipopolysaccharide binding proteins and peptides using LPS-coated surface [5] [28]. In order to determine the affinity constants, the purified *Cg*-LBP protein was injected at, two different concentrations (25 and 50  $\mu$ g/ml) in running buffer at 20 $\mu$ l/min over the HPA chip. Figure 2A shows the binding *Cg*-LBP protein to LPS immobilized onto a HPA chip. The apparent  $K_D$  value obtained for LPS is  $2.3 \times 10^{-7}$  M. In the case of diphosphoryl lipid A from *E.coli* HPA coated chip, we obtained a similar profile (Figure 2B) and apparent  $K_D$  for the interaction of *Cg*-LBP-

lipid A is  $7.8 \times 10^{-6}$  M, around 33 fold weaker that the one obtained for LPS. The sensorgrams agreed best with a two state binding model with conformational change. In such a model, analyte A binds to ligand B, then the complex AB changes to AB\*, which cannot dissociate directly to give A + B. The apparent dissociation constant is given by the equation  $K_D = k_{d1}/k_{a1} \cdot 1/(1+k_{a2}/k_{d2})$  where  $k_a$  and  $k_d$  are the kinetic parameters of the two steps. A rearrangement in the lipid layer is often fitted with this suitable kinetic model [29], [30]. As a binding control, polymixin B (0.5  $\mu$ g/ml) was injected over the lipid surface. The equilibrium dissociation constants obtained  $3.6 \times 10^{-8}$  M for Lipid A and  $6.2 \times 10^{-8}$  for LPS.

These affinity constants obtained for the purified *Cg*-LBP for LPS from *E. coli* and Lipid A, are comparable to previous results obtained with known LPS-binding proteins, such as the *Limulus* endotoxin binding protein-protease inhibitor, the 15-mer BPI (aa 85-99) and the polymixin nonapeptides [28]. Considering its abundance in the oyster plasma, this property appears to be relevant with a potential role of this circulating protein in LPS or bacteria-binding.

In order to characterize immune genes in oysters, several EST programs have been generated from the *C. gigas* and *C. virginica*. Several partial sequences of proteins with homology with proteins of recognition such as lectins (Ficolin and Galectin) have been identified [1] [31]. In addition, by SSH approach a putative  $\beta$ -galactoside binding lectin and a  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein have been identified in *C. virginica* and *C. gigas*, respectively [2]. However, the N-terminal amino acid sequence from *Cg*-LBP did not show any positive match with proteins sequences from SwissProt database (that include all oysters ESTs sequences) and from GigasBase (the *Crassostrea gigas* EST database). Anyway, this result can also be explained because the majority of the cDNA sequences obtained in oysters by ESTs approaches are not complete. Further studies are now necessary to go further in the biochemical identification and characterization of this *Cg*-LBP protein and its role in the oyster immunity.

## References

- [1] Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E. and Escoubas, J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 16, 139-145.
- [2] Tanguy, A., Guo, X. and Ford, S.E. (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338, 121-131.
- [3] Boutet, I., Tanguy, A. and Moraga, D. (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147-157.
- [4] Wootton, E.C., Dyrinda, E.A. and Ratcliffe, N.A. (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol* 15, 195-210.
- [5] de Haas, C.J., Haas, P.J., van Kessel, K.P. and van Strijp, J.A. (1998) Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide as determined by biosensor technology. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 492-496.
- [6] Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.
- [7] Alexander, C. and Rietschel, E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7, 167-202.
- [8] Chaby, R. (2004) Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell Mol Life Sci* 61, 1697-1713.
- [9] Fujita, T., Matsushita, M. and Endo, Y. (2004) The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198, 185-202.
- [10] Steiner, H. (2004) Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol Rev* 198, 83-96.
- [11] Bachère, E., Hervio, D. and Mialhe, E. (1991) Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 11, 173-180.
- [12] Mannion, B.A., Kalatzis, E.S., Weiss, J. and Elsbach, P. (1989) Preferential binding of the neutrophil cytoplasmic granule-derived bactericidal/permeability increasing protein to target bacteria. Implications and use as a means of purification. *J Immunol* 142, 2807-2812.
- [13] Levy, O., Ooi, C.E., Elsbach, P., Doerfler, M.E., Lehrer, R.I. and Weiss, J. (1995) Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J Immunol* 154, 5403-5410.
- [14] Mitta, G., Vandenbulcke, F. and Roch, P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 486, 185-190.
- [15] Olafsen, J.A., Fletcher, T.C. and Grant, P.T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol* 16, 123-138.
- [16] Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A. and Bourgougnon, N. (2005) Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 66, 147-152.
- [17] Sun, S.C., Lindstrom, I., Boman, H.G., Faye, I. and Schmidt, O. (1990) Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250, 1729-1732.
- [18] Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. and Brey, P.T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7888-7893.
- [19] Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H. and Sato, R. (1997) Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Biochem* 248, 217-224.
- [20] Jomori, T., Kubo, T. and Natori, S. (1990) Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of american cockroach *Periplaneta americana*. *Eur. J. Biochem.* 190, 201-206.



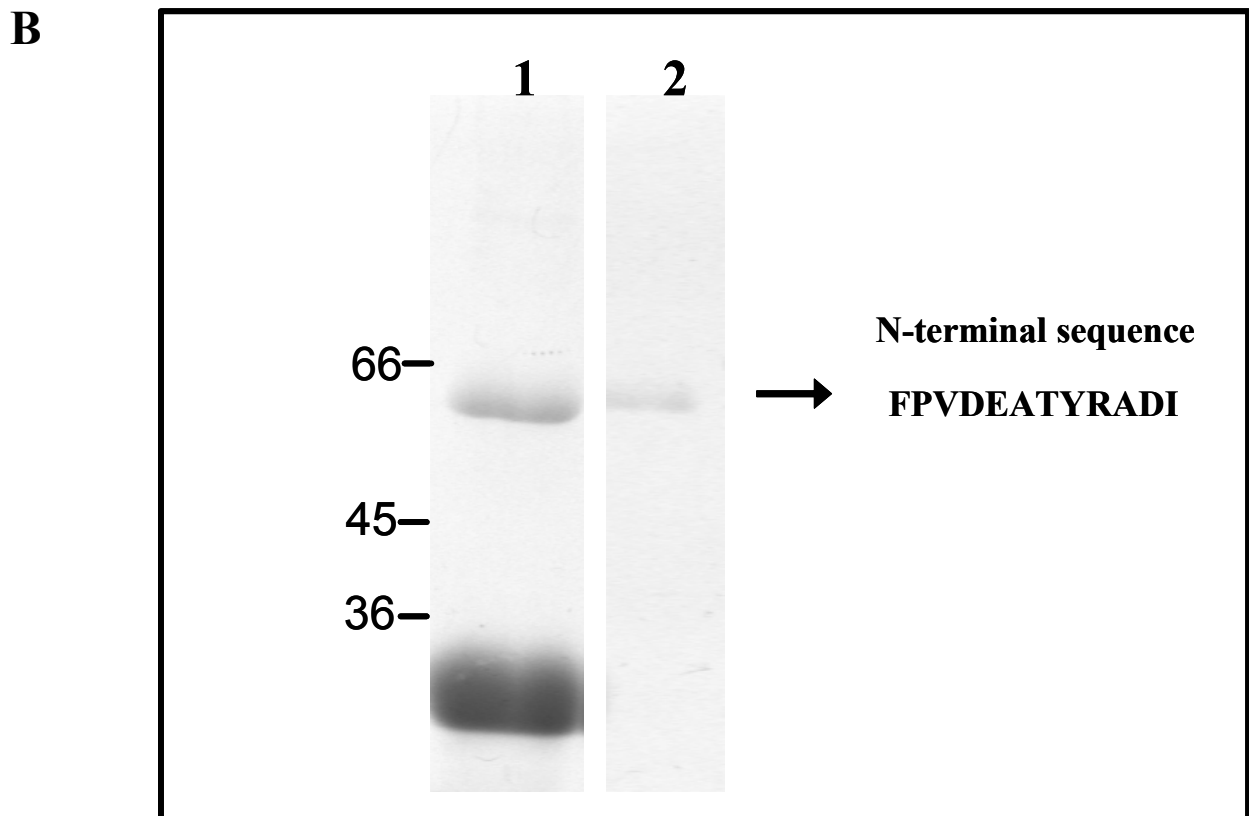
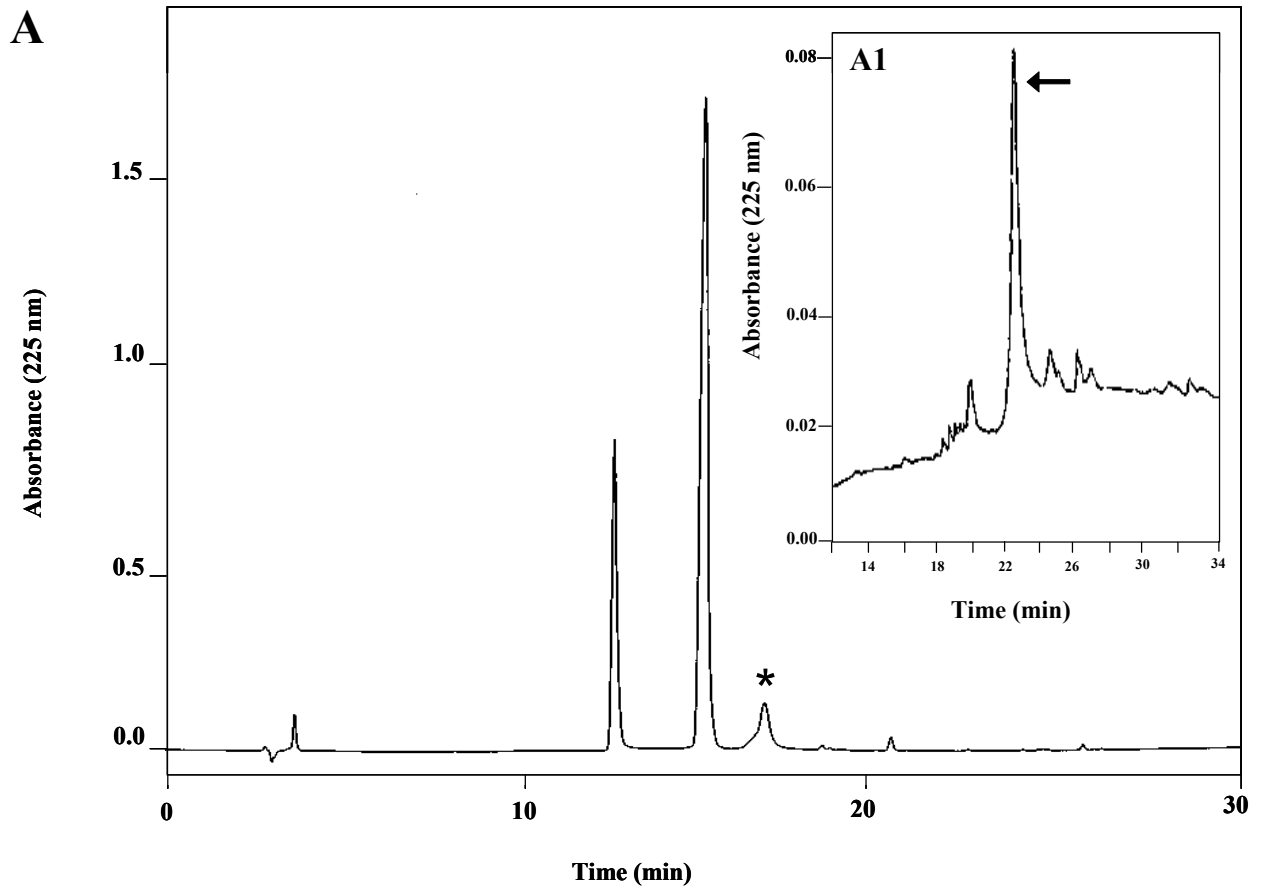
- [21] Kim, Y.S., Ryu, J.H., Han, S.J., Choi, K.H., Nam, K.B., Jang, I.H., Lemaitre, B., Brey, P.T. and Lee, W.J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 275, 32721-32727.
- [22] Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P. and Timmermans, M. (1998) Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 273, 24948-24954.
- [23] Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1993) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* as a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS* 139-143.
- [24] Ochiai, M. and Ashida, M. (2000) A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 275, 4995-5002.
- [25] Lee, S.Y., Wang, R. and Söderhäll, K. (2000) A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 1337-1343.
- [26] Sritunyalucksana, K., Lee, S. and Söderhäll, K. (2002) A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 26, 237-245.
- [27] Chen, S.C., Yen, C.H., Yeh, M.S., Huang, C.J. and Liu, T.Y. (2001) Biochemical properties and cDNA cloning of two new lectins from the plasma of *Tachypleus tridentatus*: *Tachypleus* plasma lectin 1 and 2+. *J Biol Chem* 276, 9631-9639.
- [28] Tan, N.S., Ng, M.L., Yau, Y.H., Chong, P.K., Ho, B. and Ding, J.L. (2000) Definition of endotoxin binding sites in horseshoe crab factor C recombinant sushi proteins and neutralization of endotoxin by sushi peptides. *Faseb J* 14, 1801-1813.
- [29] Roy, M.O., Pugniere, M., Jullien, M., Chopineau, J. and Mani, J.C. (2001) Study of hydrophobic interactions between acylated proteins and phospholipid bilayers using BIACORE. *J Mol Recognit* 14, 72-78.
- [30] Chenal, A., Nizard, P., Forge, V., Pugniere, M., Roy, M.O., Mani, J.C., Guillain, F. and Gillet, D. (2002) Does fusion of domains from unrelated proteins affect their folding pathways and the structural changes involved in their function? A case study with the diphtheria toxin T domain. *Protein Eng* 15, 383-391.
- [31] Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W. and Chapman, R.W. (2002) Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* 4, 81-93.

## Legend Figures

**Figure 1. Purification of Cg-LBP from *Crassostrea gigas* plasma.** (A) HPLC elution profile after incubation of *C. gigas* plasma extract with *E. coli* k 1/r. The profile shows two major peaks (1 and 2) that correspond to Cg-EcSOD (Gonzalez et al.) and a minor peak (\*). This third fraction was subjected to an additional HPLC-purification step (A1) and the pure 60 kDa protein obtained (arrow) was transferred to PVDF membrane for N-terminal amino acid sequencing determination. (B) The purified proteins fractions from *C. gigas* plasma were analysed by SDS-PAGE under reducing conditions. Lane 1, Plasma proteins after incubation of with *E. coli* k 1/r and magnesium chloride elution. Lane 2, represents the 60kDa, Cg-LBP after HPLC purification. Molecular mass markers are included on the left. The N-terminal amino acid sequence obtained for the purified Cg-LBP is indicated on the right.

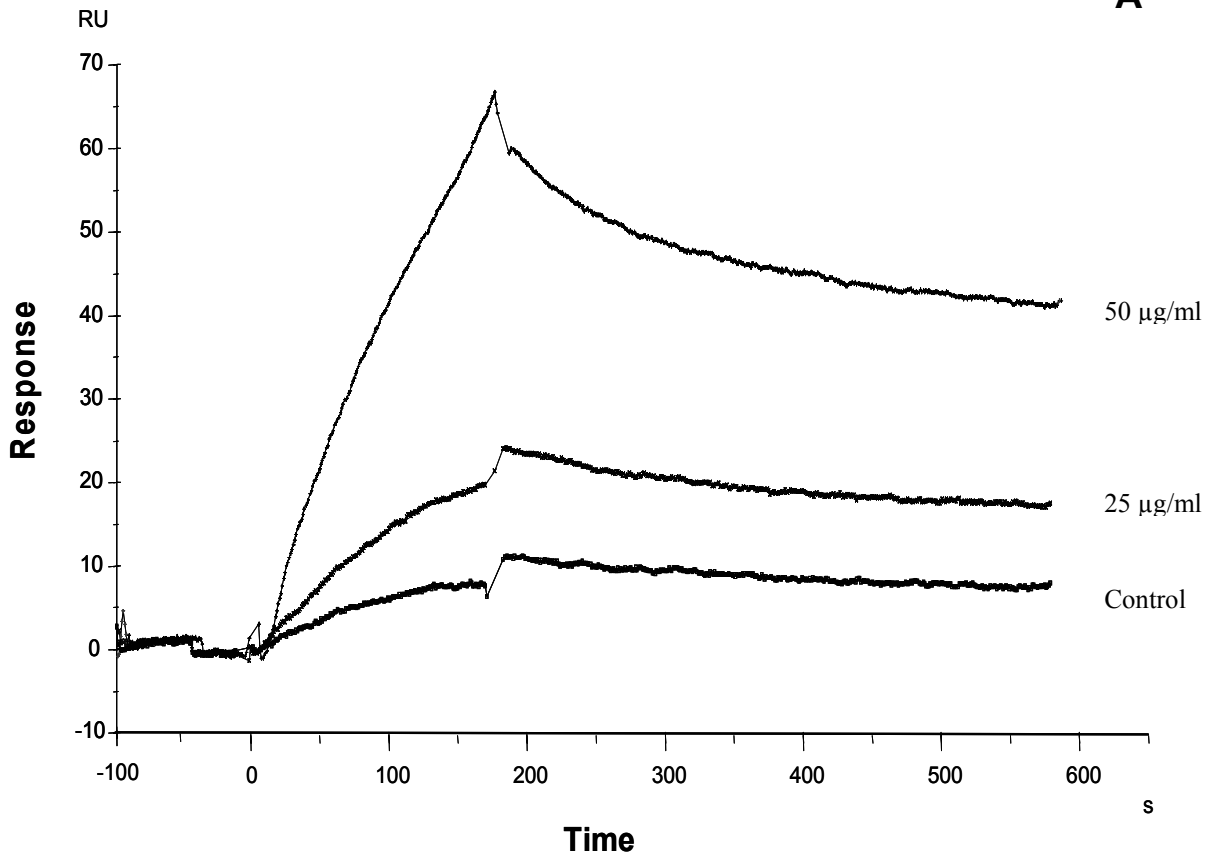
**Figure 2. SPR analysis of Cg-LBP –lipid interactions.** Sensorgram depicting the interactions of Cg -LBP (50 µg/ml and 25µg/ml in PBS buffer) with LPS (2A) or lipid A (2B) immobilized onto a HPA chip. The LBP was injected at a flow rate of 20 µl/min. As a negative control, the Cg -LBP was injected over a POPC surface under the same conditions.

Figure 1

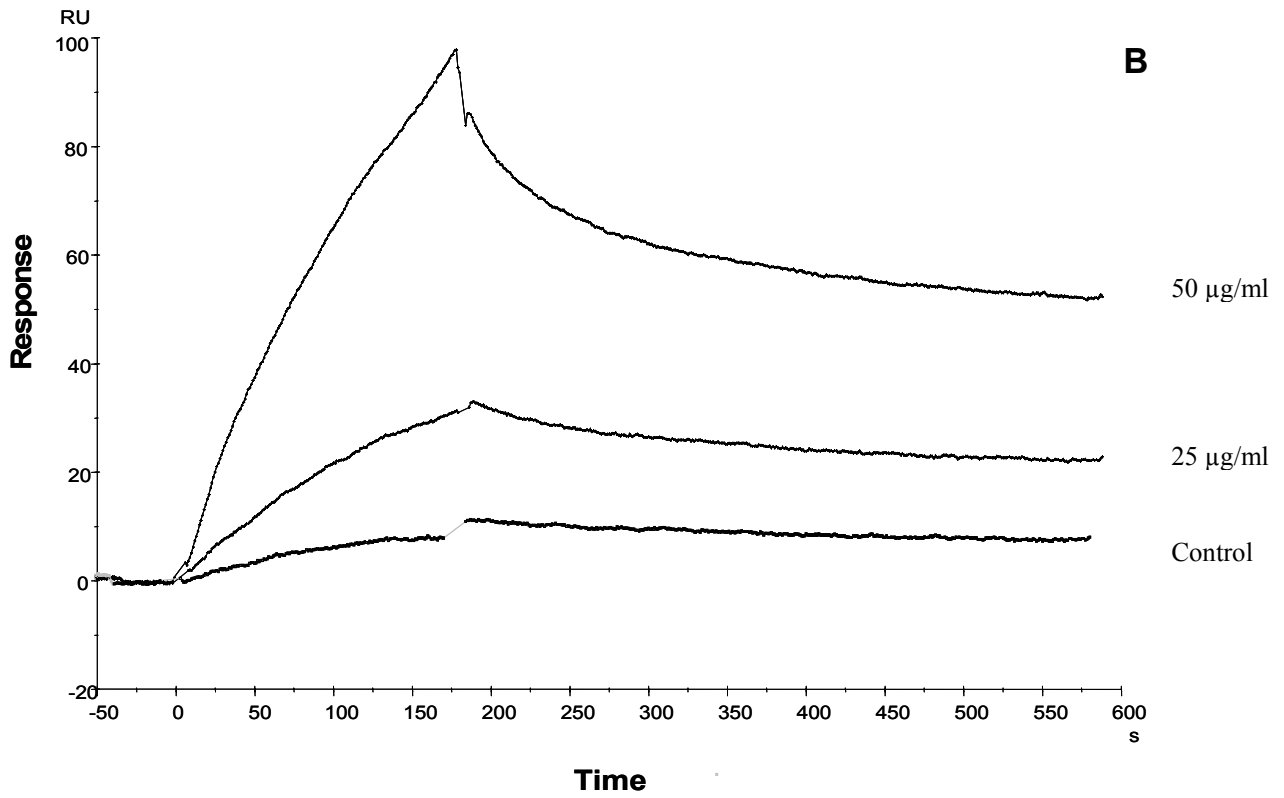


**Figure 2**

**A**



**B**



## Chapitre III

### Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine Cg-BPI chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

#### Publication n°3

First evidence of a Bactericidal Permeability Increasing protein (BPI) in an invertebrate, the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*

Manuscrit devant être soumis à « *Journal of Biological Chemistry* »

Chez les vertébrés et les invertébrés, les mécanismes de reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS), qui sont à l'origine de réponses cellulaires et humorales, sont un des éléments clés de la réponse immunitaire. Différents types de protéines de liaison aux LPS ont été caractérisées chez les mammifères dont les protéines «Bactericidal Permeability Increasing (BPI) »et «Lipopolysacchides Binding Protein » (LBP) (Weiss, 2003). BPI et LBP présentent entre elles de fortes homologies de séquences au niveau des acides aminés, mais des fonctions immunitaires différentes. BPI possède des activités de reconnaissance aux LPS, de neutralisation des endotoxines ainsi qu'une activité anti-bactérienne tandis que LBP se lie aux LPS et active la réponse inflammatoire (Elsbach and Weiss, 1993). Dans le cadre d'un projet «Expressed Sequence Tag » réalisé à partir des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Gueguen *et al.*, 2003), nous avons identifié un clone dont la séquence protéique présente de fortes homologies avec les protéines de la famille BPI/LBP/CETP/PLTP/PLUNC (PLTP, protéine transporteuse des lipides ; CETP, protéine de transfert de ester de cholestérol ; protéines de types PLUNC, Palate, lung and nasal clone) de mammifères. Les protéines de cette famille ont à ce jour été identifiées chez les vertébrés essentiellement. Le clone isolé chez l'huître possède un ORF de 1784 pb codant une protéine putative de 477 acides aminés. La séquence en acide aminée de la protéine correspondante présente des homologies avec BPI humain (46% de similarité) et LBP humain (44% de similarité). Plus récemment, des molécules de type LBP/BPI ont été caractérisées, sur la base de leur ADNc, chez un certain nombre de poissons téléostéens (Inagawa *et al.*, 2002), (Kono and Sakai, 2003), (Stenvik *et al.*, 2004) et chez un invertébré, le mollusque *Biomphalaria glabrata* (Mitta *et al.*, 2005). Cependant, aucune étude de la fonctionnalité de ces protéines, permettant de définir s'il s'agissait de protéine de type BPI ou LBP, n'a été entreprise.

Afin de caractériser les propriétés de la protéine putative identifiée (*Cg-LBP* ou *Cg-BPI*), nous avons entrepris l'expression en système recombinant chez la levure *Pichia pastoris*. Les résultats obtenus montrent que *Cg-BPI* représenterait la première protéine de type BPI caractérisée fonctionnellement chez un invertébré. Par ailleurs, des analyses par hybridation *in situ* ont montré que l'expression du gène est constitutive dans les épithélia et inductible dans les hémocytes suite à une stimulation bactérienne.

# FIRST EVIDENCE OF A BACTERICIDAL PERMEABILITY INCREASING PROTEIN (BPI) IN AN INVERTEBRATE, THE BIVALVE MOLLUSC *CRASSOSTREA GIGAS*.

Marcelo Gonzalez<sup>1</sup>, Yannick Gueguen<sup>1</sup>, Julie Fievet<sup>1</sup>, Bernard Romestand<sup>1</sup>, Martine Pugnère<sup>2</sup>, Françoise Roquet<sup>2</sup>, Philippe Bulet<sup>3</sup>, Jean-Michel Escoubas<sup>1</sup>, Franck Vandebulcke<sup>4</sup>, Evelyne Bachère<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>UMR5171, IFREMER-CNRS-UMII, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5, France; the <sup>2</sup>Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 516, 34093 Montpellier, France ; the <sup>3</sup>Atheris Laboratories, Case Postale 314, CH-1233 Bernex-Geneva, Switzerland and the <sup>4</sup>Laboratoire « Ecologie Numérique et Ecotoxicologie », Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France;

Running title: An oyster Bactericidal/Permeability Increasing protein

\*Corresponding author: Fax: +33 (0)4 67 14 46 22

E-mail address of the corresponding author: [evelyne.bachere@ifremer.fr](mailto:evelyne.bachere@ifremer.fr)

Keywords: Marine invertebrate; Pacific oyster, Hemocytes; Epithelia; Antimicrobial defence; Bactericidal/permeability increasing protein, LPS-binding activity.

**We have characterized for the first time in an invertebrate, the oyster *Crassostrea gigas*, a bactericidal/permeability increasing protein. A sequence presenting homologies with members of the LBP/BIP protein family has been identified by EST approach from oyster hemocytes collected after a bacterial challenge. According to the deduced amino acid structure and theoretical isoelectric point, the oyster protein appeared to be related to mammalian BPI. To get insight into the biological properties of the molecule, we have produced a recombinant protein in *Pichia pastoris*. Evidence of LPS-binding activity and bacteria permeabilizing property has permitted to determine that a BPI-related gene, we named *Cg-BPI*, is present in the oyster. The distribution of *Cg-BIP* mRNA in oyster tissues revealed that *Cg-BPI* is expressed in hemocytes and that its expression is induced by bacterial challenge. Additionally, as its orthologous gene in mammals, *Cg-BPI* was shown to be continuously expressed in the epithelia of various tissues of the oysters. *Cg-BPI* mRNA have been detected by *in situ* hybridization in epithelial cells of the mantle and the gills, at the level of the digestive tract and digestive gland diverticula but also in the epithelia of gonad follicles. All together, these results reveal that *Cg-BPI* may provide a first line of defence against potential bacterial invasion**

**but it may also participate in acute immune reaction in response to an infection.**

## INTRODUCTION

Multicellular organisms are continuously challenged by the contact with microorganisms that are present in their environment. That is particularly the case for marine invertebrates such as mollusc bivalves which have evolved in the continuous presence of microorganisms, including bacteria from the genus *Vibrio*. These Gram-negative bacteria are ubiquitous and abundant in aquatic environment and they are found in great abundance in tissues and organs of marine animals. The oysters, such as *Crassostrea gigas* harbour a diverse microflora both on their surface (epibiosis) and inside the body cavities and hemolymph (endobiosis). These animals have developed an efficient immune system for communicating with their commensal, beneficial microflora, and for discriminating potential harmful bacteria. In this respect, endotoxin ((LPS), lipopolysaccharide) from the outer membrane of Gram-negative bacteria plays an important role in the interaction and activation of the innate immune system and antimicrobial defence (1) (2). In invertebrates, involvement of LPS-binding proteins (LBP) in transducing cellular signals from LPS has been reported. LBP have been fully characterized in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (3), in shrimp *Litopenaeus stylirostris* (4), the earthworm, *Eisenia foetida* (5) or the silkworm *Bombix mori*

(6). However, the mechanisms for regulating the inflammatory response induced by endotoxins remain largely unknown. In mammals, LBP is an acute phase plasma protein constitutively secreted by liver, that induces cellular responses in a variety of cells and resulting in both antibacterial and pro-inflammatory activities (7). In particular, a LBP-dependant activity is the acute mobilization of circulating neutrophils to tissue site of injury for bacteria elimination. Antimicrobial peptides are involved in such reactions together with another LPS-binding protein, the bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) which is also stored in neutrophils and contributes to intracellular and extracellular bacterial destruction (8). BPI is a 55-kDa cationic protein specifically bactericidal to Gram-negative bacteria via damage to bacterial outer and inner lipid membrane, disturbing its permeability (9). Accumulated extracellularly, BPI exerts also opsonization activity of bacteria to enhance phagocytosis by neutrophils (10). LBP and BPI are closely related LPS-binding proteins which share 50% primary structural identity. They have a co-ordinated function in the response to invading bacteria; LBP has a pro-inflammatory action when BPI as antibacterial effectors displays endotoxin-neutralizing properties and suppresses LPS inflammatory activity (8,11).

With genomic approaches, several proteins belonging to this family of lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein (LT/LBP) have been identified both in non-mammalian vertebrates and invertebrates. LBP/BPI related gene has been cloned from the carp *Cyprinus carpio* (12), the Rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (13) or the Atlantic cod *Gadus morhua* (14), but also from *Caenorhabditis elegans* (15) and, recently from the mollusc *Biomphalaria glabrata* (16). Whereas this suggests a conservation of this endotoxin-mediated immune reaction, the real nature of the genes identified LBP versus BPI has not been determined so far.

Here, in a program of identification of immune-related genes in the hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* by Expressed Sequence Tags (ESTs) approach (17), we report the isolation of a sequence presenting homologies with mammalian LBP/BPI genes. In order to further characterize this gene and the function of the encoding protein in the oyster, we have expressed a recombinant protein in *Pichia pastoris*, analysed the structural amino

acid composition and analysed in biological properties. We show that the recombinant protein displays LPS-binding property but also a permeabilizing activity against *Escherichia coli* revealing that the gene identified in oyster encodes a BPI-related protein. Additionally, the expression and localisation of the gene has been studied by *in situ* hybridization on oyster tissues and hemocytes following a microbial challenge.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals, tissues collection and immune challenge** - Adult oysters, *Crassostrea gigas*, were purchased from a local oyster farm in Palavas (Gulf of Lion, France) and kept in sea water at 15°C. Oysters were stimulated by balneation with the  $5 \times 10^8$  bacteria/litre. The micro-organisms used for the challenge were the heat-killed bacterial strains *Micrococcus luteus*, *Vibrio splendidus* and *Vibrio anguillarum*. Hemolymph was collected at different times (0, 15, 24 and 48 h) from the pericardial cavity through the adductor muscle under an equal volume of antiaggregant Modified Alsever Solution (MAS)(18) and immediately centrifuged at 700 g for 10 minutes (4°C) to separate the blood cells from plasma. After hemolymph collection, oyster tissues were harvested by dissection. Hemocytes and tissues were further treated according to different experimental procedures (see below).

***C. gigas* hemocyte cDNA library Expression Sequence Tag and sequence analysis** - A cDNA library constructed from oyster hemocyte mRNA in lambda Zap Express bacteriophages (Stratagene® La Jolla) was partially sequenced to establish an expressed sequence tag (EST) library (17) and database was built with available 1142 ESTs and corresponding functional classification. Comparison of ESTs against nonredundant Swissprot and GenBank databases revealed that 615 clones were significantly similar ( $E$  value  $< 10^{-3}$ ) to isolated genes.

**Rapid screening of *C. gigas* hemocyte cDNA library** - A total of 36.684 clones from the cDNA library were spotted onto high-density membrane, corresponding to 18.432 unique cDNAs. The cDNA clone (BQ427321) identified in the EST library was cut with the enzyme restriction EcoR I and Xho I (Bio-labs)



and was radiolabelled by [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP random priming using the Ready-to-go DNA labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech). High-density membranes were prehybridized at 65°C for 24 h and hybridized with cDNA probe at 65°C for 15 h in a solution containing 5 x SSPE, 5 x Denhardt's solution, 0.1 % SDS and 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA. Membranes were washed twice in 1 x SSC, 0.1 % SDS and a wash in 0.5 x SSC, 0.1 % SDS at 65°C followed by autoradiography. Positive clones were recovered from the cDNA library for subsequent sequencing.

**Northern blot analysis** - Total RNA was extracted from the hemocytes of *C. gigas* using Trizol reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen™) and treated with DNase Turbo (Ambion). Poly(A)<sup>+</sup> RNAs were extracted with Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> (Dyna) and fractionated (2  $\mu$ g/ lane) by denaturing 1.2 % agarose/formaldehyde gel electrophoresis for blotting onto Hybond-N membrane (Amersham). A radiolabelled probe was generated as previously described from cDNA clone (BQ427321). Membranes were prehybridized for 2 h at 65°C in 50 % formamide, 5 X SSC, 8 X Denhart's, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5, 0.1% SDS and 100  $\mu$ l/ml denatured salmon sperm DNA. Hybridization using radiolabelled probe was performed overnight at 42°C in the same buffer. Membranes were washed twice for 15 min at room temperature in 2 X SSC/0.1 % SDS and twice for 20 min at 60°C in 1 X SSC/ 0.1 % SDS. Membranes were exposed to autoradiographic film using an intensifying screen.

**Sequence analysis and structure modelling** - Homology searches were performed with the BLAST software on the NCBI home page (<http://www.ncbi.gov./Blast>). Deduced amino acid sequences were aligned by ClustalW (<http://nps-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>). BPI domain was predicted by domain prediction program SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) (19). For signal peptide prediction, SignalIP program was used (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>). Phylogenetic tree was built by the neighbour-joining method based on the alignment of the sequences using ClustalX (alignment was improved using the Seaview software). Bootstrap values (%) of 1000 replicates were

calculated for each node of the consensus tree obtained. Three-dimensional structural model for Cg-BPI was generated with the automated server (<http://bioserv.cbs.cnrs.fr>) for comparison with human LBP/BPI proteins (20). The PDB file of the human BPI crystal structure (1EWF) served as template. Electrostatic surface potential were estimated using the Swiss PDB Viewer, version 3.7 (21).

### ***In situ* hybridization**

**Probes** - cDNA clone (BQ427321) was used as template for the preparation of the probes. [ $^{35}$ S] UTP-labelled antisense and sense riboprobes were generated from linearized cDNA plasmids by *in vitro* transcription using RNA labelling kit, T<sub>3</sub> RNA polymerase (Roche) and [ $^{35}$ S] UTP (Amersham).

**Tissues and hemocyte preparation** - Tissues and hemocytes from *C. gigas* oyster were prepared for histology and *in situ* hybridization analyses as described by Muñoz et al (2002) (22). Briefly, oyster tissues were fixed in Davidson solution containing 22 % formalin, 31.5 % ethanol and 11.5 % glacial acetic acid at 4°C. After dehydration, tissues were embedded in Paraplast and 7  $\mu$ m sections were cut, mounted on poly L-Lysine coated slides and stored at 4°C until use. The hemolymph was collected under 1 volume of anti-aggregant MAS containing 8% paraformaldehyde. After 10 min fixation at 4°C, hemocytes were centrifuged (10 min, 800 g), washed in MAS and then cytocentrifuged on slides (Cyto-Tek centrifuge) for storage at -20°C until used.

**Hybridization** -  $^{35}$ S-labelled riboprobes (2 x 10<sup>6</sup> c.p.m. per slide) were diluted in hybridization buffer containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 10 x Denhart's solution, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> tRNA from *Escherichia coli*, 100 mM dithiothreitol and 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> salmon sperm DNA. Hybridization as carried out overnight at 55°C in a humid chamber. Slides were then washed twice (2 x 15 min) with 2 X NaCl/Cit, treated with RNase A (20 mg·mL<sup>-1</sup> in 2 X NaCl/Cit) for 10 min at 37°C and consecutively rinsed 2 x 10 min in 0.1 X NaCl/Cit containing 0.0 % 2-mercaptoethanol at 55°C.

**Quantification of the  $^{35}$ S-labelled probe hybridization** - After hybridization step, the slides were rinsed in 0.1 X NaCl/Cit at 20°C, briefly immersed in graded alcohol and air dried at room temperature. Hybridization signal was visualized using autoradiography. Sample were coated by dipping in LM1 Amersham liquid

emulsion, immediately dried and exposed for a 36 h for hemocytes and 72 h for tissue. At the end of exposure period, the autoradiograms were developed in D19b (Kodak), fixed in 30% sodium thiosulfate (10 min at room temperature), stained with 1% Toluidine blue and mounted with Xam (Merck). Quantification of the radiolabelling at the hemocyte level was performed using an Axiophot Zeiss microscope and an ImageJ 1.33 software from NIH. Control for *in situ* hybridisation consisted in replacing antisense riboprobe with sense riboprobe. Specific labelling values (quantification of silver grain in cellular area) were determined by subtracting those obtained for sense probe from the total labelling values observed. Data were analyzed by one-way analysis of variance using STATISTICA software (Statsoft, France).  $P < 0.05$  was considered significant. Percentage of positive hemocytes was determined over 100 counted cells in triplicate per conditions.

### **Cloning and expression of recombinant protein Cg-BPI**

#### ***Construction of Cg-BPI expression cassette***

To obtain the mature Cg-BPI protein, Cg-BPI cDNA was amplified by PCR using Isis DNA polymerase™ (Qbiogene) with specific primers. For the convenience of cloning, a *NotI* site (underlined) was added to the 3'-end of the reverse primer after the stop codon. Primer sequences were BPIFw: 5'-AAGACCCCGGCTTACAGACTAGAATC - 3' and BPIRv: 5'-AATTATTGCGGCCGCTCTCAGCCACTGTATTTCAG-3', where restriction site is underlined. The purified PCR product was digested with the restriction enzyme and cloned in-frame into *SnaBI/NotI* sites of the *Pichia* expression vector pPIC9K (Invitrogen), downstream of the sequence of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -mating factor signal peptide and the Glu-Ala-Glu-Ala repeat sequence. *E. coli* Top10F' (Invitrogen) was used in the construction of Cg-BPI expression vector. The sequence of recombinant plasmid, pCg-BPI, was confirmed by nucleotide sequencing.

#### ***Pichia pastoris transformation and selection of recombinant clones***

*P. pastoris* GS115 was grown overnight at 30 C, 250 rpm in YPD medium. The yeast cells were harvested, washed twice with ice-cold sterile water, and resuspended in 1 M sorbitol. The purified pCg-BPI plasmid was linearized by *SacI* and 5  $\mu$ g of it was transformed into *P. pastoris* by

electroporation as recommended by manufacturer instructions (Invitrogen). The cells were then spread on MD plates containing 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulphate without amino acid,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 2% dextrose, 1.5% agar. Transformants were resuspended in sterile water and pooled. Positive *P. pastoris* transformants were selected by spreading  $10^5$  cells on YPD plates supplemented with G418-sulphate at a final concentration of 0, 0.25, 0.75, 1, 1.5, and 2 mg/ml. Plates were incubated at 30 C and checked daily until colonies growth. In order to purify putative G418-sulphate resistant clones, single colonies were streaked on YPD plates and then, on YPD-G418-sulphate plates to confirm G418-sulphate resistance. Additionally, the transformant were screened for integration of pCg-BPI into the genome by PCR amplification with 5' and 3' AOX1 primers (23).

#### ***Production of recombinant Cg-BPI (rCg-BPI)***

- Single colonies of each clones were grown overnight in YPD broth medium at 30 C and used to inoculate 100ml of BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB (yeast nitrogen base with ammonium sulphate without amino acid,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, and 1% glycerol) in an 1l flask. The cells were grown at 30 C until an  $OD_{600}$  of 4–6. Then, they were harvested by centrifugation at 1500g for 5min at room temperature and resuspended in 20ml BMMY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, and 0.5% methanol). To induce the expression, methanol (100%) was added every 24 h to a final volume concentration of 0.5%. To monitor the cell growth, culture medium (1ml) was collected and centrifuged at 3000g for 2 min at room temperature at each time point (0, 1, 2 and 3 days). The supernatant and the cell pellets were stored at -20°C. The supernatant protein concentrations were determined by the method of Lowry using the Bio-Rad assay. Equal protein amounts were subjected to discontinuous SDS-PAGE analysis. The clone which expressed the highest amount of recombinant protein was selected for large-scale production. After 3 day-induction, the culture supernatant was subjected to partial purification by precipitation with 50% ammonium sulphate, the precipitate was solubilized in 10 mM sodium phosphate, pH 7.4 and concentrated by ultrafiltration using

Centricon-Plus (cut-off 10000 dalton) (Amicon). For Western blot analysis, the proteins were blotted onto PVDF membrane and hybridization was performed with goat polyclonal anti-BPI (a kind gift from Jerrold Weiss). Subsequently, the membrane was incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti goat antibodies and developed using BCIP/NBT as substrate (Sigma).

#### **Amino acid structural characterization of recombinant Cg-BPI**

***In-gel trypsin digestion***- The protein band was excised from the one-dimensional polyacrylamide gel following staining with Coomassie blue (CBB) G-250 (Serva, Heidelberg). Distaining was performed by successive washes of 20 min in water at 55°C until obtaining good signal/background coloration. Following shrinking with acetonitrile and rehydration with an appropriate buffer, the protein band was cut in small pieces (1x1 mm cubes) and subjected to reduction/alkylation. Reduction was performed in the presence of dithiothreitol for a period of 45 min at 56°C, the resulting free cysteine residues were alkylated with iodoacetamide at room temperature in the dark for a 30 min period. The resulting gel particles were dried under vacuum and hydrated in the digestion buffer supplemented with trypsin (Boehringer Mannheim, sequencing grade) at the proportion of 12.5 ng/μL of trypsin (w/v). Trypsin digestion was performed overnight at 37°C with an excess of trypsin. The resulting tryptic peptides were extracted from the gel with acetonitrile and formic acid and the resulting extracted material desalted and concentrated with C<sub>18</sub> ziptip (P10, Millipore™) according to the procedure reported by the manufacturer. The eluted peptide mixture was used for MALDI-TOF/TOF-MS, ESI-MS and ESI-MS/MS analyses.

***MALDI-TOF and ESI mass spectrometry analysis*** - The sample (0.5 μl) was analyzed by MALDI-TOF/TOF-MS on an Ultraflex TOF-TOF (Bruker, Germany) in a reflectron positive mode. Sample deposition was performed on prespotted anchor chip plates (PAC, Bruker, Germany) following manufacturer instructions. External calibration of the mass spectra was performed using a Bruker calibrant kit composed of the following standards: bradykinin 1-7 at *m/z* 757.399, angiotensin II at *m/z* 1046.542, angiotensin I at *m/z* 1296.685,

neurotensin at *m/z* 1672.917, renin substrate at *m/z* 1758.933, ACTH 1-17 at *m/z* 2093.086, ACTH 18-39 at *m/z* 2465.198, ACTH 1-24 at *m/z* 2932.588 and ACTH 7-38 at *m/z* 3657.929.

***For ESI-MS and ESI-MS/MS analysis*** - The sample (2-3 μl) was analyzed by ESI-MS on a Q-TOF micro instrument using off-line nanotips (Proxeon, Denmark) at a positive mode with a cone voltage set at 30V. Acquisition of MS spectra was carried out in order to get a significant signal-to-noise ratio. All *m/z* signals detected in sufficient signal-to noise ratio in the MS mode were chosen for MS/MS fragmentation analysis. The quality of fragmentation was assessed on the basis of signal intensity and signal-to-noise ratio. Acquisition of MS/MS spectra was carried out for periods ranging from 20 sec. to 2 min. Calibration was performed for MS/MS mode with [Glu1]-fibrinopeptide B (*m/z* ).

***Database searches*** - Following mass spectra acquisition, the peak *m/z* values were extracted and used to search with the Mascott program. The database chosen for all searches is the non-redundant protein database from the NCBI. The database search was performed with the following implementation parameters: enzyme (trypsin), fixed modifications (carbamidomethyl for cysteine residues), variable modifications (oxidation for methionine and/or tryptophan residues) and/or N-formyl, mass values (monoisotopic), protein mass (unrestricted), peptide mass tolerance (± 100 ppm and/or 0.1 Da), fragment mass tolerance (± 0.5 Da) and maximum missed cleavages.

#### **Biological activity**

***Assay for bacterial permeability*** -We assessed the effect of recombinant protein Cg-BPI on bacterial membrane integrity by spectrophotometric assays use *E. coli* ML-35p (generous gift of R. Lehrer). This strain is constitutive for cytoplasmic β-galactosidase, lacks lactose permease, and expresses a plasmid-encoded periplasmic β-lactamase (24). Briefly, after overnight incubation at 37°C, the bacteria culture was washed three times with 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, resuspended in this buffer to approximately 1x10<sup>8</sup> CFU/ml (OD<sub>620</sub>= 0.35), and kept on ice until used. Nitrocefin (CALBIOCHEM®), (3-(2,4-Dinitrostyryl)-(6R, 7R)-7-(2-thienylacetamido)-ceph-3-em-4-carboxylic Acid, E-isomer), was used as chromogenic β-lactamase substrate that undergoes distinctive

color change from yellow to red. The chromogenic  $\beta$ -galactosidase substrate, ONPG (o-nitrophenyl-  $\beta$ -D-galactopyranoside, Sigma) was used to measure outer membrane permeabilization. Nitrocefin (100  $\mu$ M) and ONPG (25 mM) stock solutions were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. Spectrophotometric assays were performed in 96 well clear polystyrene plates. The incubation medium contained 10 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl and 0.3 mg/ml trypticase soybroth powder. Bacteria suspension (20  $\mu$ l) were distributed in microplates in a final volume of 200  $\mu$ l containing 22 $\mu$ M nitrocefin or 2.5 mM ONPG, and the recombinant protein Cg-BPI (10  $\mu$ g). Control was the omission of recombinant protein. Assays were run at 37°C for 25 min, after addition of the bacteria. Color density was measured at 405 nm for ONPG and 492 nm for Nitrocefin, using a Multiskan (Labsystem).

**LPS binding activity** - The SPR experiments were carried out at 25°C using a BIACORE 3000 apparatus (Biacore AB, Uppsala, Sweden) at 25°C. Cg -BPI was immobilized onto a CM5 chip (Biacore AB, Uppsala, Sweden) via primary amino groups according to the manufacturer's instructions (Biacore AB, Uppsala, Sweden). The running buffer was HBS-N (10mM Hepes, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA). For binding experiments, different concentrations of purified Lipid A diphosphoryl from *E. coli* F583 Rd mutant (Sigma) and LPS type O26:B6 from *E. coli* (Sigma) were injected simultaneously into the measuring and control (no protein immobilized) flow cells at 50  $\mu$ l/min. The kinetic parameters were calculated using BIACORE evaluation software version 4.1.

## RESULTS

**Isolation and sequence analysis of Cg-BPI cDNA clone** - A cDNA sequence (BQ427321) has been identified from the oyster hemocyte EST library presenting homologies with proteins from the family of mammalian LBP/BPI. The clone consisted in 596 pb and deduced amino acid sequence encoded an ORF of 128 amino acids corresponding to the C-terminal domain of the LBP/BPI proteins. To get a full-length cDNA clone, we have screened the hemocyte cDNA library spotted onto high density membranes using this first sequence. One clone (AY165040) was identified consisting of a 1784 pb ORF encoding an 477

amino acids sequence. The 3'-UTR contains a single typical polyadenylation signal (AATAAA) that is present between nucleotides 1675–1681. The deduced amino acid sequence starts with a 19-residue hydrophobic signal peptide and the cleavage site for signal peptidase is located after the cysteine residue preceding the lysine in position 20 as predicted by SignalP 3.0 software. This signal peptide sequence is followed by 458 amino acid residues corresponding to the mature protein with a calculated size of 50.1 kDa and calculated isoelectric point of 9.3 (Fig. 1A).

Cg-BPI sequence was compared by BLAST search to proteins belonging to LBP/BPI family. Automated modelling showed that Cg-BPI present in its overall structure the two typical domains observed in human BPI and LBP. The two domains, named BPI 1 and BPI 2, contain three structural units, two barrel and central  $\beta$ -sheet that form an interface between the barrels (Fig 1B). The oyster protein presents in its N-terminal sequence (residues: 1-233), a putative LPS-binding regions found in mammalian LBPs and BPIs (25) (Fig. 1A and 1B). In particular, Cg-BPI presents a conservation of 4 lysine residues with human BPI at position 45, 89, 92 and 96 located in the sites of interaction with LPS. In human LBP, the lysine at position is 48 is lacking replaced by an arginine residue (Fig. 1A and 1B). Additionally, the N-terminal domain of Cg-BPI contains two cysteine residues (Cys 135 and 175) conserved with the cysteines responsible in proteins from human LBP/BPI family of disulfide bond formation (26) (Fig 1B). Finally, five potential N-glycosylation sites [Asn-X-(Ser)/ (Thr)] are present in the C-terminal part of the Cg-BPI deduced sequence (Fig. 1A).

**Multiple sequence alignment and phylogenetic tree** - The amino acid sequence of Cg-LBP/BPI was aligned with other proteins of LBP/BPI family available in GenBank and ExPasy using the Clustal W software. Sequence comparison showed that Cg-BPI shares 49% similarities with rainbow trout LBP/BPI 1 (AB042025) and 46 % with *C. intestinalis* LBP/BPI (TC24809) and human BPI (AAG42844). Less similarity was shared with human LBP (44%) and with two other proteins from the same family, namely the human Phospholipid Transfer Protein (PLTP) (CAA15499) (39% similarity) and with the Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)

(AAA51978) (41% similarity). Construction of an unrooted phylogenetic tree using the neighbour-joining method shows that *Cg*-BPI is closed to *C. intestinalis* LBP/BPI and they form a group with fish LBP/BPI, avian BPI and mammalian BPI and LBP. Comparatively, other genes belonging to the LT/LPS-binding protein family, such as the (PLUNC) and PLTP genes are more distantly related to LBP/BPI group, while the CETP gene is more diverged. The phylogenetic tree suggests that the *C. gigas* and *C. intestinalis* LBP/BPI genes would be orthologous to LBP/BPI fish and mammalian LBP and BPI genes (Fig. 2)

#### **Production of recombinant *Cg*-BPI and amino acid structure characterization -**

According to sequence analyses but also to the localisation of its expression, the gene identified in oyster appeared likely to be more related to a BPI than to a LBP. However, only the biological properties could unequivocally indicate about the real nature of this LPS-binding protein in oyster. To further address this question, we have produced the mature protein in the recombinant system of *Pichia pastoris*, the clone transformants were culture and induced with methanol. We examined the expression level of the recombinant protein and the select the best-expressing clone. The culture medium was harvested and analysed by SDS-PAGE. The culture supernatant of GS115 transformed with pPIC9K-*Cg*-BPI showed a major band at around 60 kDa. On the contrary, no protein expression was observed in the culture supernatant of non transformed GS115 and transformed with vector alone (Data not shown). The recombinant protein was partially purified by ammonium sulphate precipitation, concentrated by ultrafiltration and analysed by western blotting using an antibody specific for recombinant human BPI. Immunoreactivity was observed between the oyster recombinant protein and the anti-human BPI antibody (Fig 3A). To verify the identity of the recombinant protein, N-terminal sequencing has been first realized but the protein appeared to be blocked in its N-terminus. Consequently, to get insight into the amino acid structure of the recombinant protein has been analysed by Peptide Mass Fingerprint and Tandem Mass Spectrometry. The protein has been subjected to in-gel reduction/alkylation and trypsin digestion. After enzymatic digestion, the resulting peptide mixture was desalted, concentrated and

analyzed by high-accuracy mass fingerprinting with MALDI-TOF/TOF, ESI-MS and ESI-MS/MS. From the MALDI mass fingerprint acquired from the tryptic digest of the upper band, 59 peaks can be unambiguously identified between  $m/z$  772.495 and  $m/z$  3206.702 (Fig. 3B). Using the peak  $m/z$  values for searches in databases, among all the mass peaks detected, two are corresponding to keratin ( $m/z$  1179.645 and 1994.023, one to a fragment of trypsin ( $m/z$  2163.062) while the rest is corresponding to tryptic fragments of a protein identified as the BPI from the oyster *C. gigas* with a score of 226. The sequence coverage of the matched protein *Cg*-BPI was 70%. Additionally, MS/MS analyses allowed the identification of three major glycosylated fragments in *Cg*-BPI corresponding to potential sites predicted by bioinformatic tools from the protein sequences.

#### **Recombinant *Cg*-BPI displays LPS-binding properties and bacteria permeabilizing activity -**

***Real time interaction analysis between *Cg*-BPI and immobilized LPS-*** Lipopolysaccharides are amphipatic molecules present on the outer membrane of gram-negative bacteria. They consist of polysaccharide part covalently bound to a hydrophobic lipid component named Lipid A. To examine the binding specificity of *Cg*-BPI, BIACORE analysis was performed to evaluate the interaction of recombinant *Cg*-BPI protein with LPS and Lipid A. This technology has already been used to study the specific interaction of lipopolysaccharide binding proteins and peptides using LPS-coated surface. Figure 4A shows the binding of Lipid A to *Cg*-BPI immobilized protein onto a chip CM5. The apparent  $K_d$  value obtained for Lipid A was  $6.74 \times 10^{-8}$  M. In the case of LPS from *E. coli*, we obtained a similar profile (Figure 4B) and the apparent  $K_d$  for the interaction of *Cg*-BPI / LPS was  $1.32 \times 10^{-9}$  M.

***Bacteria membrane permeabilization*** – We have studied the effects of *Cg*-BPI on outer membrane and inner membrane permeability in *E. coli* ML-35 that had been transformed with pBR322 (24). The procedure used permit to evidence a permeabilization effect on bacteria membrane by measuring the hydrolysis of the two substrates, Nitrocefin (for outer membrane) and ONPG (for inner membrane), by specific enzymes produced by transformed *E. coli*. Bacteria have been incubated for 30 min in trypticase soybroth and the recombinant protein

(10µg/ml) in presence of the two substrates. As shown in Fig.5, a hydrolysis of Nitrocefin occurred as soon as 4 min after contact between the bacteria *E. coli* ML-35p and Cg-BPI as revealed by a regular increase of optical density over 25 min of incubation, indicating the release of the bacteria periplasmic β-lactamase. However, no hydrolysis of ONPG has been observed, indicating that *E. coli* β-galactosidase remained cryptic indicating integrity of the inner membrane. These results suggest that incubation with Cg-BPI has resulted in a permeabilizing activity on the outer membrane of the bacteria but not on their inner membrane. As control, *E. coli* ML-35p incubated without Cg-BPI did not hydrolyzed the substrates Nitrocefin and ONPG, indicating that their outer and inner membranes remained intact (Fig. 5).

**Bacterial challenge induces an increase in hemocyte Cg-BPI-transcriptional activity at 24 h post-challenge** - Analyzed on Northern blot, oyster hemocytes mRNA exhibited one band that hybridized with the Cg-BPI 596 bp cDNA insert (BQ427321). The length of the Cg-BPI RNA was estimated to be around 2.0 kb (Fig 6A).

Kinetics of expression of Cg-BPI gene in response to bacterial challenge was analysed by *in situ* hybridization in cytocentrifuged circulating hemocytes collected from oysters at 0, 15, 24, and 48 h following a bacterial challenge by bath. *In situ* hybridization has been realized using <sup>35</sup>S-radiolabelled Cg-BPI riboprobes. After hybridization on cytocentrifuged hemocytes, silver grains are produced by contact of <sup>35</sup>S-emission with the autoradiographic emulsion, and the number of grains is proportional to the hybridization signal (Fig. 6B). We used for the quantification of silver grain the software Image J applied, with a minimal size of particles fixed at 8 pixels. Quantification was expressed as Arbitrary Units (AU) corresponding to the total area of pixels into hemocytes. Background level was measured and subtracted for each slide. Hundred hemocytes from a pool of 5 oysters were analysed at the different times post challenge. In non-challenged oysters, Cg- BPI transcript abundance in hemocytes is quite low with  $10.38 \pm 2.2$  AU values. However, at 15 h after challenge, it increases significantly ( $45.2 \pm 15.2$  AU,  $P < 0.05$ ) with a peak at 24 h ( $128.8 \pm 16.7$  AU,  $P < 0.05$ ) and a decrease in transcript abundance is observed at 48 h ( $49.8 \pm 14.9$  AU,

$P > 0.05$ ) for returning to values observed at 15h and then in control animals. Additionally, this increase in hemocyte Cg-BPI transcriptional activity is concomitant with an increase in the percentage of circulating hemocytes that express Cg-BPI. Whereas in non-challenged oysters around 22% of circulating hemocytes are seen to express Cg-BPI transcripts, this percentage greatly increases in blood circulation following challenge, from 30% at 15 h to 70% of hemocytes at 24 h. At 48 h after bacterial challenge, the percentage of Cg-BPI-expressing hemocytes is similar to that observed in non-challenged oysters (Fig. 6C).

**Cg-BPI appears to be continuously expressed in all epithelia of *C. gigas* oysters** - To go further into the localisation and regulation of Cg-BPI expression gene in oyster during an immune response, oyster tissues were analysed by *in situ* hybridization after 24 h post-challenge and compared to unchallenged oyster. Serial sections of oysters were hybridized with the [<sup>35</sup>S] UTP-labelled Cg-BPI riboprobes. In naive, non-challenged oysters, strong hybridizing signals were seen in epithelia of almost all oyster tissues (Fig. 7A), namely the gills and mantle, the labial palps (Fig. 7C), the stomach, the digestive gland diverticula (Fig. 7E), the intestine but also at the level of the reproductive follicles in gonads. In oysters, 24 h after bacterial challenge, hybridization pictures were similar to that observed in naive animals indicating that Cg-BPI is continuously expressed in oyster epithelia (data not shown). Moreover, numerous Cg-BPI-positive hemocytes were evidenced infiltrating the connective tissues of the different organs from the challenged oysters (Data not shown). According to Cg-BPI sense probe hybridization used as control, for which no signal was observed (Fig. 7B, D and E), the detection of Cg-BPI transcripts with antisense riboprobe was shown to be specific for the tissues analysed.

## DISCUSSION

We have identified and characterized for the first time a BPI-related protein in an invertebrate, the mollusc bivalve, *Crassostrea gigas*. The gene has been initially identified by genomic approach from an EST library constructed from oyster hemocytes collected 12 h after a microbial challenge (17). Homology search revealed first that the oyster sequence displayed significant homologies (44%) with

two mammalian proteins structurally related, namely LPS-binding protein (LBP) and bactericidal/permeability increasing protein (BPI) belonging to the family of lipid-binding proteins which includes also the cholesteryl ester transport protein (CETP) and the phospholipids lipid transport protein (PLTP). LBP and BPI are known to be involved in immune response to Gram-negative bacterial infections by their ability to bind LPS (8). CETP and PLTP are plasma proteins involved in the transport of lipids (27).

With the development of genomic approach, LBP/BPI related sequences have been evidenced in various non mammalian vertebrates and in particular in various species of fish, from trout (13) to carp (12) or cod (14). The expression of the LBP/BPI related genes have been detected in various tissues of the fishes. In the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the carp (*Cyprinus carpio*), moderate increases in LBP/BPI transcripts have been observed in the head kidney, liver or spleen in response to LPS stimulation (12, 13). In the cod, LBP/BPI was shown to be continuously expressed in head kidney leucocytes, whereas LBP/BPI mRNAs were also detected in peripheral blood cells and spleen following an injection of bacteria (14). In invertebrates, LBP/BPI related genes have only been reported in *Caenorhabditis elegans* (15) and interestingly, in the mollusc gastropod *Biomphalaria glabrata* (16) where the gene, expressed in hemocytes, appeared to be modulated in snails after exposure to the parasite *Echinostoma caproni*. However, to date, the question remains about the real nature of the LBP/BPI related genes, LBP versus BPI, identified in these non mammalian vertebrates and invertebrates. In mammals, LBP is mainly expressed in the liver and kidneys (28, 29) but also in skin (30). BPI expression was originally identified to occur in neutrophils (8) but it is shown more recently to be produced also by various mucosal epithelial cells (31). Here, we have characterized, in the oyster *Crassostrea gigas*, the full sequence of a cDNA related to the family of LPS-binding proteins and determined its biological activities and gene expression in response to bacterial challenge.

Deduced amino acid sequence analysis and structural modelling revealed that the oyster protein contains the two characteristic conserved domains observed in BPI and related proteins from the family such as LBP, PLTP,

and CETP. It presents similar boomerang-shape than defined by the crystal structure of human BPI characterized by an N-terminal barrel and C-terminal barrel connected by a central sheet (32). The N-terminal domain contains the LPS-binding structural regions conserved in mammalian LBP/BPI protein family and displays also LPS-neutralization, and bactericidal activity in BPI (25, 33). The oyster N-terminal domain of the protein contains also the three LPS-binding regions and the conserved lysine residues (position 48, 92, 95 and 99) observed in human BPI, that would be involved in electrostatic interactions with negatively charged groups of LPS (34, 15). In addition, the N-terminal domain in the oyster proteins was shown to contain the two conserved cysteine residues common to the LBP/BPI/CETP/PLTP protein family involved in the formation of a disulfide bond that is important in the function of human recombinant BPI (35).

All together, the structural data suggested that the sequence identified as expressed in the blood cells of the oyster *C. gigas* could be more related to a novel BPI gene than to LBP one. To address this question, determination of the biological activity of the protein appeared as an absolute requisite. Because initial tentative for purification of native Cg-BPI from the oyster hemocytes and tissues was unsuccessful, we decided to produce a recombinant protein using the full length cDNA sequence isolated. Cg-BPI has been expressed and produced in *Pichia pastoris* as a major protein, which has been obtained from culture supernatant by precipitation. The protein presented an apparent size of about 60 kDa when expected calculated size was 50 kDa. Thus, to assess the identity of the recombinant protein, it has been first submitted to N-terminal sequencing by Edman degradation but the protein appeared to be blocked in its N-terminus and a mass spectrometry analysis has been further realised. Consequently, a mass spectrometry analysis and peptide fingerprint has been further realised that have permitted to characterize unambiguously the recombinant protein as Cg-BPI. Additionally, the glycosylation of the recombinant has been evidenced explaining its molecular mass of 60 kDa compared to the calculated one of 50 kDa, and which is in agreement with the molecular mass of human BPI (36). Three sites of glycosylation have been

found from the six potential sites observed in the amino acid sequence of *Cg*-BPI (Fig. 1A). The biological properties of the recombinant *Cg*-BPI have been further investigated to definitely discriminate whether this protein identified in oyster was a LBP or a novel BPI related protein. First, Biacore analysis was used to evaluate the interaction of *Cg*-LBP protein from *C. gigas* plasma with LPS and Lipid A. This technology has already been used to study the specific interaction of lipopolysaccharide binding proteins and peptides using LPS-coated surface (37, 38). These affinity constants obtained for recombinant *Cg*-BPI for LPS from *E. coli* and Lipid A, are comparable to previous results obtained with known LPS-binding proteins, such as the *Limulus* Factor C, LBP, BPI and polymixin B (38). These  $K_d$  values of *Cg*-BPI for LPS confirm that the oyster protein has an affinity for LPS and may bind to bacteria. Second, according to methodology developed by Lehrer et coll (39), we showed here that this binding onto the bacteria may lead to a permeabilization of their outer membranes, revealing that the oyster protein is a novel BPI characterized in an invertebrate. However, in our experiments, *Cg*-BPI appeared to damage only the outer membrane of the bacteria whereas mammalian BPI is reported to display a bactericidal activity (36), suggesting a permeabilization of the two bacteria membranes. Further studies must be now addressed to a better characterization of the biological property of *Cg*-BPI, in order to compare to its vertebrate orthologous. In particular, antimicrobial assays will be realised to determine the spectrum of activity and mode of action of this BPI against the bacteria strains which belong to the natural environment of the oysters or which can be pathogenic for them. Finally, beside structural characteristics and biological properties, *Cg*-BPI appears to be close or similar to vertebrate BPI with respect to the localisation of gene expression but also to the expression profile in response to bacteria challenge. Originally, mammalian BPI has been shown to be expressed in neutrophils (8) which are mobilized, during an acute response, to tissue sites of bacterial invasion (40). However, further studies have revealed a functional expression of BPI in various mucosal epithelia where it would be up-regulated by exposure to endotoxins (41). In the oyster *C. gigas*, *Cg*-BPI is expressed continuously in the hemocytes but apparently at a low basal level. Only, *in situ*

hybridization using radiolabelled riboprobes, which greatly increase sensitivity of the technique, have permitted to detect *Cg*-BPI mRNA in non-challenged oyster. In Northern blot analyses, relatively high concentrations of hemocyte mRNA (2  $\mu$ g) have been necessary to get hybridization signal with *Cg*-BPI probe. However, *Cg*-BPI gene is shown to be transcriptionally regulated in response to bacterial challenge in hemocytes and this activation of transcription is transitory reaching a maximum at 24 h after challenge. After 48 h, *Cg*-BPI expression appears to return to basal level of expression in hemocytes. Beside this transient activation of *Cg*-BPI transcription at the level of hemocytes, the challenge induces also an increase in the number of *Cg*-BPI-expressing hemocytes observed in blood circulation but also infiltrating the connective tissues of the oysters, that reveal a systemic reaction. This strongly suggests that LPS recognition may induce in oysters not only an induction of the transcription of *Cg*-BPI-encoding gene, but also may activate a process of hemocyte proliferation as observed in shrimps in response to *Vibrio* infection (42). Interestingly, we show also here that *Cg*-BPI gene is also expressed in the epithelia of various organs of the oyster, namely the gills and mantle, labial palps, epithelia of the digestive system such as the stomach, the digestive gland diverticula and intestine. *Cg*-BPI transcripts have also been detected in follicles of the gonad. Whereas, the gene is transcriptionally regulated in the hemocytes, it appears to be continuously expressed in the epithelia. The epithelia represent one of the first barriers for protection against environmental microbes and in vertebrates, antimicrobial proteins and peptides have been identified as products of epithelial cells (43). In invertebrates, antimicrobial peptides (AMPs) are also known to be expressed in various epithelia. In *Drosophila melanogaster*, the expression of gene encoding AMPs is induced in the epithelia of respiratory tract, the oral region and the digestive tract, the malpighian tubules, but also the male and female reproductive tracts (44). Interestingly, a defensin named *Cg*-Def has been characterized for the mantle of the oyster *C. gigas* where it could likely be localized with the *Cg*-BPI we have identified here. The oyster, which is continuously exposed to an environment rich in microorganisms, may have developed an efficient system to limit potential



bacterial invasion. Indeed, through the continuous expression of both defensin and BPI in epithelia, the bacterial populations may be under control and equilibrium may be reached between the immune system and the natural microflora of the oysters. However, upon microbial invasion, LPS recognition may induce the transient expression of BPI from hemocytes, probably together with other antimicrobial effectors, contributing to an acute reaction. To go further into a better understanding of the immune system developed by the oysters, it will

be of great interest in particular to study any potential synergic effect between *Cg*-BPI and *Cg*-defensin against bacteria strains.

From the results presented with the identification of a BPI-related gene in the *C. gigas* oyster, this mollusc bivalve appears as an interesting model for studying the interaction between the host immune system and bacteria populations. In particular, it is attractive to determine how the oyster immune system communicates with commensal microflora and how it discriminates potential harmful bacteria.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Prof. J. Weiss for providing antibodies specific for human BPI and Prof R. Lehrer for advices for the bacteria permeabilizing assay and for providing *E. coli* ML-35p strain. Work has been supported by the Ifremer, the CNRS, and the University of Montpellier 2. It was also part of a collaborative INCO-DEV project supported by the EC, Immunaqua, N°ICA4-CT-2001-10023.

## REFERENCES

1. Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001) *J Endotoxin Res* **7**, 167-202
2. Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 32721-32727
3. Lee, S. Y., Wang, R., and Söderhäll, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, 1337-1343
4. Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R., and Dhar, A. K. (2002) *J Virol* **76**, 7140-7149
5. Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P., and Timmermans, M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 24948-24954
6. Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H., and Sato, R. (1997) *Eur J Biochem* **248**, 217-224
7. Thomas, C. J., Kapoor, M., Sharma, S., Bausinger, H., Zyilan, U., Lipsker, D., Hanau, D., and Surolia, A. (2002) *FEBS Lett* **531**, 184-188
8. Elsbach, P., and Weiss, J. (1993) *Immunobiology* **187**, 417-429
9. Ooi, C. E., Weiss, J., Elsbach, P., Frangione, B., and Mannion, B. (1987) *J Biol Chem* **262**, 14891-14894
10. Iovine, N. M., Elsbach, P., and Weiss, J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10973-10978.
11. Weiss, J. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 785-790
12. Kono, T., and Sakai, M. (2003) *Mol Immunol* **40**, 269-278
13. Inagawa, H., Honda, T., Kohchi, C., Nishizawa, T., Yoshiura, Y., Nakanishi, T., Yokomizo, Y., and Soma, G. (2002) *J Immunol* **168**, 5638-5644
14. Stenvik, J., Solstad, T., Strand, C., Leiros, I., and Jorgensen, T. T. (2004) *Dev Comp Immunol* **28**, 307-323
15. Beamer, L. J., Fischer, D., and Eisenberg, D. (1998) *Protein Sci* **7**, 1643-1646
16. Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J. F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A., and Coustau, C. (2005) *Dev Comp Immunol* **29**, 393-407
17. Gueguen, Y., Cadoret, J. P., Flament, D., Barreau-Roumiguier, C., Girardot, A. L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., and Escoubas, J. M. (2003) *Gene* **16**, 139-145
18. Bachère, E., Chagot, D., and Grizel, H. (1988) *Dev. Comp. Immunol.* **12**, 549-559
19. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864
20. Douguet, D., and Labesse, G. (2001) *Bioinformatics* **17**, 752-753
21. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
22. Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., and Bachère, E. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 2678-2689
23. Linder, S., Schliwa, M., and Kube-Granderrath, E. (1996) *Biotechniques* **20**, 980-982
24. Lehrer, R. I., Barton, A., and Ganz, T. (1988) *J Immunol Methods* **108**, 153-158
25. Little, R. G., Kelner, D. N., Lim, E., Burke, D. J., and Conlon, P. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **21**, 1865-1872
26. Gray, P. W., Flaggs, G., Leong, S. R., Gumina, R. J., Weiss, J., Ooi, C. E., and Elsbach, P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9505-9509
27. Tall, A. (1995) *Annu Rev Biochem* **64**, 235-257
28. Usui, M., Hanamura, N., Hayashi, T., Kawarada, Y., and Suzuki, K. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1397**, 202-212

29. Su, G. L., Freeswick, P. D., Geller, D. A., Wang, Q., Shapiro, R. A., Wan, Y. H., Billiar, T. R., Tweardy, D. J., Simmons, R. L., and Wang, S. C. (1994) *J. Immunol.* **153**, 734-752
30. Klein, R. D., Su, G. L., Aminlari, A., Zhang, H., Steinstraesser, L., Alarcon, W. H., and Wang, S. C. (2000) *J Burn Care Rehabil* **21**, 345-352
31. Canny, G., Levy, O., Furuta, G. T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R. B., Serhan, C. N., and Colgan, S. P. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3902-3907.
32. Beamer, L. J., Carroll, S. F., and Eisenberg, D. (1997) *Science* **276**, 1861-1864
33. Capodici, C., and Weiss, J. (1996) *J Immunol* **156**, 4789-4796
34. Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T. C., Kirschning, C. J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S. D., Herrmann, F., and Schumann, R. R. (1996) *J Immunol* **157**, 4648-4656
35. Horwitz, A. H., Leigh, S. D., Abrahamson, S., Gazzano-Santoro, H., Liu, P. S., Williams, R. E., Carroll, S. F., and Theofan, G. (1996) *Protein Expr Purif* **8**, 28-40
36. Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., and Odeberg, H. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2664-2672
37. de Haas, C. J., Haas, P. J., van Kessel, K. P., and van Strijp, J. A. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 492-496
38. Tan, N. S., Ng, M. L., Yau, Y. H., Chong, P. K., Ho, B., and Ding, J. L. (2000) *Faseb J* **14**, 1801-1813
39. Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Cristol, J.-P., Thérond, P., and Torreilles, J. (1998) *Ann. Biol.Clin.* **56**, 305-319
40. Fierer, J., Swancutt, M. A., Heumann, D., and Golenbock, D. (2002) *J Immunol* **168**, 6396-6403
41. Levy, O., Canny, G., Serhan, C. N., and Colgan, S. P. (2003) *Biochem Soc Trans* **31**, 795-800
42. Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., and Bachère, E. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 961-972
43. Ganz, T. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3357-3358
44. Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000) *Immunity* **13**, 737 - 748

## Legends Figures

**Figure 1.** (A) Deduced amino acid sequence of *Cg*-BPI. Amino acid residues are numbered on the right. The underlines represent the signal peptide and the putative domains implicated in the LPS-binding activity are printed in bold. The putative glycosylation sites are in the box and the motif printed in bold represents the N-glycosylation sites further confirmed by mass analysis. The lysine and cysteine residues are indicated in shaded and bold. (B) Schematic representation of *Cg*-BPI sequence indicating the two conserved domains: BPI 1 (1-233) and BPI 2 (248-452). The domain BPI 1 contains the LPS-binding domain, antibacterial activity and two conserved cysteines (shaded). Lysine residues from the conserved LPS-binding region are indicated by bold face and shaded (45, 89, 92 and 96). The numbers correspond to mature proteins.

**Figure 2.** Rooted phylogenetic tree of proteins from the LTP/ LPS-binding protein family. The tree was built by the neighbour-joining method based on the alignment of the mature amino acid sequences using CLUSTAL X. Numbers on branches are bootstrap percentages (1000) that support a partitioning. The Genbank accession numbers are shown.

**Figure 3.** Recombinant *Cg*-LBP/BPI protein from *P. pastoris* transformant. A. Coomassie blue-stained gel SDS-PAGE under reduction condition of partially purified recombinant protein after ammonium sulphate precipitation and ultrafiltration (lane 1). Western blotting following SDS-PAGE under reduction condition (lane 2). A polyclonal antibody against human BPI (1:5000) was used in the immunoblot procedure. B. MALDI mass spectrum of the peptide mixture generated by in-gel digestion with trypsin. Following gel excision, the band was treated according to the procedure reported in the Materials and Methods section. The crude desalted tryptic digest (0.5  $\mu$ L) was analyzed in the reflectron positive mode using prespotted anchor chip plates. Sample preparation was performed according to the manufacturer instructions. When possible, the sequences identified by their molecular masses were marked with an arrow (R2-8, means that the mass measured is corresponding to the segment comprising residues 2 to 8).

**Figure 4.** SPR analysis of *Cg*-BPI –lipid interactions. Sensorgram depicting the interactions of Lipid A (4A) and LPS (4B) (10  $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml and 1  $\mu$ g/ml) with *Cg*-BPI immobilized onto a CM5 chip. The LPS and Lipid A were injected at a flow rate of 50  $\mu$ l/min. As a negative control correspond to the channel without protein under same condition.

**Figure 5.** Effect of *Cg*-BPI on membrane permeabilization. *E. coli* ML-35p was incubated with 2.5 mM ONPG and 22  $\mu$ M Nitrocefin and then exposed to 10  $\mu$ g/ml *Cg*-BPI. The permeabilization is graphed relative to rate in permeabilized bacteria subtracted respect to control. Manifested Nitrocefin hydrolysis, reflecting outer membrane permeabilization. Optical density was monitored at 405 nm for ONPG and 492 nm for Nitrocefin.

**Figure 6.** Detection and analysis expression of *Cg*-LBP/BPI mRNA in different tissues. Northern blot analysis of *Cg*-LBP/BPI gene using the mRNA isolated from haemocytes. The signal hybridization correspond to the attended size to the messenger (A). *Cg*-LBP/BPI mRNA content in cytocentrifuged haemocytes were visualized by silver grains resulting from the contact of 35 S-emission with autoradiographic emulsion. Low silver grains are seen in haemocytes of nonstimulated animals (B1); comparatively, at 24 h after microbial challenge by balneation, stronger signals are observed in some haemocytes (B2). (C) Level expression in haemocytes to the *Cg*-LBP/BPI, signals obtained were quantified using NJ Image software (NCBI) and expressed that arbitrary units (AU) corresponding to area pixels the silver grains into haemocytes. Data represent means and SE. Bars, 50  $\mu$ m.

**Figure 7.** Detection de *Cg*-LBP/BPI mRNA in non-stimulated oysters by *in situ* hybridization. In the tangential section of *C. gigas* labelling appears in most tissues and particularly significant in epithelia to gills (G), mantle (M), digestive glands (Dg), gonads (Gon) and midgut ephitelia (Mg) are indicated by arrows (A). In a negative control consisting of section hybridized with *Cg*-LBP/BPI sense riboprobes, no labelling was observed as show for epithelia tissues (A'). Tangential sections of labial palp and digestive gland of *C. gigas* that show the detection of *Cg*-LBP/BPI in nonchallenge animals by *in situ* hybridization. The strong labelling were detected in the epithelial folds of the labial palps (Ep) not labelling in the vesicular connective tissue (Ct) was detected. Similar hybridization signal was seen in the digestive glands tubules (Dgt). Control sections were totally devoid of labelling (B, D) with the sense probe. Bars, 80,  $\mu$ m.

Figure 1

A

```

MOOVCLLTVVSLFVTSAQCKTPGLQTRITDRALEYATEVALDILSKQVTGQQIPDQHGS 41
GDVVFKFDITGMNVKQFTKPSSSRVSLIQNVGLSWSTSGTGLAIHGDFKYKYRKGIKIKISDHG 101
SFDLKANGINFQIKIEIGMDGTGRPTMKAVGCSCNVGSADIKFHGGAAWIYNLFSGQLEN 161
KLKDMVGGGNLLCKQLNTLIDVNGMKSLQKLPVTVQIAKRFLLDYRFLSKPSFQTKFME 221
TYHKGEVYWNAVPVDAPFAAPLLKSSDTSRMMYIWLSDYVFNTMSYNALKYNQLQYNVT 281
NKDLPSGVINTTCPQSTCIGKIIKAIGTKFPNTTVMLYMKSTSMNMTAQNGSTVVNASG 341
DIVFFAQQPGGKYTYFLTLSATMSTTISLMIENEKVFAKVLKLPISVTVKDSKIPVSPEG 401
LNFIVKGIVSVFVEPKLNELGAAGFPLPVINSVHFTNTQLTVAKDTLLIATDLKYSG 458
    
```

B

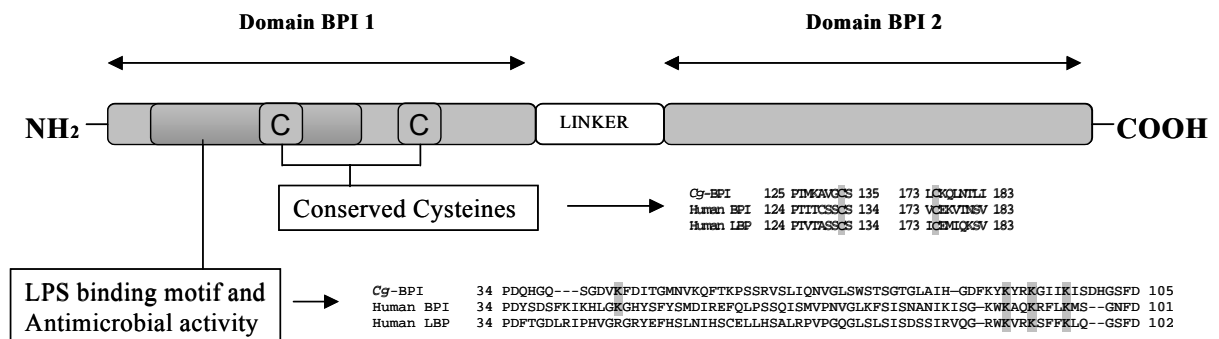


Figure 2

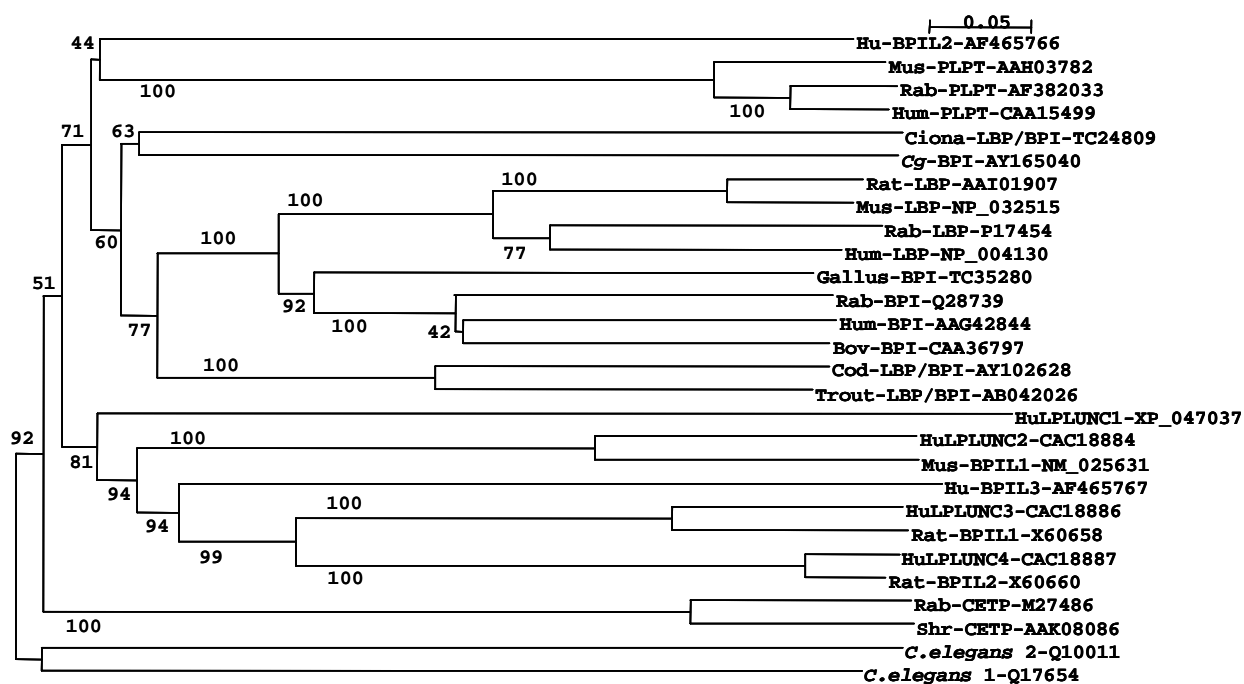
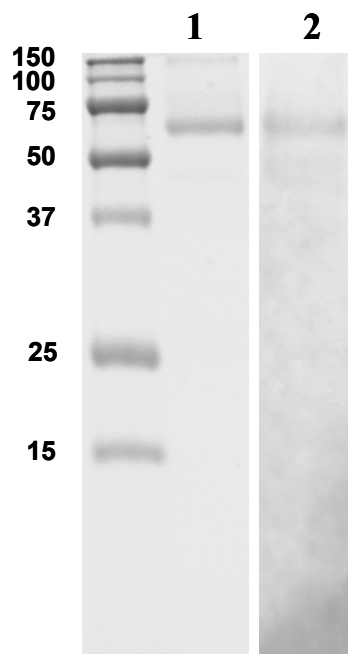
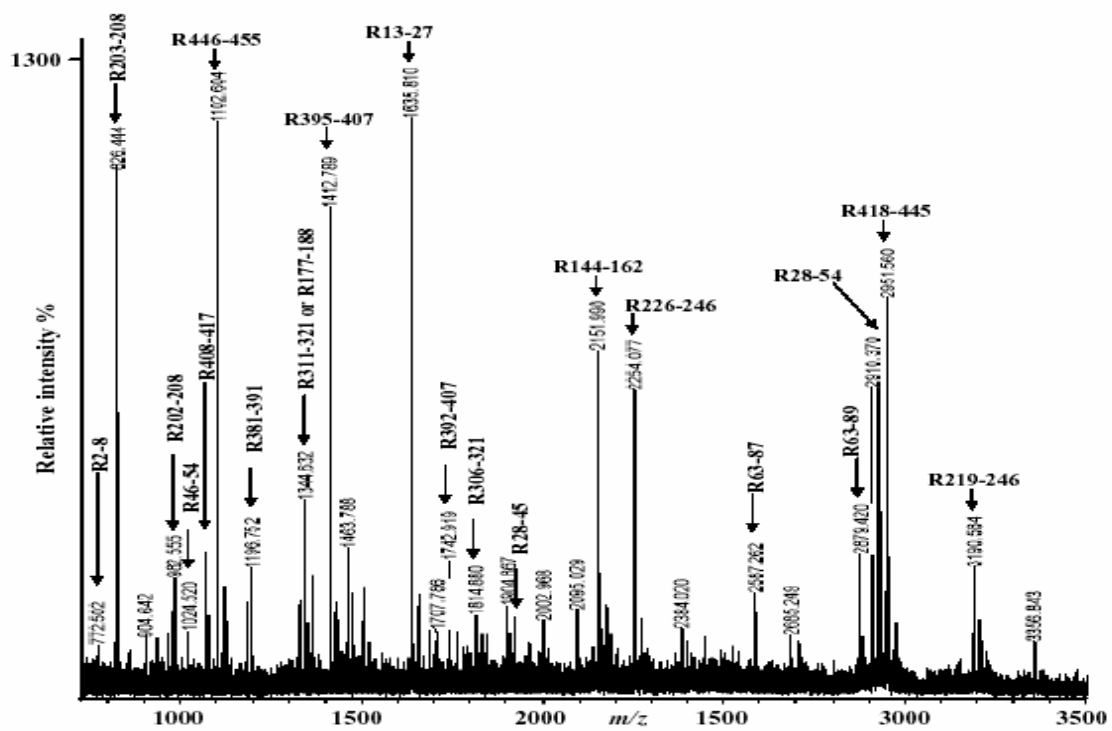


Figure 3

A



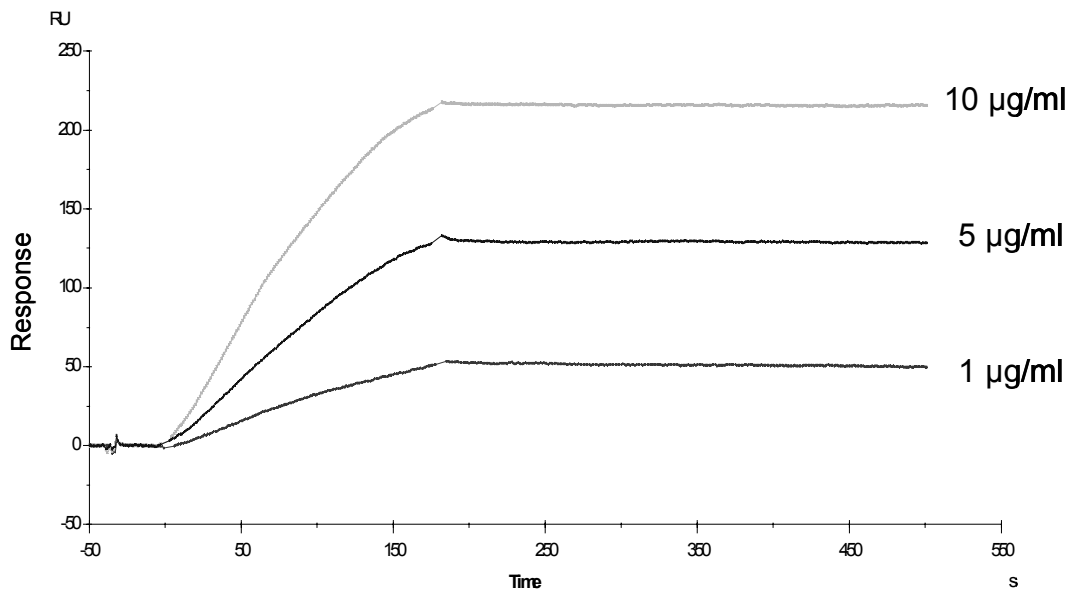
B



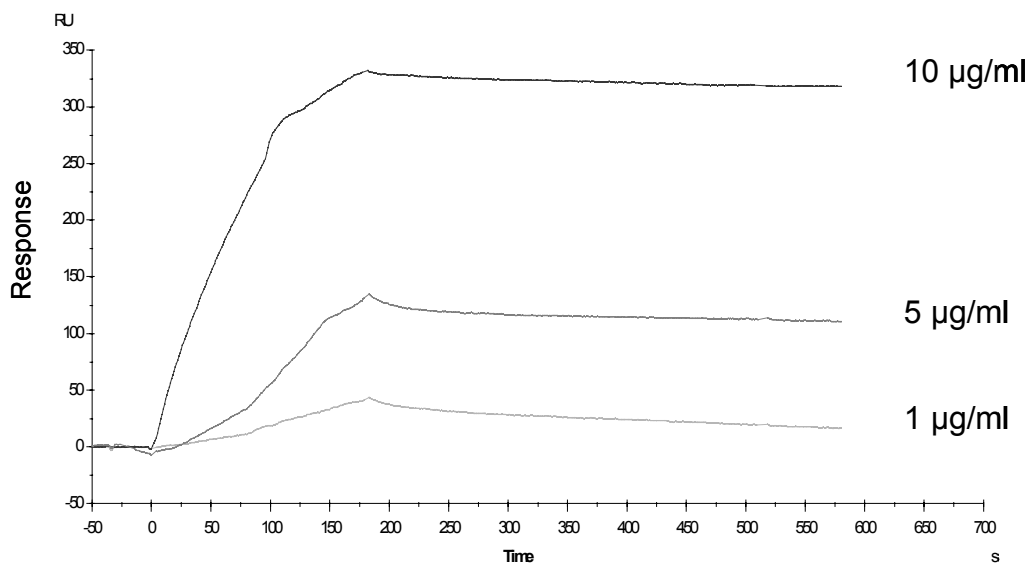


**Figure 4**

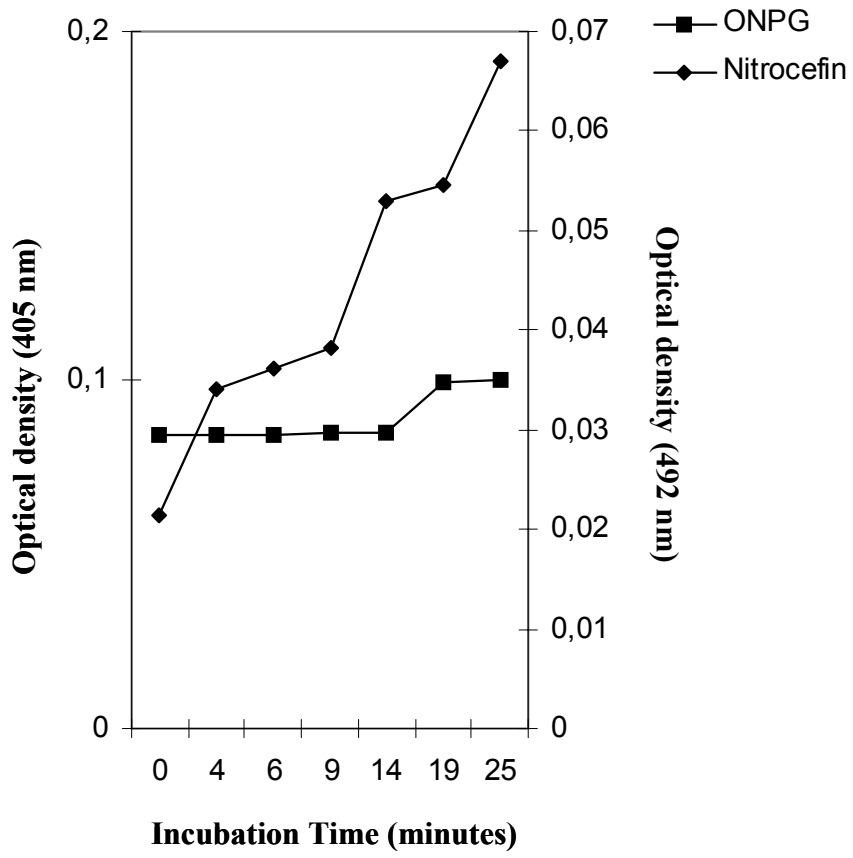
**A**



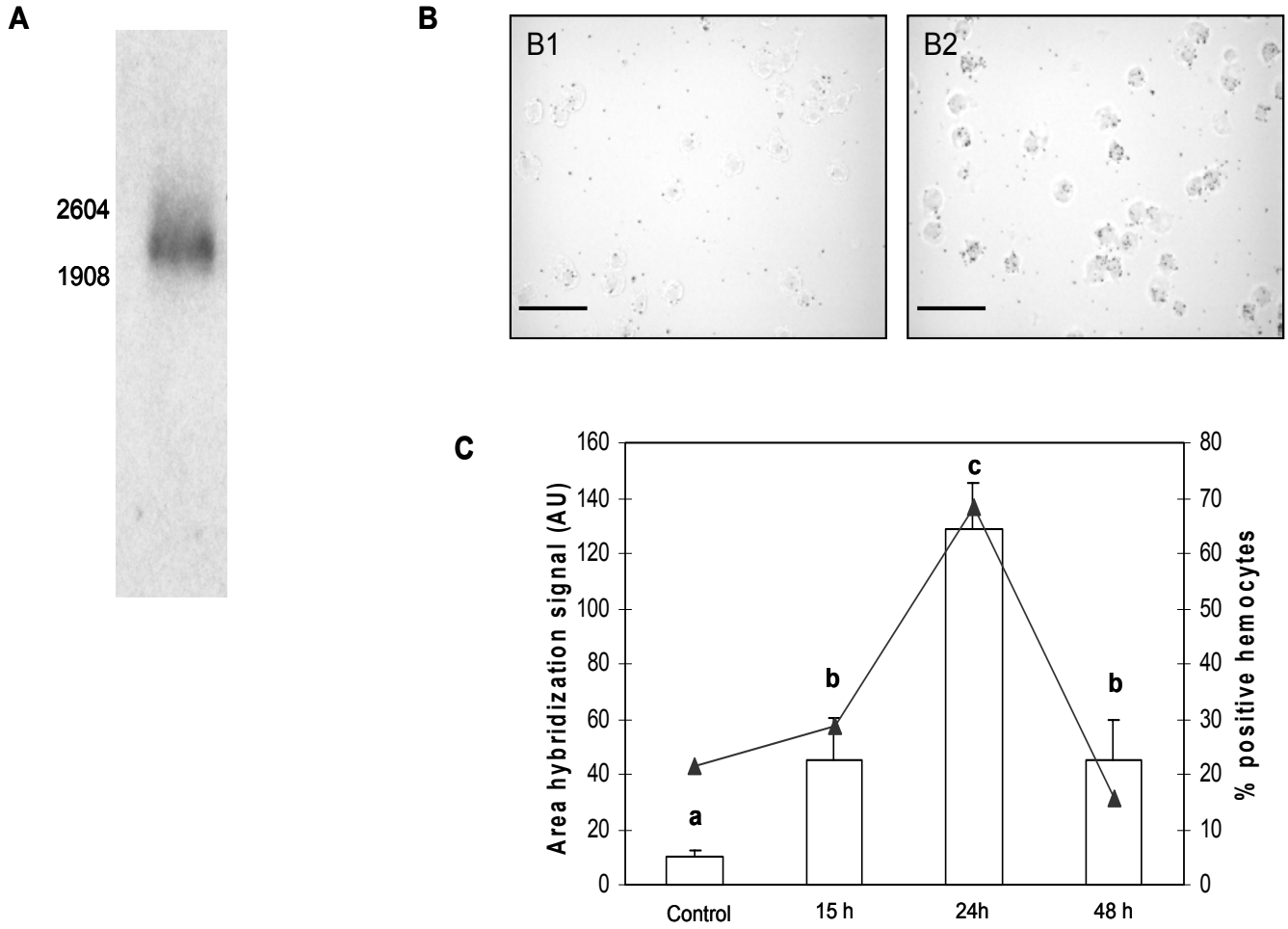
**B**



**Figure 5**

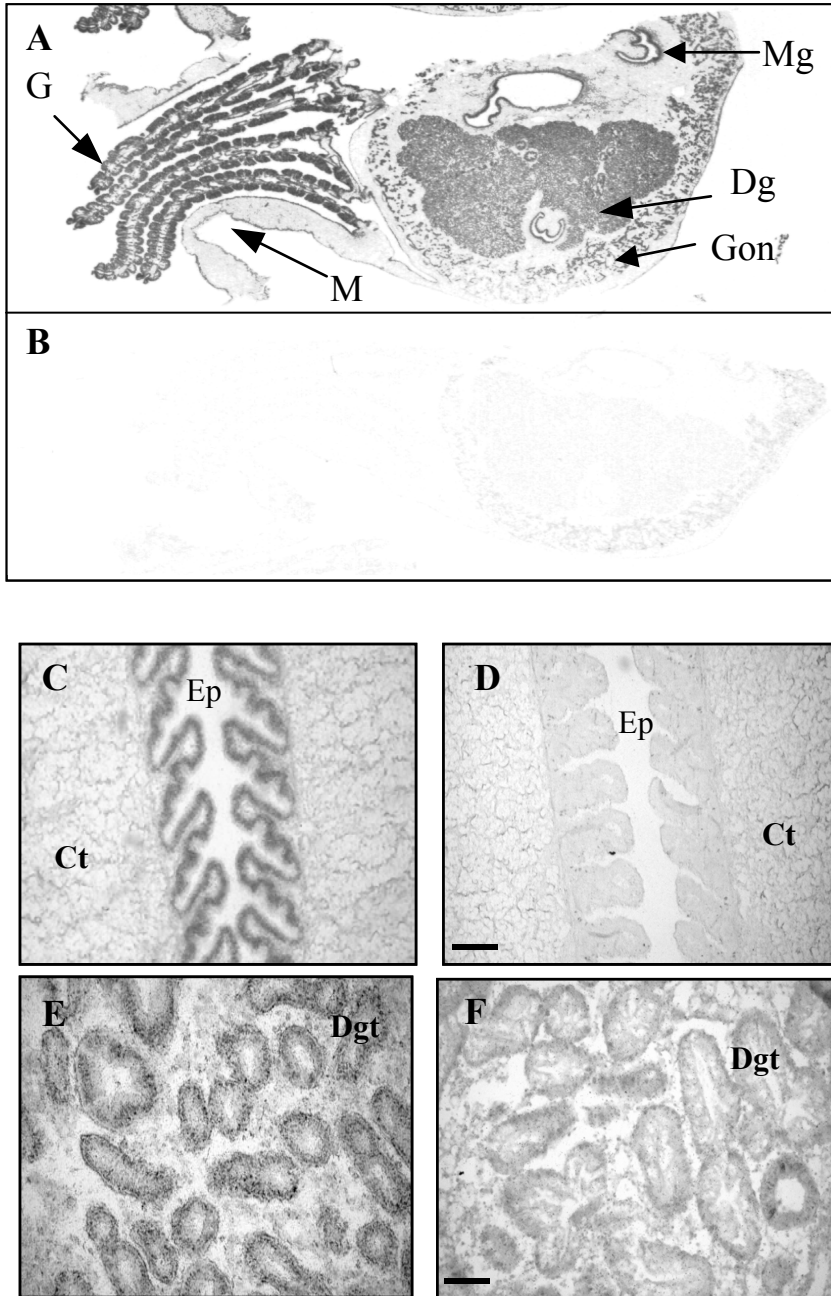


**Figure 6**



**Figure 3**

**Figure 7**



## Chapitre IV

### Caractérisation et étude de l'expression de défensines chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

#### Publication n°4

Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression.

Publication sous-presse à « *Journal of Biological chemistry* »

#### Publication n°5

Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*.

Manuscrit devant être soumis à « *Developmental and Comparative Immunology* »

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des composés essentiels du système immunitaire inné du monde vivant, animal et végétal (Bulet *et al.*, 2004). Typiquement, ces molécules tuent les micro-organismes en désorganisant ou en perforant leur membrane cytoplasmique. Les peptides antimicrobiens sont de petites protéines constituées en moyenne de 20 à 50 acides aminés qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. Ces peptides antimicrobiens peuvent être produits de façon constitutive ou induits en réponse à l'exposition de bactéries, de champignons ou de parasites. Chez les invertébrés, comme chez les vertébrés, on peut distinguer deux modes de production, les peptides synthétisés en réponse à une infection et les peptides présents de manière constitutive.

Chez la drosophile, ces peptides sont produits dans certains types hémocytaires, certains épithélia et surtout au niveau du corps gras en réponse à un choc septique et participent à la réponse systémique (Imler and Bulet, 2005). Chez les mollusques bivalves, les moules *Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis*, des peptides antimicrobiens synthétisés constitutivement dans les hémocytes ont également été caractérisés. Ces peptides cationiques, riches en cystéines, sont répartis en quatre groupes : les défensines (A et B chez *M. edulis*; MGD-1 et -2 chez *M. galloprovincialis*), les mytilines (5 isoformes chez *M. galloprovincialis*), les myticines (deux isoformes chez *M. galloprovincialis*) et les mytimicines (Mitta *et al.*, 2000a).

Jusqu'à présent, aucun peptide antimicrobien n'avait été décrit chez l'huître et les nombreuses approches de purification par HPLC développées au laboratoire ne nous ont pas

permis de d'isoler et de caractériser ce type de molécules chez *C. gigas*. Récemment, une approche EST a permis d'identifier un ADNc (A. Herpin, Bergen, Norvège) codant un peptide antimicrobien présentant de fortes homologues avec les défensines d'invertébrés. Afin d'étudier les propriétés de cet effecteur immunitaire, nous avons entrepris au laboratoire la caractérisation de cette molécule, nommée *Cg-Def*.

Les travaux, décrivant la production en système recombinant du peptide, l'étude de son spectre d'activité, la détermination de sa structure tri-dimensionnelle ainsi que l'étude de son expression, sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Ma contribution dans ce travail s'est principalement située au niveau de l'étude de l'expression du gène de la défensine en réponse à un challenge bactérien suggérant un expression continue des transcrits dans le manteau de l'huître. La deuxième partie de ce chapitre présente la caractérisation de deux nouvelles isoformes de défensines (nommées *Cg-Defh1* et *Cg-Defh2*) exprimées dans les hémocytes de *C. gigas* ainsi que l'analyse de leurs expressions en réponse à des stimulations bactériennes.



## CHARACTERIZATION OF A DEFENSIN FROM THE OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS*: RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AND GENE EXPRESSION \*

Yannick Gueguen<sup>1#</sup>, Herpin Amaury<sup>2,5#</sup>, André Aumelas<sup>3</sup>, Julien Garnier<sup>1</sup>, Julie Fievet<sup>1</sup>, Jean-Michel Escoubas<sup>1,&</sup>, Philippe Bulet<sup>4</sup>, Marcelo Gonzalez<sup>1</sup>, Christophe Lelong<sup>2</sup>, Pascal Favrel<sup>2</sup>, Evelyne Bachère<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup> Ifremer-CNRS-Université de Montpellier II ; UMR 5171 – Génome Populations Interactions Adaptation, 2 Place E. Bataillon, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5, France ; the <sup>2</sup> Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, IBFA, UMR 100 IFREMER-Université de Caen, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, 14032 Caen cedex, France ; the <sup>3</sup> Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM U554, CNRS UMR5048, Université Montpellier I, 29 rue de Navacelles, F-34090 Montpellier Cedex, France ; the <sup>4</sup> Atheris Laboratories, Case Postale 314, CH-1233 Bernex-Geneva, Switzerland ; the <sup>5</sup> Sars International Centre for Marine Molecular Biology, High Technology Centre, 5008 Bergen, Norway.

Running title: *Crassostrea gigas* oyster defensin

Address correspondence to Yannick Gueguen, Ifremer-CNRS-Université de Montpellier II ; UMR 5171 – Génome Populations Interactions Adaptation, 2 Place E. Bataillon, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5, France. E-Mail : [ygueguen@ifremer.fr](mailto:ygueguen@ifremer.fr)

In invertebrates, defensins were found in arthropods and in the mussels. Here, we report for the first time the identification and characterization of a defensin (*Cg-Def*) from an oyster. A defensin mRNA was isolated from *Crassostrea gigas* mantle using EST approach. To gain insight into potential roles of *Cg-Def* in oyster immunity, we produced the recombinant peptide in *Escherichia coli*, characterized its antimicrobial activities *in vitro*, determined its solution structure by NMR spectroscopy and quantified its gene expression *in vivo* following bacterial challenge of oysters. Recombinant *Cg-Def* was active *in vitro* against Gram-positive bacteria but showed no or limited activities against Gram-negative bacteria and fungi. The activity of *Cg-Def* was retained *in vitro* at a salt concentration similar to that of sea water. The *Cg-Def* structure shares the so-called Cysteine-Stabilized alpha-beta motif (CS- $\alpha\beta$ ) with arthropod defensins, but is characterized by the presence of an additional disulfide bond, as previously observed in the mussel defensin (MGD-1). Nevertheless, despite a similar global fold, the *Cg-Def* and MGD-1 structures mainly differ by the size of their loops and by the presence of two aspartic residues in *Cg-Def* as well as by an unusual dibasic sequence at the C-terminus. Distribution of *Cg-def* mRNA in various oyster tissues revealed that *Cg-def* is mainly expressed in mantle edge where it was detected by mass spectrometry

analyses. Furthermore, we observed that the *Cg-def* messenger concentration was unchanged after bacterial challenge. Our results suggest that *Cg-def* gene is continuously expressed in the mantle and would play a key role in oyster by providing a first line of defence against pathogen colonization.

### INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune system that have been conserved during evolution (1). They constitute a first line of host defence against pathogens in plants and animals (2, 3). We estimate that more than 1,000 antimicrobial peptides have been described at the level of their primary structure (2). They are gathered in the Antimicrobial Sequence Database (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>). AMPs can be classified into three major groups: (i) linear peptides that form amphipathic  $\alpha$ -helices, (ii) cyclic peptides containing cysteine-residue engaged in disulfide bonds and (iii) peptides with an overrepresentation in certain amino acids (proline, arginine, glycine or histidine). Despite their great diversity in terms of size, primary structure, amino acid composition and mode of action, most AMPs are characterized by the preponderance in cationic and hydrophobic amino acids (2). In most of the cases, this amphipathic character is considered as crucial for the interaction of the effective peptide with the membrane



of sensitive micro-organisms. This first interaction seems to be essential whatever the exact mode of action, (i) through disruption of their negatively charged cytoplasmic membranes or (ii) through killing following translocation into the bacteria without membrane lyses and binding to a specific target protein (4). Depending on their tissue distribution, AMPs ensure either a systemic or a local protection of the organism against pathogens.

Among the AMPs, defensins represent an important peptide family. They are abundant and widely distributed in human and animal tissues that are involved in host defence against microbial infection. Defensins are compact cationic peptides, approximately 3-5 kDa in size, containing three or four disulfide bridges, and are active against a wide range of bacteria and fungi (5). The vertebrate defensins can be grouped into three subfamilies, the  $\alpha$ -defensins and  $\beta$ -defensins, which are distinguished on the basis of the connectivity of their six cysteine residues, and more recently the cyclic  $\theta$ -defensins, (6). The  $\alpha$ -defensins are produced constitutively and stored in neutrophils of many animals and in human Paneth cells.  $\beta$ -defensins, that have been identified in many cell types, including epithelial cells and neutrophils, were reported to be inducible or constitutively expressed (3, 7, 8). In mammals, apart from their antimicrobial activities, defensins play an important role in inflammation, wound healing and regulation of specific immunity reactions (9). In contrast with the classification of the vertebrate defensins, based on their secondary structure, the grouping in clear distinct subfamilies of the invertebrate defensins is based on their biological properties, antibacterial *versus* antifungal (2). The invertebrate defensins differ from the vertebrate defensins by their disulfide bridging, (10). Defensins are the most widespread family of invertebrate AMPs and more than 70 different defensins have been isolated in arthropods (insects, ticks, spiders, scorpions) and mollusks (2). Most of the insect defensins were isolated from the hemolymph of experimentally infected animals, whereas in scorpions, termites and mollusks, defensins are present in granular hemocytes of non-infected animals (2). In mollusks, AMPs have only been reported in bivalves, such as in the mussels *Mytilus edulis* (11) and *M. galloprovincialis* (12). Interestingly, defensins from the Mediterranean mussels have been found to display sequence homology to defensins from arthropods, even though they belong to distant phylogenetic groups. Until now, in oyster, antimicrobial activities

have been detected in the hemolymph of some species, however, AMPs have never been fully characterized despite many attempts to purify from hemolymph and other tissues such molecules by RP-HPLC approaches (13).

In the present study, we report the characterization of the first AMP in oyster. The *Crassostrea gigas* defensin (*Cg-Def*) mRNA has been isolated from mantle edge using the Expressed Sequence Tag approach. *Cg-Def* displays sequence homology with members of the arthropod defensin family and shares with the defensins (MGD-1 and -2) from the mussel *M. galloprovincialis*, a fourth pair of cysteine residues. To shed light into the evolutionary conservation of defensins in invertebrates, and the function of this peptide in the defence reactions of the oyster, we expressed *Cg-Def* in *Escherichia coli*, and determined using the refolded peptide, its spectrum of activity against a panel of bacteria and fungi. To draw some structure-function features, the 3D structure of the *Cg-Def* was determined in aqueous solution by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and molecular modelling, and then compared to MGD-1, its counterpart from mussels. Finally, the *Cg-Def* gene expression was analyzed in response to experimental bacterial challenge of oysters.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals and RT-PCR Amplification of *Cg-def***—Adult oysters, *Crassostrea gigas*, were purchased from a local oyster farm in Normandie (France) or Palavas (Gulf of Lion, France) and kept in sea water at 15°C. A cDNA encoding part of a putative defensin was identified by randomly sequencing clones from a *C. gigas* mantle edge cDNA library constructed in  $\lambda$ -ZAP II (University of Caen). Specific primers were then used to isolate the full-length *Cg-def* cDNA from the same library. Briefly, the 5' missing end of the transcript was identified using the orientated *C. gigas* mantle edge cDNA library as template and using gene specific oligonucleotide (*Cg-Def*R1: 5'-ACCAGAGCGTGGCTGCATCACAG-3') and vector specific oligonucleotide (T3: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGG-3') as primers. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gel. Fragment of the expected size was extracted from the gel using Qiagen Kit, cloned into the pGEM-T easy using TA cloning kit (Promega, Madison, USA) and sequenced.

### Screening of *C. gigas* Genomic Library

A genomic library of *C. gigas* was constructed in  $\lambda$ -DASH<sub>II</sub> (Stratagene, La Jolla, USA). A total of  $1.8 \times 10^6$  independent clones were recovered. After amplification to  $4.5 \times 10^{10}$  pfu/mL,  $2.5 \times 10^5$  recombinant  $\lambda$ -DASH phages were plated at  $5 \times 10^4$  per dish, adsorbed to nitrocellulose membranes and screened at high stringency with digoxigenin-11-dUTP labelled 322 bp encoding the full length *Cg-def* cDNA. Positive clones were purified (Qiagen  $\lambda$  Kit, Courtaboeuf, France) subjected to restriction analysis and Southern blot hybridization using the original probe to confirm that the  $\lambda$ -DASH clones contained *Cg-def* specific sequence. Genomic organization of positive clones was subsequently determined by direct sequencing. Exon/intron boundaries were determined by comparing the genomic sequence to the corresponding cDNA one.

### Determination of *Cg-def* Expression in Different Tissues

Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions. After treatment during 20 min at 37°C with 1U of DNase I (Sigma-Aldrich) to prevent genomic DNA contamination, 1 $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using 1 $\mu$ g of random hexanucleotidic primers (Promega, Madison, USA), 0.5 mM dNTPs and 200U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37°C for 1 h in the appropriate buffer. The reaction was stopped by incubation at 70°C for 10 min. Then, quantitative RT-PCR analysis was performed using the iCycler apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). iQ<sup>TM</sup> SYBR Green supermix PCR kit (Biorad) was used for real time monitoring of amplification (5 ng of template cDNA, 40 cycles: 95°C/15s, 60°C/15s) with the following primers: QsDef 5'-CCACAATCACTGCAAGTCCATTA-3' and QaDef 5'-CTTCCATTACAATCGGTACATG-3' as sense and antisense primers, respectively. Accurate amplification of the target amplicon was checked by performing a melting curve. Using QsGAPDH (5'-TTCTCTTGCCCTCTTGC-3') and QaGAPDH (5'-CGCCAATCCTTGTTGCTT-3') primers, a parallel amplification of oyster GAPDH transcript (EMBL CGI548886) was carried out to normalize the expression data of the *Cg-def* transcript. The relative level of *Cg-def* expression is calculated for 100 copies of the GAPDH housekeeping gene following the formula:  $N=100 \times 2^{(Ct_{GAPDH} - Ct_{Cg-Def})}$ .

### Recombinant Expression of *Cg-Def*

Recombinant *Cg-Def* was expressed in *E. coli* as N-terminal His<sub>6</sub>-tagged fusion protein using the pET-28a system (Novagen, Madison, USA). By PCR amplification, a Met-coding triodeoxynucleotide was incorporated 5' of the *Cg-def* cDNA and cloned in-frame with the N-terminal His<sub>6</sub> in the *EcoRI/SalI* sites of pET-28a. The *Cg-def* coding cDNA sequence was amplified by PCR using forward primer DefFw1 (5'-GCGCGAATTCATGGGATTTGGGTGTCCGGG) paired with reverse primer DefRv1 (5'-ATATATGTCGACTTACTTCTTTCCATTACAATCGG). The reaction was performed by incubating the reaction mixtures at 94°C for 4 min, followed by successive cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min for 26 cycles using Isis<sup>TM</sup> DNA polymerase (Qbiogene). The underlined codon in the forward primer denotes a Met codon to incorporate a CNBr cleavage site immediately upstream of the N-terminus of the designed peptide according to the method described for recombinant mouse  $\alpha$ -defensin production (14).

Recombinant *Cg-Def* was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen) transformed with the pET-28a/*Cg-Def* construct. The cells were grown at 37°C to OD<sub>600</sub> 0.9 in Luria-Bertani (LB) medium (10 g of bacto tryptone, 5 g of bacto yeast extract 10 g of NaCl) supplemented with 50  $\mu$ g/ml of kanamycin. Expression of fusion proteins was induced with 0.5mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside. After growth at 37°C for 3 h, bacterial cells were harvested by centrifugation and stored at -20°C. The cells were lysed by resuspending bacteria pellets in 6 M guanidine HCl in 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, followed by sonication at 40% amplitude for 2 min using a Vibra cell Sonifier 450 (Branson Ultrasonics, Annemasse, France). The lysate was clarified by centrifugation in a Sorvall SA-600 rotor at 10,000g for 30 min at 4°C prior to protein purification.

### Purification and Folding of Recombinant *Cg-Def*

His-tagged *Cg-Def* fusion protein was purified by affinity chromatography by incubating cell lysates with nickel-nitrilotriacetic acid resin (Novagen) at a ratio of 25:1 (v/v) in 6 M guanidine HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) for 4 h at 4 °C. Fusion proteins were eluted with two column volumes of 6 M guanidine HCl, 1 M imidazole, 20 mM Tris-HCl (pH 6.4) dialyzed against 5% acetic acid (HOAc) in SpectraPor dialysis membranes (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, USA) and

lyophilized. The methionine residue introduced at the Cg-Def N-terminus was subjected to CNBr cleavage by dissolving the lyophilized His<sub>6</sub> fusion proteins in 50% formic acid, addition of solid CNBr to 10 mg/ml (final concentration), and incubation of the mixtures for 8 h in the darkness at 25°C. The cleavage reaction was terminated by adding 10 volumes of water, followed by freezing and lyophilization. Then, the cleaved fusion peptide mixture was reduced in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 8 in the presence of 100 mM DTT. The reaction mixture was purified to homogeneity using a C<sub>8</sub> reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the fractions of interest lyophilized. The peptide was resolved with a 0-55% acetonitrile gradient developed over 30 min at a flow rate of 5 ml/min on a UP10C8 column (Interchrom modulocart uptisphere 10 C<sub>8</sub>, 250 x 10 mm). The refolding of the Cg-Def was performed at room temperature in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 8 during 48 h. Then, the refolded Cg-Def was purified to homogeneity using an additional RP-HPLC step using the same column and eluting conditions as mentioned above. Alternatively, the cleaved fusion peptide mixture was directly folded at pH 8.1 in a buffer solution containing 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> and 3 mM reduced and 0.3 mM oxidized glutathione in the presence of 2 M urea and 25% N,N-dimethylformamide (DMF) (15). Then, the folded Cg-Def was purified to homogeneity by RP-HPLC using a C<sub>8</sub> column, as described above. Peptide purity was controlled by acid-urea PAGE and peptide concentration estimated by amino acid analysis and UV absorption at 280 nm based on the extinction coefficients of the molecule. Molecular masses of the purified peptides were determined using matrix-assisted laser desorption ionization mode mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

**Antimicrobial Assays**—Antimicrobial activity of recombinant Cg-Def was assayed against several bacteria including the Gram-positive *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *Bacillus megaterium*, *Brevibacterium stationi*, *Microbacterium maritopicum*, the Gram-negative *E. coli* 363, *Vibrio alginolyticus* and *Salmonella typhimurium*. The activity of the peptide was also investigated against the following filamentous fungi *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium crustosum*. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined in duplicate

by the liquid growth inhibition assay based on the procedure described by Hetru and Bulet (1997) (16). Poor broth (PB: 1% bactotryptone, 0.5% NaCl w/v, pH 7.5) nutrient medium was used for standard bacteria, and saline peptone water (1.5% peptone, 1.5% NaCl, pH 7.2) was used for marine bacteria. Antifungal assay was performed in potato dextrose broth (Difco, Sparks, USA) at half strength supplemented with tetracycline (10 µg/ml final concentration). Growth was monitored spectrophotometrically at 620 nm on a Multiscan microplate reader colorimeter (Dynatech).

Bactericidal or bacteriostatic effect was measured by Colony Forming Unit (CFU) counting following a 15 h incubation at 30°C. A bactericidal kinetic was assayed with *M. lysodeikticus*. Ten microliters of purified peptide, at a concentration 10 times over the MIC value, was mixed with 90 µl of an exponential phase culture of *M. lysodeikticus* at a starting OD<sub>600</sub>=0.01 in PB nutrient medium and incubated at 30°C. Aliquots of 10 µl were plated after 0 min, 2 min, 10 min, 90 min, and 15 h of incubation on nutrient agar plates. The number of CFUs was established after a 15 h incubation at 30°C. As a control, the bacterial culture was incubated with 10 µl of sterile water.

**NMR Spectroscopy**—NMR samples of Cg-Def were prepared either in a 95:5 H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O mixture (v/v) or in 99.98% D<sub>2</sub>O to yield a 0.6-0.8 mM solutions. The pH was adjusted to the desired values by addition of DCl or NaOD and measured at room temperature with a 3-mm electrode. They are given uncorrected for the deuterium isotopic effect. Proton chemical shifts were referenced with respect to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate according to the IUPAC recommendations. <sup>1</sup>H NMR experiments were performed on a Bruker Avance 600 spectrometer equipped with a triple resonance cryoprobe and spectra were recorded in the temperature range of 10 to 30°C. In all experiments, the carrier frequency was set at the center of the spectrum at the water frequency. Double-quantum filtered-correlated spectroscopy (DQF-COSY) (17, 18), z-filtered total-correlated spectroscopy (z-TOCSY) (19, 20) and nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) (21) spectra were acquired in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method (22). For spectra recorded in H<sub>2</sub>O, the water resonance was suppressed by the WATERGATE method (23), except for the DQF-COSY spectra where a low-power irradiation was used. The z-TOCSY spectra were obtained with a

mixing time of 90 ms and NOESY spectra with mixing times of 100, 150 and 300 ms. Data were processed by using the XWINNMR software. The full sequential assignment was achieved using the general strategy described by Wüthrich (24). To identify the slow exchanging amide protons, the sample was dissolved in D<sub>2</sub>O at 25 °C and first a TOCSY (80 mn) and then a NOESY (180 mn) experiments were recorded for their identification.

**Structure Calculation and Analysis**—The NOESY cross-peaks were measured from two NOESY spectra (pH 3.25, 20 and 25°C) with a mixing time of 150 ms, and subsequently divided into five classes, according to their intensities. Very strong, strong, medium, weak, and very weak NOEs were then converted into 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, and 5.0 Å distance constraints, respectively. The  $\phi$  angle restraints were derived from the 3JNH-C $\alpha$ H coupling constants, and the  $\chi_1$  angle restraints were derived from the combined analysis of the 3JH $\alpha$ -H $\beta$ , $\beta'$  coupling constants and intra-residues NOEs, respectively. To calculate the 3D structures, distance and dihedral angle restraints were used as input in the DYANA program that uses simulated annealing combined with molecular dynamics in torsion angle space (25). In the first stage of the calculation, an initial ensemble of 20 structures was generated from a template structure with randomized  $\phi$ ,  $\psi$  dihedral angles and extended side chains. In preliminary calculations, neither hydrogen bond nor disulfide bond was used as restraint. Hydrogen bonds were considered as present if the distance between heavy atoms was less than 3.5 Å and the donor-hydrogen-acceptor angle was greater than 120°. Finally, to calculate the Cg-Def 3D structure, 456 NOE-derived distances and 13 dihedral constraints including the cis conformation of the Cys4-Pro5 amide bond ( $\omega = 0^\circ$ ) and the disulfide bonds were used as input. A calculation of 60 conformers was carried out, and the resulting 10 structures with a minimum of restrained violations (no violation > 0.3 Å) were analyzed with INSIGHT 97 (Molecular Simulation Inc., San Diego). The Ramachandran analysis was performed with PROCHECK (26) and the limits of the secondary structure elements and the van der Waals surfaces were determined with STRIDE (27). The chemical shifts and coordinates of Cg-Def are deposited in the BioMagResBank (BMRB entry: 6849) and the Protein Data Bank (PDB entry: 2B68), respectively.

**Analyses of *C. gigas* Mantle by RP-HPLC and MALDI-TOF MS**—Mantle tissue from 200 bacteria challenged *C. gigas* oysters was collected, rapidly frozen with liquid nitrogen and ground to fine powder. Then, the mantle sample was diluted in 10% acetic acid, homogenized using an ultra-turax and left at 4°C under gentle stirring for 15 h. Extracts were centrifuged at 8000 g for 20 min at 4°C and the supernatant prepurified by solid-phase extraction on Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Waters Associates) equilibrated with acidified water (0.05% trifluoroacetic acid). After washing with acidified water, peptides were eluted with 100% acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid. The Sep-Pak fraction was then lyophilized, reconstituted in ultrapure water and loaded on a C<sub>8</sub>-reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on an UP10C<sub>8</sub> column (Interchrom modulocart uptisphere 10 C<sub>8</sub> 250 X 10 mm) and elution was performed using a 0-55% acetonitrile gradient developed over 30 min at a flow rate of 5 ml/min. Fractions were hand collected, lyophilized, resuspended in 100  $\mu$ l of ultrapure water and then assayed for antimicrobial activity. Finally, the active fractions were purified in a third step by C<sub>18</sub> RP-HPLC, on a Symetry Shield RP<sub>18</sub> column (Waters, 5 $\mu$ m, 4.6x250) using a 0-45% acetonitrile gradient developed over 45 min at a flow rate of 1 ml/min. The corresponding fractions were then analyzed by MALDI-TOF-MS.

**Bacterial Challenge and Quantification of Cg-def Gene Expression**—Adult *C. gigas* oysters were stimulated by bath with killed bacteria (5.10<sup>8</sup> bacteria/liter). The stimulation was performed with three bacterial species, *M. lysodeikticus*, *Vibrio splendidus* and *V. anguillarum*. The bacterial strains were grown separately overnight, in saline peptone water (SPW) at 25°C for *Vibrio* strains and in Luria-Bertani (LB) medium for *M. lysodeikticus* (30°C). Bacteria were collected by centrifugation (10000 g, 5 min) and suspended in fresh growth medium. Bacteria concentration was calculated from the optical density at 550 nm (1 unit OD<sub>550</sub> corresponds to 5x10<sup>8</sup> bacteria/ml). Mantle tissue samples (100 to 300 mg) were then collected at two times post-stimulation (24 and 48 h) and washed in sterile sea water, cut into small pieces and incubated overnight at 4°C in Trizol reagent (1 ml/100 mg of tissue). Total RNAs were extracted following manufacturer instructions (Invitrogen™) and treated with DNase Turbo

(Ambion). The experiments were done in triplicate and, to minimize individual variability, at least ten oysters were used in each experimental condition.

Following heat denaturation (70°C for 5 min), reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA prepared with 50 ng/µl oligo-(dT)<sub>12-18</sub> in a 50 µl reaction volume containing 1mM dNTPs, 1unit/µl of RnaseOUT™ (Invitrogen) and 200 units/µl M-MLV reverse transcriptase in reverse transcriptase buffer. PCR amplifications were performed with the LightCycler™ (Roche) in the presence of SYBR-Green™ (Master SYBR Green™) with the following primers: Defm1 5'- GATGGTTTCTGCAGACATGG -3' and Defm2 5'- CACAGTAGCCCGCTCTACAAC -3' as sense and antisense primers, respectively. The gene encoding the elongation factor (EF, GenBank AB122066) was used as internal control. For EF the forward and reverse primers were EF (5'- ATGCACCAAGGCTGCACAGAAAG-3') and EFR (5'-TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT-3'), respectively. Samples were run under the following conditions: 95°C (10 min); and 39 cycles of 95°C (10 s), 62°C (5 s) and 72°C (15 s). For further expression level analysis, the crossing points (CP) were determined for each transcript using the LightCycler software. Specificity of RT-PCR product was analyzed on agarose gel and melting curve analysis. The copy ratio of each analyzed cDNA was determined as the mean of three replicates. The relative expression ratio of *Cg-def* was calculated based on the CP deviation of each RT-PCR product of RNA extracted from stimulated oyster versus the appropriate control sample, and expressed in comparison to the reference gene *EF*. The relative expression ratio of *Cg-Def* was calculated based on the delta-delta method for comparing relative expression results (28)

## RESULTS

### *Cg-def* cDNA Cloning and Primary Structure

**Analyses**—The complete cDNA of *C. gigas* defensin (*Cg-Def*) was obtained by 5' amplification of cDNA ends-PCR on a *C. gigas* mantle edge cDNA library, as described in Materials and Methods (GenBank AJ565499). The oyster *Cg-def* cDNA contained 323 bp, comprising a coding region of 195-bp, a 110-bp 3' untranslated region containing a polyadenylation consensus sequence (AATAAA) at position 66 to 72 of the 3'UTR and poly(A) tail. The 195-bp coding region encoded a 65-amino-acid propeptide (GenBank CAJ19280). The deduced amino acid sequence starts

with a 22-residue signal peptide and the cleavage site for signal peptidase is most likely located after the alanine residue preceding the glycine in position 23 as predicted by SignalP 3.0 software (data not shown). *Cg-Def* is not synthesized as a precursor with a C-terminal extension or a N-terminal pro-region as observed with the Mediterranean mussel or the *Drosophila* defensins, respectively. The amino acid sequence of the mature peptide was aligned with other defensins from the “arthropod defensin family” available in GenBank and Expasy, that contains defensins from arthropods, mollusks and fungi (Fig. 1A and 1B). As already observed for the mussel defensins MGD-1 and MGD-2, *Cg-Def* is an original member of this family due to the presence of two extra-cysteines residues. *Cg-Def* shares 50% of identity with MGD-1 from *Mytilus galloprovincialis*, but has a unique doublet of lysine residue at the C-terminal part of the molecule (Fig. 1A). Less identity was shared with defensin from the scorpion *Androctonus australis* (46%) and the tick *Ixodes scapularis* (44%). The selected members of the “arthropod defensin family” belonging to the so-called primitive defensin family show a high degree of conservation with both *Cg-Def* and the different mussel defensins (Fig. 1A) (29). Interestingly, very recently, a 40-amino acid AMP named plectasin (GenBank number CAI83768) with marked homologies to the arthropod and mollusk defensins has been isolated from the saprophytic fungus *Pseudoplectania nigrella*.

**Genomic Organization and Analysis of the Promoter Region**—*Cg-def* gene (EMBL AM050547) harbours a unique intron whose splice junction follows the AG-GT rule (Fig. 1C). The genomic organization of *Cg-def* is similar to that of the mussel and scorpion defensin genes (29). It also displays the features of the other arthropod and mollusk defensin genes studied so far that demonstrate a genetic relatedness: (i) the exon encoding the mature defensin is never split by any intron, (ii) the intron flanking the exon encoding the mature defensin shows for all genes a strict level of phase conservation (phase 1) (29). Analysis of the 3.6 kb genomic DNA sequence upstream from the putative ATG start codon identified several consensus sequences for transcription factors commonly observed in promoters of cellular house keeping genes (Sp1), genes expressed during early embryogenesis (AP2, Gata 1, Gata 2), development (Zeste), cell cycle regulation (H1TF2, H4TF1 and 2), cell differentiation

(Gata 2, Ik1, Ik2, Ik3, IRF2, Oct1, 2, 4, 6 and 9) and genes expressed in a tissue specific manner (Pit-1, SRF).

**Production, Folding and Purification of Recombinant Cg-Def**—In order to produce sufficient amounts of Cg-Def for detailed studies (5 mg scale) of its biological activity and its 3D structure, Cg-Def was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells transformed with the pET-28a/Cg-Def construct. Recombinant His<sub>6</sub>-tagged fusion protein was purified by affinity chromatography from the bacteria cell lysates. After chemical cleavage with CNBr and refolding, Cg-Def was purified by RP-HPLC, and its purity was judged by analytical RP-HPLC, MALDI-TOF and ESI-MS mass spectrometry analyses (Fig. 2, panels A and B). The oxidative folding of Cg-Def was assessed under two different conditions. First, after complete reduction with DTT, purified denatured Cg-Def was refolded during 48 h at room temperature in the presence of a Tris-HCl 100 mM pH 8 buffer. The refolding process was followed by RP-HPLC revealing at 48 h an additional more hydrophobic peak eluting around 35 min (Fig. 2, panel A, asterisk). By ESI-MS analyses, this hydrophobic fraction was found to contain a molecule with a molecular mass of 4,634.10 Da (see Fig. 2 panel B1). The value measured by ESI-MS is in perfect agreement with the calculated average molecular mass of 4,634.34 Da. This suggests that the recombinant Cg-Def has its eight cysteine residues paired. Alternatively, as described by Wu et al. (15), the use of DMF and urea was shown to enhance 5-times the folding efficiency of Cg-Def (data not shown). Using this protocol, the purified recombinant Cg-Def was also found to have a molecular mass measured by ESI-MS that is in perfect agreement to the calculated average molecular mass (see Fig.2, panel B1). The purified refolded peptide was then submitted to antimicrobial assays and NMR spectroscopy studies.

**Antimicrobial Activity of Cg-Def**—The antimicrobial activity of the recombinant Cg-Def was determined against a panel of micro-organisms including Gram-positive, Gram-negative bacteria and filamentous fungi. The MIC values obtained are reported in Table 1. The peptide was active at very low concentration against most of the Gram-positive bacteria tested including *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* and the marine bacteria *Brevibacterium stationis* and *Microbacterium*

*maritypicum*. However, Cg-Def was not active at 20 μM against *Bacillus megaterium*. Cg-Def showed no activity at 20 μM against the Gram-negative bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Salmonella typhimurium*. At higher concentration (35 μM), the peptide was active against *E. coli*. Cg-Def displayed anti-fungal activity against *Fusarium oxysporum* at relatively high concentrations (9 μM; Table 1). Experiments were conducted to examine the bactericidal effects of Cg-Def. The bactericidal activity of the peptide was assessed by plating cultures and the number of CFUs counted after overnight incubation at 30°C. Cg-Def exerted bactericidal effects against all the Gram-positive bacteria tested, excepted *M. maritypicum* (Table 1). When *M. lysodeikticus* was incubated with Cg-Def at concentration 10 times higher than the MIC value, all bacteria were killed in few minutes (Table 2).

In order to determine if the high salinity of the sea water might modify the efficacy of Cg-Def *in vivo*, the effect of the peptide on bacterial growth was tested *in vitro* at NaCl concentrations ranging from 85 mM to 1 M. Cg-Def is highly active against *M. lysodeikticus* and *B. stationis* even at 600 mM NaCl, a concentration closed to the value measured in sea water. Interestingly, the MIC value is unchanged throughout the NaCl concentration range tested [85 mM - 600 mM] (0.01 μM for *M. lysodeikticus* and 0.2 μM for *B. stationis*; Table 3). At 1 M NaCl, *M. lysodeikticus* did not grow in the control and a low bacterial growth can be observed for the marine bacteria *B. stationis*. In contrast to most AMPs, Cg-Def seems to conserve its antibacterial activity at such a high salt concentration (30, 31).

**NMR Structural Study**—The 2D NMR spectra (TOCSY, DQF-COSY and NOESY) of Cg-Def were recorded at different temperatures, ranging from 17 to 32°C. The identification of all the spin systems of Cg-Def was obtained by analysis and comparison of DQF-COSY, TOCSY, and NOESY spectra according to the strategy described by Wüthrich (24). Nevertheless, we noticed that the 2D spectra showed, for each residue of the D38CNGK42 sequence, two spin systems approximately equally populated. This suggests a heterogeneity for this C-terminal part inferred to result from the partial deamidation to yield the Asp40 and isoAsp40 mixture. The AsnGly sequence (Asn40Gly41) has been shown to experience the highest propensity for the deamidation process through the succinimide intermediate (32). Indeed, such a

deamination process is known to occur and depend upon primary sequence, 3D structure, and solution properties such as pH, temperature, ionic strength, and buffer ions (33). The two spin systems were assigned to the initial molecule (Asn40) and to the Asp40 analogue. These two similar spin systems were identified by recording TOCSY spectra at several pH values in the 2-5 pH range to monitor the ionization state change of the carboxyl group. The spin system sensitive to the ionization state change was assigned to Asp40. The other one, unaffected in this pH range, was assigned to Asn40. Only a small amount of the third expected compound (isoAsp40) was formed. It was detected in the TOCSY experiment but not fully characterized in the NOESY.

Chemical shifts of the recombinant *Cg-Def* are reported in the Table S1 provided as “Supplementary Materials”. Both amide and alpha protons resonances were spread in a large range of chemical shifts and some atypical values were measured. When compared to statistical values, among the alpha proton resonances, those of Ala27 (1.87 ppm) and of Trp31 (3.17 ppm) were upfield shifted by around 2.5 and 1.5 ppm, respectively. The large spreading of amide signals is illustrated by the two extreme values measured for Ala27 (9.84 ppm) and for Ile18 (6.91 ppm). Altogether, the large spreadings of chemical shifts suggest a highly constrained structure, in agreement with the presence of the four disulfide bonds. This is also supported by several large non-equivalencies such as for the Gly3 and Gly23 alpha protons resonances for which non-equivalencies of 1.24 ppm and 1.29 ppm were measured, respectively. Similarly, non-equivalencies of 1.21 ppm and 1.02 ppm were also observed for  $\beta\beta'$  signals of Cys4 and Cys11, respectively. The large difference of chemical shifts measured between the alpha (at 4.14 ppm) and the beta (at 3.08 ppm) protons of Thr35 residue and in a lesser extent for Thr37 (at 4.61 and 4.05 ppm) also suggests that they belong to highly constrained parts of the molecule. By comparison, chemical shifts of Thr29 (at 4.45 and 4.52 ppm) were very close to that usually observed for a less constrained sequence. The NOESY data showed several  $d_{NN}$  and  $d_{\alpha\alpha}$  NOEs suggesting that the molecule both contains a helical and a  $\beta$ -stranded parts. Moreover, the strong  $d_{\alpha}Cys^4-\alpha Pro^5$  NOE and the absence of the  $d_{\alpha}C^4-\delta\delta-P^5$  NOE unambiguously indicated a cis conformation for the Cys4-Pro5 amide bond. Among the amide protons found in slow exchange, eight of them were successive and span the 13-21 sequence. The amide protons of Ala22, Thr35,

Cys36 and Thr37 residues were also found in slow exchange.

**Solution Structure of *Cg-Def***—A stereoview of a family of 10 *Cg-Def* conformers is reported in Fig. 3. The global structure of *Cg-Def* was well defined and displays the Cystine Stabilized- $\alpha\beta$  motif (CS- $\alpha\beta$ ) that consists of an helical structure and two  $\beta$  strands cross linked by three disulfide bonds (34) and sometimes by a fourth disulfide bond (35-37). The backbone atoms of the ten conformers were overlaid for the well-defined regions spanning residues 4-39 resulting in a pairwise average rmsd of  $0.43 \pm 0.09$  and  $0.98 \pm 0.16$  Å for the backbone and heavy atoms, respectively. The Ramachandran plot of all residues (except for the glycine and proline residues) of the ten best conformers indicated that 89.7% were located in the most favoured and the additional allowed regions, and 5.8% in the generously allowed regions. A total of 4.4% of the residues were found in the disallowed regions. Limits of secondary structure elements indicated that the *Cg-Def* structure mainly consisted of an helical part (8-18 residues), two  $\beta$ -strands (residues 22-26 and 33-37), and three loops (residues 1-7, 19-21 and 27-32 for loops L1 L2 and L3, respectively) (Fig. 1B and 3). Three successive type IV turns were identified in L1 (1-4, 3-6, and 4-7) and L3 (27-30, 28-31 and, 29-32) loops, and a type I turn was found for the 26-29 sequence. It is interesting to note that the Cys4-Pro5 amide bond adopted the unusual cis conformation. Finally, the global fold is highly constrained by the 4-25, 11-34, 15-36, and 20-39 disulfide bonds. The *Cg-Def* helix exhibits an amphiphilic character with a hydrophobic side contributing to the hydrophobic core of the molecule and a hydrophilic side accessible to the solvent including mainly, Lys10, Asn13, His14, Lys16 and, Ser17 residues. Nevertheless, the Leu9 and Ile18 hydrophobic residues are solvent exposed. The hydrophobic core mainly includes the four disulfide bonds, the Ala22 side chain and is extended to the L1 (Pro5) and L3 hydrophobic loops (Ala27, Ala28, Leu30, Trp31, Leu32). As expected, the positively (Lys10, Lys16, Arg21, Arg33, Lys42, Lys43) and negatively charged (Asp26, Asp38) residues are solvent exposed.

The *Cg-Def* structure was compared to that of MGD-1 (PDB entry: 1FJN) whose 3D structure was previously determined (37). Their superimposition showed that the helical and  $\beta$ -strands elements were very conserved (Fig. 4).

### *Cg-def* mRNA and Peptide Tissue

**Localization**—To investigate the tissue distribution of *Cg-def* expression, we analyzed by real-time RT-PCR mRNA content in various oyster tissues. Low or no *Cg-def* mRNA amount was measured in most of the organs analyzed including hemocytes, heart, digestive gland and gills whereas a high mRNA level, around 20 to 60 fold the level measured in the remaining animal tissues, was detected in mantle (Fig. 5). In non-stimulated *C. gigas* oysters, the mantle appears as the main tissue expressing *Cg-def* transcripts.

In order to demonstrate the presence of native *Cg-Def* in mantle, an acidic extract of this tissue was prepared, subjected first to RP-HPLC and then to antibacterial activity screening. Following solid-phase extraction of the acidified extracts from oyster mantle, RP-HPLC revealed the presence of two fractions with antimicrobial activity. These two fractions were subjected to molecular mass fingerprint analysis by MALDI-TOF-MS. In order to ascertain the molecular mass measured, the well-folded recombinant *Cg-Def* was used as external calibrant (see Fig. 2 panel B2). A difference of 3 Da was observed between the molecular mass measured by ESI-MS (4,634.10 Da, panel B1) and the one measured by MALDI-TOF-MS (4,637.96 Da, arrow in panel B2). Following solid-phase extraction of the acidified extracts from oyster mantle, RP-HPLC revealed the presence of two fractions with antimicrobial activity. The less hydrophobic fraction (see Fig. 2, panel C) contains a component with a molecular mass at 4637.96 corresponding to that measured by MALDI-TOF-MS for the recombinant folded *Cg-Def*. This peptide with antimicrobial activity against *M. lysodeyiticus* might likely correspond to the native form of *Cg-Def*. Interestingly, the second active fraction (more hydrophobic), that has not yet been identified, showed a close but different molecular mass of 4631.45 Da (see Fig. 2, arrow in panel D).

**Real-Time PCR Analyses of *Cg-def* transcript levels after oyster bacterial challenges**—In order to determine the expression pattern of *Cg-def* during bacterial challenge, two batches of oysters were selected. In the first one, oysters were stimulated by bath with killed bacteria (see Material and Methods) and in the second one, non-stimulated oysters were used as control. Then, qRT-PCR analyses were performed with total RNA extract from mantle collected at two times post challenge (24 and 48 h). No

striking discrepancies were observed for *Cg-def* expression between naive and bacteria challenged oysters at the different times analyzed (Fig. 6). These preliminary analyses revealed that *Cg-def* mRNA are present in naive *C. gigas* oyster and that, the level of transcript was unaffected by the bacterial-challenge performed.

## DISCUSSION

Efficient host defence mechanisms are needed to neutralize microbial invasions to which living organisms are exposed. In higher vertebrates, innate and adaptive immunity are present. In contrast, invertebrate and plant defence against pathogens takes place exclusively through mechanisms that are part of the innate immunity. The involvement of AMPs in natural resistance to infection is sustained by their strategic location in phagocytes, in body fluids and at the epithelial level, *ie* at interfaces between the organisms and its environment. In oyster, even if antimicrobial activities have been detected in the hemolymph of some species (38), no AMP has been fully characterized despite many attempts to purify such molecules by biochemical approaches from hemolymph and other tissues (13). In this report, and for the first time in an oyster, we describe the characterization of an AMP isolated from mantle tissue. Using molecular approaches, a new member of the widespread defensin family, which is present in animal and plant kingdoms, was identified. Usually, three disulfide bonds characterize this defensin family (Fig. 1A). The amino acid sequence of the mature *C. gigas* defensin displays interesting homologies with defensins from the “arthropod family” including the mussel’s defensins. Moreover, as observed with the defensins MGD-1, MGD-2 and MGD-2b from *M. galloprovincialis*, *Cg-Def* has four disulfide bonds. This additional bridge was proposed to render the peptide more stable in high osmolarity media such as in sea water (37). However, this fact is not common to all marine mollusk defensins because the mussel *M. edulis* defensins do not bear this additional disulfide bond (Fig. 1A) (11). Interestingly, *Cg-Def* possesses a N-terminal pre-segment presumed to be a signal sequence for translocation to the lumen of the rough endoplasmic reticulum, but has no C-terminal extension nor a N-terminal pro-region as observed in the mussel or the *Drosophila* defensins, respectively (39). This property would suggest a different way of processing for the oyster defensin.



To investigate its biological properties, *Cg-Def* was produced *in E. coli* and refolded *in vitro*. This recombinant approach was efficient, yielding enough material (approx. 1 mg of well-folded pure peptide per liter of culture) for functional assays and structural characterization. A challenging aspect for the production of *Cg-Def* in *E. coli* was the presence of eight cysteine residues in the mature peptide. Indeed, the correct refolding of proteins with several disulfide bonds is a general problem. As discussed by Harder *et al.*, only few reports describe the production of AMP in bacteria, a fact that reflects the difficulty of expressing and folding such cysteine rich molecules in a bacterial host system (6). Previous reports described the production of human  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins in *E. coli* (6, 40). We report here for the first time the efficient production in a bacterial-host of an AMP with four cysteine bridges that can be properly refolded *in vitro*. The activity spectrum of the recombinant *Cg-Def* was evaluated against a panel of bacteria and fungi. Consistent with studies on invertebrate defensins (2), *Cg-Def* was active *in vitro* against Gram-positive bacteria but showed no or limited activities against Gram-negative bacteria and fungi. Most interestingly, *Cg-Def* kept its antibacterial properties in the presence of high NaCl concentrations (up to 1M). This favours the hypothesis that *Cg-Def* retains its activity in *in vivo* conditions (sea water) and would play a role in the antimicrobial defence of the oyster *C. gigas*. For these reasons, *Cg-Def* represents a model of choice for structure-activity relationship studies to design a lead antibacterial drug to treat infections of bacteria in a salt-rich environment (41). This is particularly interesting for cystic fibrosis, for which it has been suggested that the primary genetic defect increases the salt content of fluid lining the airway, which reversibly inactivates antimicrobial molecules (42, 43).

As expected from the disulfide bridges array, the global fold of *Cg-Def* includes the CS- $\alpha\beta$  motif observed in the defensins isolated from mussels (37), insects (34) and plants (44). The *Cg-Def* and MGD-1 sequences were aligned and their structures compared (Fig. 1B and 4). This alignment revealed 50 % of identity (23 residues with three gaps) including eight cysteines (45). *Cg-Def* and MGD-1 share the fourth disulfide bond that contributes to the stability and to the rigidity of their 3D structure. The identical residues were mainly gathered in four segments (residues 1-5, 14-18, 23-25 and 32-36). Beyond their sequence comparison the *Cg-Def* structure was compared to that of MGD-1 (PDB entry: 1FJN) (37). Their

superimposition showed that the helical and  $\beta$ -strand elements were rather conserved and the best fit was obtained for the backbone superimposition of the residues 1-4, 7-17, 21-25, 34-36 of *Cg-Def* with residues 1-4, 6-16, 21-25, 33-35 of MGD-1 (23 residues). A rmsd of 1.04 Å was measured for the backbone. Moreover, the two structures share the Cys4-Pro5 cis-amide bond and a similar disulfide bond pattern. Nevertheless, some differences were observed for the Cys20-Cys39 disulfide bond and for the length of the three loops. While the three equivalent disulfide bonds (4-25, 11-34, 15-36 for *Cg-Def* and 4-25, 10-33, 14-35 for MGD-1) well overlaid, the fourth one (Cys20-Cys39 for *Cg-Def* and Cys21-Cys38 for MGD-1) is significantly different mainly due to the translation of Cys20 by one residue towards the center of the molecule. This is certainly due to the shorter L2 loop (one residue less) joining the helix and the first  $\beta$ -strand. The consequence is a shift of this disulfide bridge that locates on the opposite side of the  $\beta$ -sheet ("above" in *Cg-Def* and "below" in MGD-1 as displayed in Fig. 4). Conversely, the L1 and L3 loops of *Cg-Def* display one additional residue. Whereas the sequences of the L1 loops including the Cys4-Pro5 cis amide bond are well conserved (Fig. 4), the sequences of the L3 loops are totally different. This latter is much more hydrophobic (A27ATLWL32 for *Cg-Def*) than that of MGD-1 (G27WHRL31) that contains two positively charged residues. Nevertheless, due to the positions in the sequence (at the end for *Cg-Def* and at the beginning for MGD-1), it appeared that, they have opposite location with regard to the loop. In contrast, the Leu32(*Cg-Def*)/Leu31(MGD-1) side chains were similarly located (Fig. 4B). Since it has been shown that the L3 loop of MGD-1 is responsible for a large part of the antibacterial activity (46), this significant structural difference is worth being noted.

It is commonly admitted that the surface distribution of hydrophobic and hydrophilic side chains in AMPs is essential for their antimicrobial activity. The alignment showed that several of them (Phe2, Pro5, Ile18, Tyr24, Leu32 and His14, Lys16, Arg33) were conserved (Fig. 1 and see below). However, the two antimicrobial sequences mainly differ by the presence of two aspartic residues (Asp26 and Asp38) and by the addition of a dibasic peptide (Lys42 and Lys43) at the C-terminus. Although, the *Cg-Def* and MGD-1 surfaces display significant differences mainly due to the two aspartic acids, the hydrophobic L3 loop and, by the "above"/"below" locations of the Cys20-Cys39/Cys21-Cys38 disulfide

bonds, several hydrophobic (Phe2/2, Pro5/5, Leu9/Tyr8, Ile18/17, Tyr24/24, Leu32/31 and charged residues (Lys10/Arg12, His14/13, Arg21/Lys15, Arg33/32, Lys42/Arg20, Lys43/Arg37) are similarly located at the surface giving rise to a comparable location of hydrophobic and hydrophilic clusters (Fig. 4B).

Our results showed that in non-stimulated animals, the mantle appears as the main tissue expressing *Cg-Def*. Although, we were not able to isolate by HPLC significant amount of pure defensin from the oyster, we clearly detected its presence by mass spectrometry analyses of mantle tissue (Fig. 2, panel C). The results presented here are in contrast with those reported for the mollusk, *M. galloprovincialis*. In the mussel, AMPs are only produced in hemocytes where they are stored and released following bacterial challenges (45). In the well-studied insect model, *Drosophila melanogaster*, AMPs are predominantly produced in the fat body (the functional equivalent of mammalian liver) and secreted into the blood in response to a microbial challenge, which characterizes the systemic response in insects. Otherwise, the expression of these peptides is also locally regulated in the surface epithelia of several *Drosophila* tissues (47), as also observed for the expression of peptides in mammalian epithelia. For example, *Drosophila* defensin is expressed in the

labellar glands and in the seminal receptacle and spermatheca (for a review see Imler and Bulet 2005 (48)). Additionally, in mammals, AMPs are constitutively produced by blood cells (49). Apart from insects, most of the AMPs reported in the different groups of invertebrates have been isolated from hemocytes (13). Our preliminary results would suggest that *Cg-Def* is continuously expressed in the oyster mantle, *ie* at epithelial surface, indicating that this AMP has an important function in host protection against environmental microbes. Indeed, in oyster, the mantle is a site of intense exposure to external environment that represents a dynamic ecosystem for numerous bacterial species, including commensals and potential pathogens. A more detailed study of *Cg-def* gene expression in response to various microbial challenges will be performed to gain insight into the role of *Cg-Def* in oyster immunity. In addition, AMPs isolation and characterization must be investigated from other oyster tissues. These data on AMPs are of great interest to understand how the oyster immune system interacts with the commensal flora and how it responds to environmental pathogens.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. A. J. Ouellette for excellent advices during defensin recombinant expression. We also thank B. Romestand, J. de Lorgeril, G. Desserre and M. Leroy for helpful discussion and assistance.

## REFERENCES

1. Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., and Oppenheim, J. J. (2002) *Trends Immunol* **23**, 291-296
2. Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. (2004) *Immunol Rev* **198**, 169-184
3. Boman, H. G. (2003) *J Intern Med* **254**, 197-215
4. Brogden, K. A. (2005) *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250
5. Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S. M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B., and Bulet, P. (2004) *Infect Immun* **72**, 7140-7146
6. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 5707-5713
7. Izadpanah, A., and Gallo, R. L. (2005) *J Am Acad Dermatol* **52**, 381-390; quiz 391-382
8. Raj, P. A., and Dentino, A. R. (2002) *FEMS Microbiol Lett* **206**, 9-18
9. Sima, P., Trebichavsky, I., and Sigler, K. (2003) *Folia Microbiol (Praha)* **48**, 123-137
10. Dimarcq, J.-L., Bulet, P., Hétru, C., and Fofmann, J. A. (1998) *Biopolymers* **47**, 465-477
11. Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hétru, C., Hoffmann, J. A., and Bulet, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813
12. Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000) *FEBS Letters* **486**, 185-190
13. Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., and Romestand, B. (2004) *Immunol. Rev.* **198**, 149-168
14. Satchell, D. P., Sheynis, T., Kolusheva, S., Cummings, J., Vanderlick, T. K., Jelinek, R., Selsted, M. E., and Ouellette, A. J. (2003) *Peptides* **24**, 1795-1805
15. Wu, Z., Powell, R., and Lu, W. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 2402-2403
16. Hetru, C., and Bulet, P. (1997) in *Methods in Molecular Biology* (Shafer, W. M., ed) Vol. 78, pp. 35-49, Humana Press Inc., Totowa, NJ
17. Rance, M., Sorensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R., and Wuthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479-485.
18. Derome, A. E., and Williamson, M. P. (1990) *Journal of Magnetic Resonance* **88**, 177-185
19. Bax, A., and Davis, G. D. (1985) *Journal of Magnetic Resonance* **65**, 355-360
20. Rance, M. (1987) *J. Magn. Reson.* **74**, 557-564
21. Macura, S., Huang, Y., Sutter, D., and Ernst, R. R. (1981) *J. Magn. Reson.* **43**, 259-281
22. Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* **85**, 393-399
23. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
24. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & sons, New York
25. Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. (1997) *J Mol Biol* **273**, 283-298
26. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477-486.
27. Frishman, D., and Argos, P. (1995) *Proteins* **23**, 566-579
28. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) *Methods* **25**, 402-408
29. Froy, O., and Gurevitz, M. (2003) *Trends Genet* **19**, 684-687
30. Landon, C., Thouzeau, C., Labbe, H., Bulet, P., and Vovelle, F. (2004) *J Biol Chem* **279**, 30433-30439
31. Zaballo, A., Villares, R., Albar, J. P., Martinez, A. C., and Marquez, G. (2004) *J Biol Chem* **279**, 12421-12426
32. Li, B., Gorman, E. M., Moore, K. D., Williams, T., Schowen, R. L., Topp, E. M., and Borchardt, R. T. (2005) *J Pharm Sci* **94**, 666-675
33. Robinson, N. E. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5283-5288
34. Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., and Vovelle, F. (1995) *Structure* **3**, 435-448
35. Savarin, P., Romi-Lebrun, R., Zinn-Justin, S., Lebrun, B., Nakajima, T., Gilquin, B., and Menez, A. (1999) *Protein Sci* **8**, 2672-2685

36. Guijarro, J. I., M'Barek, S., Gomez-Lagunas, F., Garnier, D., Rochat, H., Sabatier, J. M., Possani, L., and Delepierre, M. (2003) *Protein Sci* **12**, 1844-1854
37. Yang, Y. S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J. F., Roch, P., and Aumelas, A. (2000) *Biochemistry* **39**, 14436 - 14447
38. Anderson, R. S., and Beaven, A. E. (2001) *Aquat Living Resour* **14**, 343-349
39. Mitta, G., Hubert, F., Dyrynda, E. A., Boudry, P., and Roch, P. (2000) *Develop. Comp. Immunol.* **24**, 381-393
40. Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Hsieh, M. M., Hagen, S. J., and Selsted, M. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 33969-33973
41. Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H., and Hancock, R. E. (1999) *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1542-1548
42. Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1997) *Cell* **88**, 553-560
43. Aarbiou, J., Rabe, K. F., and Hiemstra, P. S. (2002) *Ann Med* **34**, 96-101
44. Da Silva, P., Jouvensal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A., and Vovelle, F. (2003) *Protein Sci* **12**, 438-446
45. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., and Roch, P. (1999) *J. Cell Sc.* **112**, 4233-4242
46. Romestand, B., Molina, F., Richard, V., Roch, P., and Granier, C. (2003) *Eur J Biochem* **270**, 2805-2813
47. Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000) *Immunity* **13**, 737 - 748
48. Imler, J. L., and Bulet, P. (2005) *Chem Immunol Allergy* **86**, 1-21
49. Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 23-27
50. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., and Tempst, P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7044-7054
51. Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., and Roch, P. (1999) *Eur. J. Biochem.* **264**, 1-9

## FOOTNOTES

# These authors contributed equally to this work.

& Present address: Ecologie microbienne des insectes et interactions hôte-pathogène, UMR INRA Université de Montpellier II, 2 Place E. Bataillon, CC80, F-34095 Montpellier cedex 5, France.

\* Works in the author' laboratories are supported by the Ifremer, the CNRS, The INSERM and the University of Montpellier II and Caen. This study was part of a collaborative project supported by the European Commission, DG XII, in the program International Co-operation with Developing Countries, INCO-DC, Contract n° ICA4-CT-2001-10023 (IMMUNAQUA). This study was also part of a French program MOREST funded by Ifremer, the Regions "Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire and Poitou-Charentes and by the "Conseil Général du Calvados". Atheris Laboratories was supported by the Swiss Federal Office for Education and Science contract n° 02.0360. A. Herpin, C. Lelong and P. Favrel were financially supported by the Conseil Régional de Basse-Normandie, Agence de l'Eau "Seine Normandie" and FEDER N°4474 (program PROMESSE).

The abbreviations used are: *Cg-Def*, *Crassostrea gigas* defensin; DG, distance geometry; DQF-COSY, 2D double-quantum filter correlation spectroscopy; MALDI-TOF-MS; matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, 2D nuclear Overhauser effect spectroscopy; RP-HPLC, reverse-phase high performance liquid chromatography; rmsd, root mean square deviation; TOCSY, total correlation spectroscopy; TPPI, time proportional phase incrementation; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, CFU, colony forming unit.

**Table 1. Antimicrobial activity of recombinant Cg-Def.**

MIC values are expressed as the interval of concentration [a]-[b], where [a] is the highest concentration tested at which microbial growth can be observed and [b] is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition (50).

Microorganisms	MIC ( $\mu\text{M}$ )	Bactericidal effect of Cg-Def
<b>Bacteria</b>		
Gram-positive		
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.005-0.01	Yes
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25-2.5	Yes
<i>Brevibacterium stationis</i>	0.1-0.2	Yes
<i>Microbacterium maritopicum</i>	0.5-1	No
<i>Bacillus megaterium</i>	>20	
Gram-negative		
<i>Escherichia coli</i> 363	35-20	nd <sup>a</sup>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	>20	
<i>Salmonella typhimurium</i>	>20	
<b>Filamentous fungi</b>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	9-4.5	
<i>Botrytis cinerea</i>	>20	
<i>Penicillium crustosum</i>	>20	

<sup>a</sup> not determined

**Table 2: Kinetic of killing of Cg-Def on *M. lysodeikticus*.**

Cg-Def at a final concentration (0.1 $\mu$ M) 10 times higher than the MIC value or water (control) was added to an exponential growth phase culture of *M. lysodeikticus* in PBS medium. Aliquots were removed at various times, and the number of colony-forming units/mL ( $10^{-4}$  CFU.mL<sup>-1</sup>) was determined after incubation of the LB agar plates during overnight at 37 C.

<b>Time of incubation</b>	<b>Control</b>	<b>Cg-Def</b>
0 min	40.7	40.7
2 min	41.6	0
10 min	49.2	0
90 min	66.4	0
15 h	nd <sup>a</sup>	0

<sup>a</sup> not determined

**Table 3. Effect of sodium chloride on Cg-Def antimicrobial activity.**

MIC values were determined on the bacterial strains *Micrococcus lysodeikticus* and *Brevibacterium stationis* using liquid growth assay. In this table, only the lowest concentration of Cg-Def that causes 100% growth inhibition is indicated. Final OD<sub>600</sub> of control *M. lysodeikticus* and *B. stationis* cultures without Cg-Def in the same corresponding medium is indicated in parentheses.

Final NaCl concentration in poor broth	MIC in $\mu\text{M}$ (OD <sub>600</sub> after 24 h in the control experiment without peptide)	
	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>B. stationis</i>
85 mM <sup>a</sup>	0,01 (0,6)	0,2 (0,55)
300 mM	0,01 (0,4)	0,2 (0,5)
600 mM <sup>b</sup>	0,01 (0,15)	0,2 (0,35)
1000 mM	- <sup>c</sup>	0,06 (0,1)

<sup>a</sup> Control poor broth.

<sup>b</sup> NaCl concentration close to the value measured in sea water.

<sup>c</sup> No bacterial growth in the control experiment

### Figure legends

**Figure 1: Sequence alignment and genomic organization of representative of the defensin family AMP. (A)** Amino acid sequence alignment of defensins from arthropods, mollusks and a fungus. Oyster *Crassostrea gigas* (Cg-Def); mussels *Mytilus edulis* (DEFA-MYTED, [P81610], DEFB-MYTED, [P81611]) and *M. galloprovincialis* (MGD-1, [P80571]; MGD-2, [AAD52660]); tick *Dermacentor variabilis* (varisin, VSNA1, [AAO24323]), *Ornithodoros moubata* (Om-DEF-C, [AB041814]), *Haemaphysalis longicornis* (HIDfs, [BAD93183]), *Boophilus microplus* (BOMICR, [AAO48943]) and *Ixodes scapularis* (IXSCA, scapularisin, [AAV74387]); dragonfly *Aeschna cyanea* (DEFI-AESCY, [P80154]); scorpion *Androctonus australis* (DEF4-ANDAU, [P56686]) and *Leiurus quinquestriatus* (DEF4-LEIQH, [P41965]) and the saprophytic fungus *Pseudoplectania nigrella* (plectasin, [CAI83768]). The nomenclature derived from the SwissProt database and the accession numbers are in brackets. Identical residues are shaded. The two additional cysteine residues found in the Cg-Def, MGD-1 and MGD-2 are in bold. **(B)** Cg-Def and MGD-1 sequence alignment manually modified according to the structure comparison (this work). The similar elements of structure are grey shaded and reported above. Conserved residues are in bold. Notice the shift for one cysteine (C20/C21) out of the eight. **(C)** Organization of *Cg-def* gene and the related genes coding MGD-2 and myticin A from the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Boxes represent the coding region; the signal sequence appears in black and the mature peptide in white. Grey lines represent the untranslated regions of the exons. Potential sites of cleavage (mono [R] or dibasic [RR] and [KK]) involved in the splitting of the mature peptide (white) from the C-terminal peptide spotted) are indicated. Accession numbers: Cg-Def: CAJ19280, Cg-Def genomic sequence AJ582630. Gene organization of MGD-2b is from Mitta *et al.* (39) and incomplete structure of Myticin A (dotted box) is deduced from Mitta *et al.* (51)

**Figure 2: Quality control of recombinant *Crassostrea gigas* defensin (Cg-Def) and detection of the natural form in acidic extracts of mantle tissue. (A)** Following reduction, refolding of the recombinant peptide was performed at room temperature in the presence of Tris-HCl buffer. The refolding was monitored by RP-HPLC using an acetonitrile gradient in acidified water (for details see Materials and Methods). The grey and black lines correspond to the linear and to the refolded (see \*) recombinant peptides, respectively. The molecular mass of the refolded peptide was measured by ESI-MS **(B1)** and MALDI-TOF-MS **(B2)**. The molecular mass (average value) measured at 4,634.10 Da is in perfect agreement with the calculated average molecular mass at 4,634.34 Da. A difference of 3 Da was observed between the molecular masses measured using MALDI-TOF-MS ( $m/z$  4638.46, see **B2**) versus the one detected in ESI-MS at 4,634.10 Da ( $m/z$  4,635.10). **(C, D)** Following purification by RP-HPLC of an acidic extract of mantle tissue, the two fractions active against the tested microorganisms were analyzed by MALDI-TOF-MS. The first fraction (see the arrow head in panel **C**) eluting at the same retention time as the recombinant-refolded Cg-Def contains ions of  $m/z$  4,638.96 corresponding to the one measured by MALDI-MS for the recombinant peptide. In the second bioactive fraction (see the arrow head in panel **D**), ions of  $m/z$  4,631.45 were detected.

**Figure 3: Structure of Cg-Def.** Stereo-view of the ten best conformers of Cg-Def. The 4-39 heavy atoms of the backbone were used for the superimposition. The mean pairwise rmsd is of  $0.43 \pm 0.09$  Å. The four disulfide bridges are labeled and displayed as dashed lines. Hydrophobic, positively and negatively charged side chains are colored in green, blue and red, respectively.

**Figure 4: Structure comparison of Cg-Def and MGD-1. (A)** Global fold comparison of the Cg-Def (left) and MGD-1 (right) structures. The structures prepared using MOLSCRIPT show the arrangement of the four disulfide bonds (in yellow). **(B)** - With a similar orientation, comparison of their Van der Waals surface showing the location of the hydrophobic (green) and positively charged (blue) residues. For this orientation, the W31 side chain of Cg-Def is hidden. Most of the labeled residues are conserved in the two peptides. Aspartic and cysteine residues are in red and yellow, respectively.



**Figure 5: Tissue expression of *Cg-def* mRNA analyzed by real time quantitative RT-PCR.** Each value is the mean of four pools of four animals. Hc : Hemocytes ; M : Mantle ; PAM : Posterior Adductor Muscle ; DG : Digestive Gland ; G : Gills ; H : Heart ; LP : Labial Palps. ND: Not detected. Bars represent the relative *Cg-def* transcript levels normalized to GAPDH transcript levels.

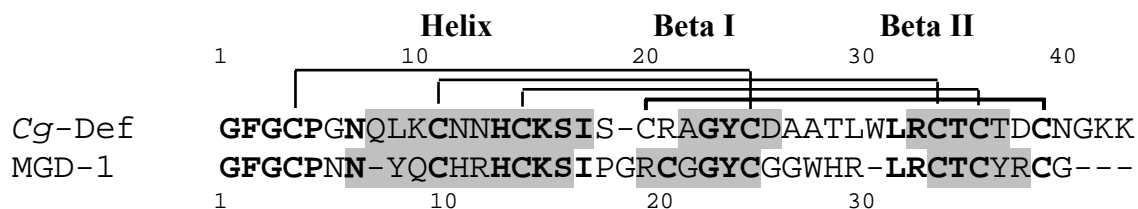
**Figure 6: *Cg-def* mRNA expression in oyster mantle following a bacterial-challenge.** Pooled mantle total RNA (ten individuals per pool) was used from non stimulated (white) and stimulated (black) oysters, at 24 and 48 h post-infection. Each bar represents an average of three independent experiments.

Figure 1

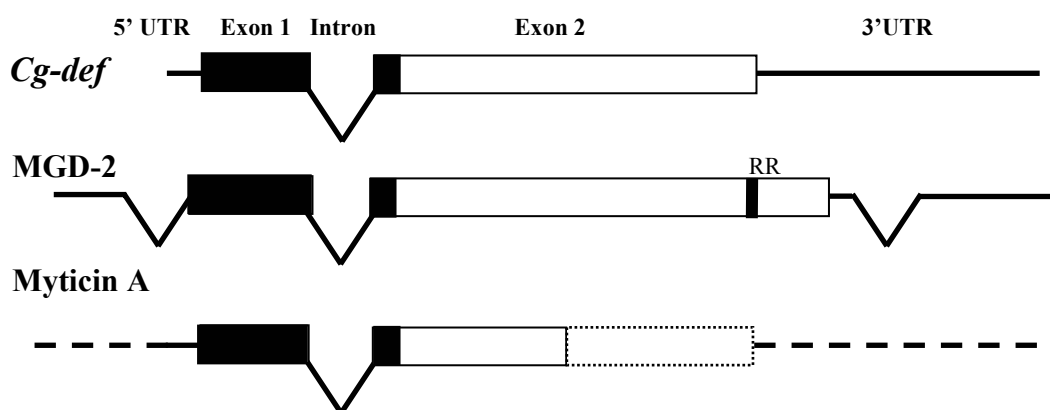
A

<i>Cg</i> -DEF	GFGC--PGNQLK--CNNHCKSIS--CRAGYCDAA TLWLRCTCTDCNGKK
MGD-1	GFGC--PNN-YQ--CHRHCKSIPGR <b>C</b> -GGYCGGWHR-LRCTCYR <b>CG</b>
MGD-2	GFGC--PNN-YA--CHQHCKSIRGY <b>C</b> -GGY CAGWFR-LRCTCYR <b>CG</b>
DEFA-MYTED	GFGC--PND-YP--CHRHCKSIPGRX-GGYCGGXHR-LRCTCYR
DEFB-MYTED	GFGC--PND-YP--CHRHCKSIPGRY-GGYCGGXHR-LRCTC
DEFI-AESCY	GFGC--PLDQMQ--CHRHCQTITGRS-GGYCSGPLK-LTCTCYR
VSNA1	GFGC--PLNQGA--CHNHCRSIRRR--GGYCSGI I K-QTCTCYRN
DEF4-ANDAU	GFGC--PFNQGA--CHRHCRSIRRR--GGY CAGLFK-QTCTCYR
DEF4-LEIQH	GFGC--PLNQGA--CHRHCRSIRRR--GGY CAGFFK-QTCTCYRN
<i>Om</i> -DEF-C	GYGC--PFNQYQ--CHSHCSGIRGYK-GGYCKGLFK-QTCNCY
HIDfs	GFGC--PLNQGA--CHNHCRSIGRR--GGY CAGI I K-QTCTCYRK
BOMICR	GFGC--PFNQGA--CHRHCRSIRRR--GGY CAGLIK-QTCTCYRN
Scapularisin	GFGC--PFDQGA--CHRHCQSIGRR--GGY CAGFIK-QTCTCYHN
Plectasin	GFGCNGPWEDDMQCHNHCKSIKGYK-GGYCAKGGFV--CKCY

B



C



**Figure 2**  
(black and white figure)

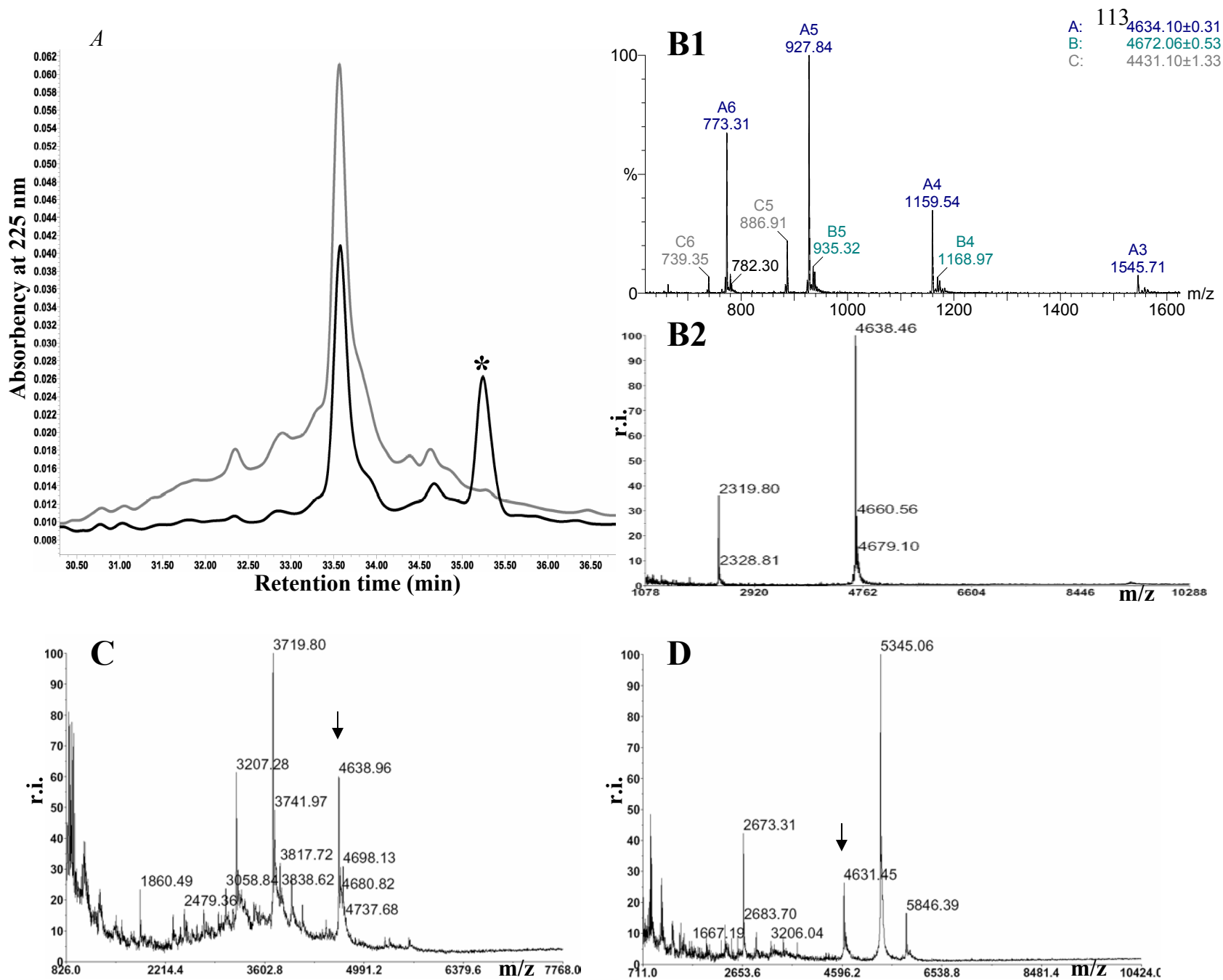


Figure 3

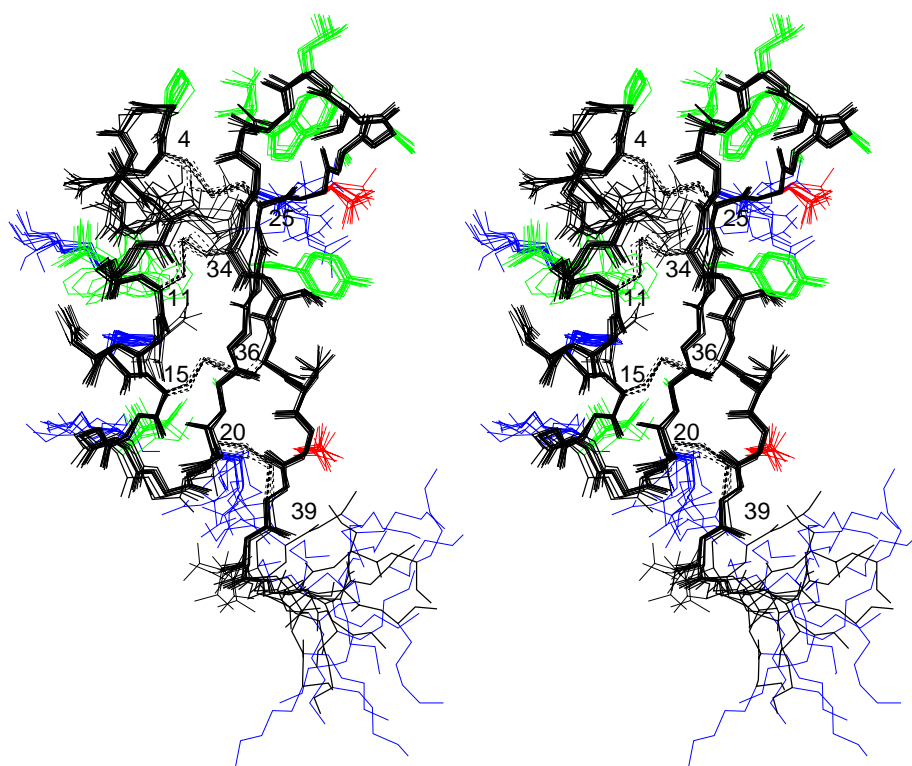
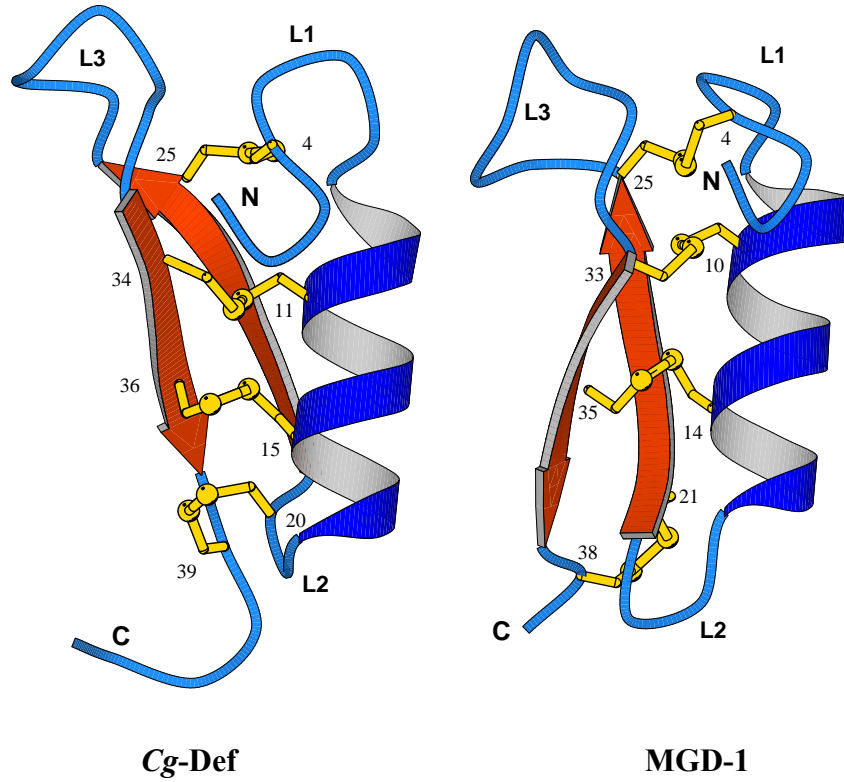


Figure 4

A



B

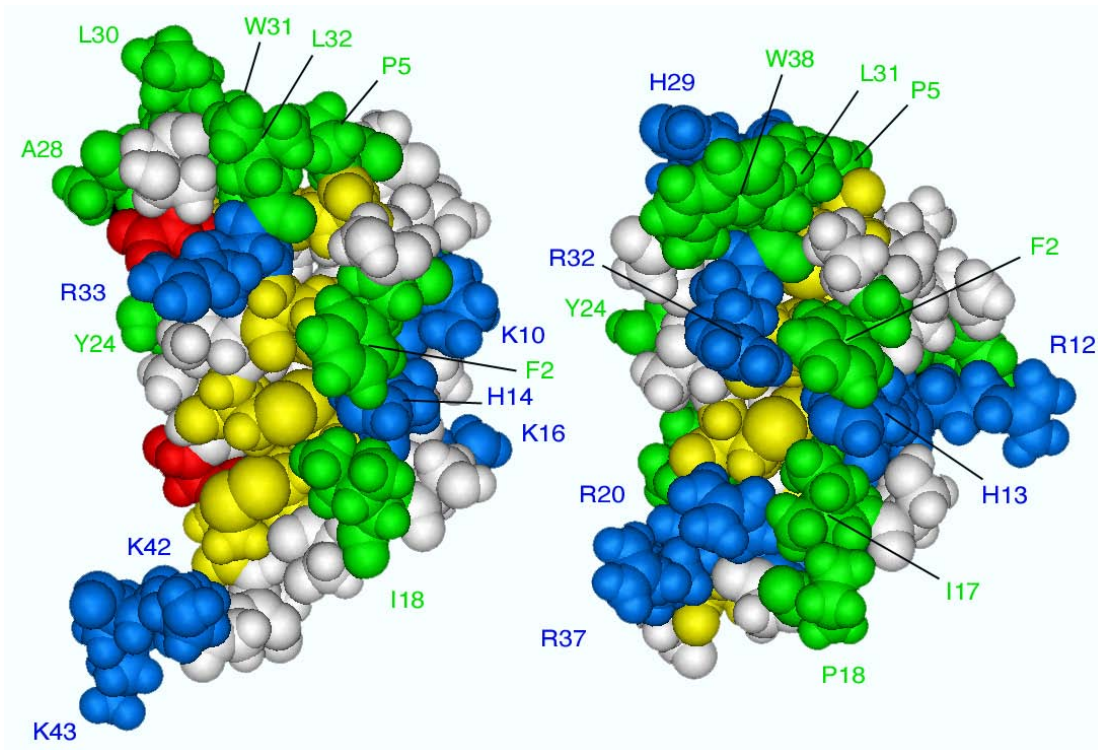
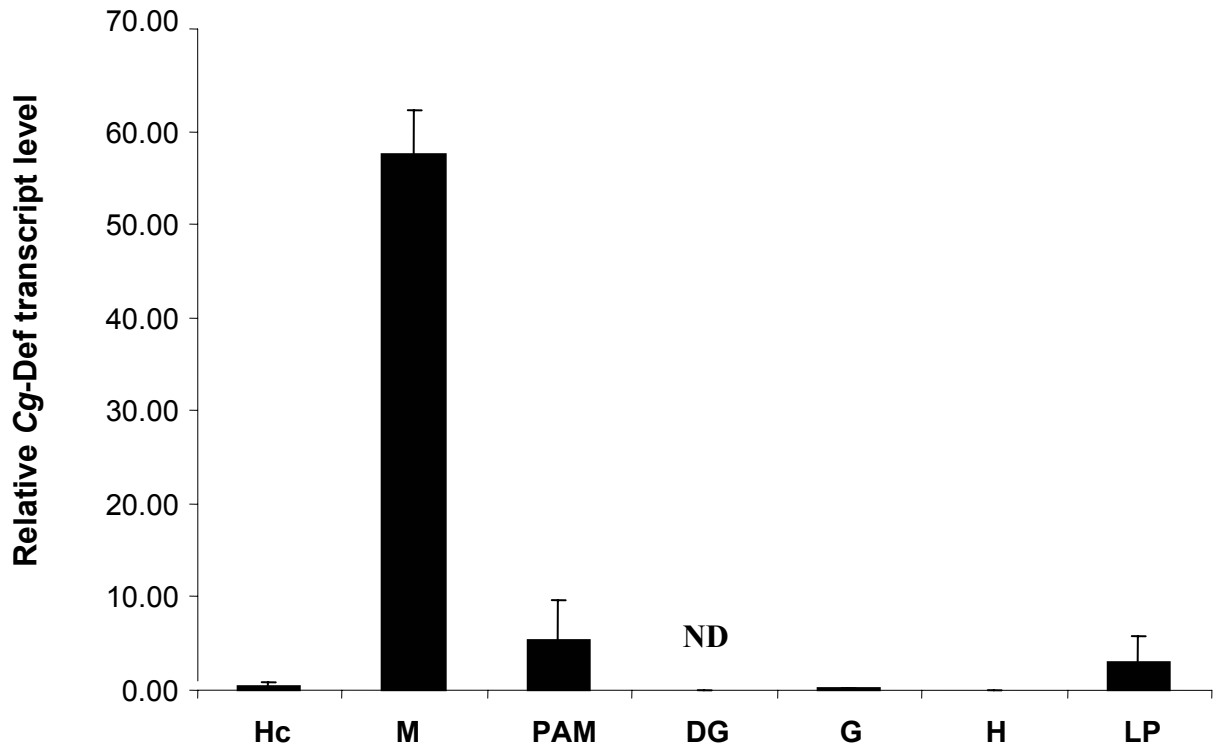
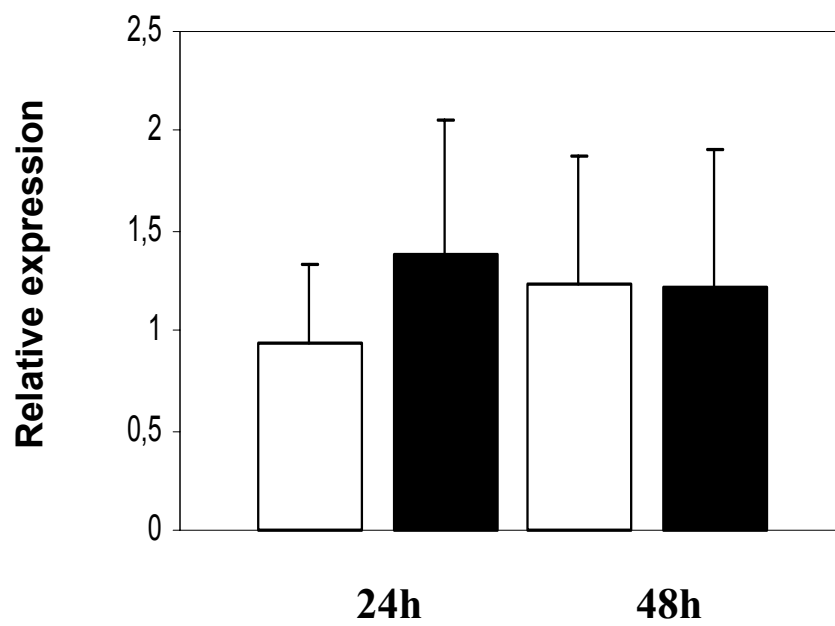


Figure 5



**Figure 6**

## Supplementary Materials

**Table S1:** Chemical shifts (in ppm) of the recombinant Cg-Def measured at pH 3.25 and 20 °C. Due to the N40/D40 heterogeneity 2 chemical shifts were measured for residues in position 39, 40, 41 and 42.

Residue	HN	H $\alpha$	H $\beta$ ( $\beta'$ )	Others
G1	-	3.69		
F2	8.62	3.91	2.94 – 2.68	H2,6: 6.77; H3,4,5: 7.09
G3	8.04	4.65 – 3.41		
C4	7.62	4.67	3.71 – 2.50	
P5	-	4.99	2.34 – 2.02	$\gamma\gamma'$ 1.90; $\delta\delta'$ 3.63 – 3.48
G6	8.90	4.15 – 3.72		
N7	8.47	4.92	3.15 – 2.53	NH2: 7.71–6.88
Q8	8.58	3.88	2.12	3.15–2.53; NH2:7.77 – 7.15
L9	8.30	4.12	1.71	$\gamma$ 1.61; $\delta\delta'$ 0.93 – 0.87
K10	7.39	3.97	1.76	$\gamma\gamma'$ 1.42 – 1.23; $\delta\delta'$ 1.54; $\epsilon\epsilon'$ 2.87; $\zeta$ 7.57
C11	7.19	4.88	3.66 – 2.64	
N12	8.80	3.92	2.88	NH2: 7.41 – 6.94
N13	8.64	4.35	2.85 – 2.78	NH2: 7.57 – 6.93
H14	8.41	4.28	3.63 – 3.21	$\epsilon$ H 8.15; $\delta$ H 6.57
C15	8.45	3.85	2.39	
K16	8.19	4.52	1.78 – 1.68	$\gamma\gamma'$ 1.47 – 1.31; $\delta\delta'$ 1.64 – 1.61; $\epsilon\epsilon'$ 2.94; $\zeta$ 7.51
S17	7.79	4.29	4.01 – 3.92	
I18	6.91	4.59	2.00	$\gamma\gamma'$ 1.35 – 0.68; $\gamma$ CH3 0.55; $\delta$ XH3 0.61
S19	7.56	3.91	3.99 – 4.06	
C20	7.78	5.23	3.12 – 2.68	
R21	7.79	4.02	1.91 – 1.82	$\gamma\gamma'$ 1.78 – 1.62; $\delta\delta'$ 3.18; $\epsilon$ 7.32
A22	7.53	4.59	1.32	
G23	8.54	5.22 – 3.93		
Y24	8.58	4.76	3.33 – 2.93	H2,6:6.84; H3,5: 6.58
C25	8.92	5.33	3.39 – 3.07	
D26	8.32	4.65	2.81 – 2.66	
A27	9.84	1.87	1.18	
A28	8.32	4.03	1.36	
T29	7.36	4.45	4.52	$\gamma$ 0.98
L30	7.76	3.31	1.99 – 1.69	$\gamma$ 1.43; $\delta\delta'$ 0.85 – 0.76
W31	7.22	3.17	3.45 – 3.57	NH 10.35; H2: 7.02; H4: 7.27; H5: 7.10, H6: 7.18; H7: 7.48
L32	7.07	3.83	1.65 – 1.39	$\gamma$ 1.80; $\delta\delta'$ 0.88 – 0.77
R33	7.86	4.36	1.84 – 1.62	$\gamma\gamma'$ 1.54 – 1.29; $\delta\delta'$ 3.10; $\epsilon$ 6.88



C34	8.57	4.95	3.21 – 2.58	
T35	9.31	4.14	3.08	$\gamma$ 0.95
C36	8.56	5.59	3.05 – 2.59	
T37	8.95	4.61	4.05	$\gamma$ 1.15
D38	8.89	4.29	2.95 – 2.76	
C39	8.81	4.82	3.08 – 2.81	
C39	8.72	4.83	3.15 – 2.79	
N40	8.48	4.66	2.82 – 2.77	
D40	8.24	4.56	2.79 – 2.72	
G41	8.48	3.91 – 3.83		
G41	8.33	3.84 – 3.79		
K42	8.20	4.27	1.77 – 1.69	$\gamma\gamma'$ 1.36; $\delta\delta'$ 1.69 – 1.60; $\varepsilon$ 2.92; $\zeta$ 7.46
K42	8.07	4.25	1.77 – 1.69	$\gamma\gamma'$ 1.36; $\delta\delta'$ 1.69 – 1.60; $\varepsilon$ 2.92
K43	8.14	4.14	1.78	$\gamma\gamma'$ 1.33; $\delta\delta'$ 1.65 – 1.60; $\varepsilon$ 2.92; $\zeta$ 7.45

# Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*

Gonzalez M., Gueguen Y., Desserre G., Romestand B. and Bachère E.\*

UMR5171, GPIA, IFREMER-CNRS-UMII, Université de Montpellier II, 2 Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Keywords: Mollusc bivalve; Marine invertebrate; Pacific oyster, Hemocytes; antimicrobial peptide, defensin.

\* Corresponding author: Fax: +33 (0)4 67 14 46 22

E-mail address of the corresponding author: [elyne.bachere@ifremer.fr](mailto:elyne.bachere@ifremer.fr)

## Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the host innate immune response against microbial invasion. We previously characterized the first AMP from an oyster, a defensin, that was shown to be continuously expressed in the mantle of *Crassostrea gigas*. In this study, we report the cDNA cloning of two new isoforms of the defensin AMP family (*Cg-defh1* and *Cg-defh2*) from the hemocytes of the oyster. The deduced amino acid sequences reveal two peptides of 73 amino acid residues with a mature portion consisting of 43 amino acid residues. *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* share 86% amino acid identity and belong to the “arthropod-molluscs defensins family”. qRT-PCR analyses indicate that *Cg-defh2* is continuously expressed in the hemocytes of *C. gigas*. In addition, after a bacterial challenge, the level of *Cg-defh2* transcripts decreases dramatically in the circulating hemocytes population, and this decrease is correlated with an increase of *Cg-defh2* transcripts in the gill and the mantle tissue, suggesting a possible migration of the hemocytes expressing *Cg-defh2* towards the tissues implicated in the first defense barrier of the oyster. Consequently, these results would suggest an important role of *Cg-Defh2* in the oyster response to a microbial challenge.

## Introduction

It is widely known that antimicrobial peptides (AMPs) are major players in innate immunity, conserved in evolution and present in all phyla of the living kingdom. These effectors present a great diversity in terms of structural features, biological

properties and functions, and also in their tissue distribution and expression. AMPs are conventionally described as cationic and amphipathic molecules encoded by genes, but there are now striking evidence that other AMPs or polypeptides may originate from various other sources, such as from the hydrolysis of large inactive proteins involved in various functions [1].

Defensins are compact cationic peptides, approximately 3-5 kDa in size, containing three or four disulphide bridges, and are active against a wide range of bacteria and fungi [2]. The vertebrate defensins can be grouped into three subfamilies, the  $\alpha$ -defensins and  $\beta$ -defensins, which are distinguished on the basis of the connectivity of their six cysteine residues, and more recently the cyclic  $\theta$ -defensins, [3]. In contrast with the classification of the vertebrate defensins, based on their secondary structure, the grouping in clear distinct subfamilies of the invertebrate defensins is based on their biological properties, antibacterial *versus* antifungal [4]. Defensins are the most widespread family of invertebrate AMPs and more than 70 different defensins have been isolated in arthropods (insects, ticks, spiders, scorpions) and molluscs [4]. In addition, the invertebrate defensins differ from the vertebrate defensins by their disulfide bridging, [5].

In molluscs, AMPs have only been reported in bivalves, the mussels *Mytilus edulis* [6] and *M. galloprovincialis* [7]. Based on a biochemical approach and molecular cloning, three groups of cationic cysteine-rich AMPs have been isolated from the hemocytes of unchallenged mussels, *M. galloprovincialis*: (i) defensin-like peptides, MGD-1 and MGD-2 [8]; (ii) myticins; and (iii) mytilins that have also eight cysteine residues but different specific cysteine arrays and amino acid sequences [9]. Finally, another 6.5-kDa AMP that is strictly anti-fungal,

named mytimycin, was identified from *M. edulis* plasma [6]. In the mussel, AMPs are only produced in hemocytes where they are stored and released following bacterial challenges [8]. Recently, we characterized the first AMP described in an oyster, the defensin Cg-Def from *C. gigas* [Gueguen Y., 2005 unpublished]. This defensin was isolated from mantle tissue using Expressed Sequence Tag approach. Cg-Def displays sequence homology with members of the arthropod defensin family and shares 50% amino-acids identity with the defensins (MGD-1 and -2) from the mussel *M. galloprovincialis*. The Cg-Def recombinant peptide was produced in *Escherichia coli* and displayed antibacterial activity. Additionally, the "CS $\alpha\beta$  type" D structure of Cg-Def was determined in aqueous solution by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and molecular modeling [Gueguen Y., 2005 unpublished]. In the present study, we report the cDNA cloning of two novel isoforms of defensin from *C. gigas* hemocytes and their gene expression analyses after bacterial challenge.

## Materials and Methods

### Animals, tissues collection and immune challenge

Adult oysters, *Crassostrea gigas*, were purchased from a local oyster farm in Palavas (Gulf of Lion, France) and kept in sea water at 15°C. Oysters were stimulated by balneation with 5 x 10<sup>8</sup> bacteria/litre. The micro-organisms used for the challenge were the heat-killed bacterial strains *Micrococcus luteus*, *Vibrio splendidus* and *Vibrio anguillarum*. Hemolymph was collected at different times (24 and 48 h) from the pericardial cavity through the adductor muscle under an equal volume of anti-aggregant Modified Alsever Solution and immediately centrifuged at 700 g for 10 minutes (4°C) to separate the blood cells from plasma. After hemolymph collection, oyster tissues were harvested by dissection. Hemocytes and tissues were further treated according to different experimental procedures (see below). The experiments were done in triplicate and, to minimize individual variability, at least ten oysters were used in each experimental condition

### RT-PCR and molecular cloning

Total RNA was extracted from the hemocytes of *C. gigas* using Trizol reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen™) and treated with DNase Turbo (Ambion). Following heat denaturation (70°C for 5 min), reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA prepared with 50 ng/µl oligo-(dT)<sub>12-18</sub> in a 50 µl reaction volume containing 1mM dNTPs, 1unit/µl of RnaseOUT (Invitrogen™) and 200 units/µl M-MLV reverse

transcriptase in reverse transcriptase buffer. The cDNAs were amplified using primers Deffw 5' TTGCTGAGTAGAATGAAAGTATTCG 3' and Defrev, 5' CAGATTGCATAAAGATTTATTACACG 3' designed in the untranslated region of the cDNA sequence of Cg-Def (Genbank accession number CAJ19280) [Gueguen Y., 2005 unpublished]. The amplification program consisted of 3 min at 95°C, followed by 34 cycles of 95°C for 30s, 55°C for 30s, 72°C for 30s min and a final elongation step of 72°C for 3 min. Amplified products were analyzed on 1,5 % agarose gels, cloned into pCR 2.1 TOPO TA cloning vector (Invitrogen™) and sequenced from both directions with T7 and T3 primers.

### Sequence analysis

General homology searches were performed with the BLAST software on the NCBI home page (<http://www.ncbi.gov/Blast>). Deduced amino acid sequences were aligned by ClustalX (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 3.0. The tree was built by the neighbor-joining method based on the alignment of the sequences using ClustalX (alignment was improved using the Seaview software). Bootstrap values (%) of 1000 replicates were calculated for each node of the consensus tree obtained.

### Real Time PCR analyses

Real-time polymerase chain reaction (rtPCR) analysis was done to determine whether acute changes in *Cg-defh1* and *Cg-defh2* RNA abundance could be detected from hemocytes, gills and mantle tissues, sampled 24 and 48 hours post-stimulation. Pooled samples tissues total RNA (10 individuals per pool) were analysed from non stimulated and stimulated oysters at 24 and 48 hours post-challenge. For *Cg-defh1*, the forward and reverse primers were Defh1F (5'-GTATTCGTA CTTCTTACATTAGC-3') and Defh1R (5'-GCTCTACAACCGATGGACCT-3'). For *Cg-defh2*, the forward and reverse primers were Defh2F (5'-AGTATTCGGACTTTTACATTGGT-3') and Defh2R (5'-CCGCTCTACAACCGATGGATTG-3'). The gene encoding the elongation factor (*ef*) was used as internal control. For *ef*, the forward and reverse primers were, EF (5'-ATGCACCAAGGCTGCACAGAAAG-3') and EFR (5'-TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT-3'), respectively.

**Total RNAs were treated with DNase (TURBO DNase, Ambion) to eliminate contaminating genomic DNA. The Dnase was**

removed by phenol chloroform extraction. First strand cDNA was synthesized using polydT primers (Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, Invitrogen). Reverse transcription was performed on 1 µg total RNA using the SUPERScript™ RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were realized with the LightCycler™ (Roche) in the presence of SYBR-Green™ (Master SYBR Green™). Briefly, the following components were mixed to the indicated end-concentration: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of each primer, 1 µl of reaction mix (LC Fast Start Master SYBR Green I; Roche Diagnostics) in a final volume of 9.5 µl. Reverse transcribed RNA (0.5 µl) was added, as PCR template, to the LightCycler master mix and the following run protocol used: initial denaturation at 95°C for 10 min; 95°C for 15 s; 62°C for 15 s; 72°C for 15 s with a single fluorescence measurement; melting curve program (73-95°C with a heating rate of 0.1°C per second and a continuous fluorescence measurement) and finally a cooling step to 30°C. For further expression level analysis, the crossing points (CP) were determined for each transcript using the LightCycler software. Specificity of RT-PCR product was analyzed on agarose gel and melting curve analysis. The copy ratio of each analyzed cDNA was determined as the mean of three replicates.

The relative expression ratio of *Cg-def* was calculated based on the CP deviation of each RT-PCR product of RNA extracted from stimulated oyster *versus* the appropriate control sample (RT-PCR product of RNA from oyster non stimulated), and expressed in comparison to the reference gene (elongation factor, *ef*). The relative expression ratio of *Cg-Def* was calculated based on the delta-delta method for comparing relative expression results developed by PE applied biosystems (Perkin Elmer) and is defined as:  $\text{ratio} = 2^{-[\Delta\text{CP}_{\text{sample}} - \Delta\text{CP}_{\text{control}}]}$ .

## Results and discussion

**Characterization of two defensin cDNA from *C. gigas* hemocytes** Marine invertebrates rely solely on innate immune mechanisms that included both humoral and cellular response. Humoral immunity

in marine invertebrates is characterized by antimicrobial agents present in the blood cells and plasma [10]. The involvement of AMPs in natural resistance to infection is sustained by their strategic location in phagocytes, in body fluids and at the epithelial level. We previously identified and characterized the first antimicrobial from an oyster [Gueguen Y., 2005 unpublished]. *Cg-Def* defensin was isolated from *C. gigas* mantle tissue and was shown to be exclusively and continuously expressed in this tissue, suggesting a key role of this peptide in the antimicrobial defences of the oyster by providing a first line of defense against colonization by pathogens [Gueguen Y., 2005 unpublished]. In the present study, a PCR strategy was used to identify and clone two defensin isoforms from *C. gigas* hemocytes. PCR primers were designed from the 5' and 3'-untranslated regions of *Cg-def*. A single product of around 300bp was amplified by PCR. After cloning and sequencing, we obtained two different deduced amino acid sequences with 86% of identity and showing evident homology with the defensin AMP family. The full length nucleotide and amino-acid sequences of the two new isolated defensin isoforms from *C. gigas* hemocytes (*Cg-Defh1* and *Cg-Defh2*) are presented in Figure 1. The two cDNA sequences present a 195 pb region encoding a 65 amino acid peptide. The deduced amino acid sequence starts with a signal peptide and the cleavage site for signal peptidase is most likely located after the alanine residue preceding the glycine in position 23, as predicted by SignalP 3.0 software (data not shown). *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* are not synthesized as a precursor with a C-terminal extension or a N-terminal pro-region as observed with the Mediterranean mussel or the *Drosophila* defensins, respectively.

The amino acid sequences of the mature peptide *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* were aligned with defensins from the "arthropod defensin family" available in GenBank, that contains defensins from arthropods and molluscs (Figure 2A). The position of the cysteines is well conserved, however, as observed with the defensins MGD-1 and MGD-2 from *M. galloprovincialis* hemocytes and *Cg-Def* from *C. gigas* mantle, *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* have four disulfide bonds. This additional bridge was proposed to render the peptide more stable in high osmolarity media such as in sea water [11]. *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* share 86.1 and 79.1%, identity, respectively, with the mantle

*Cg-Def*. In addition, the sequence of *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* show 50 % identity with the mussel's defensins, MGD-1 and MGD-2. Less identity was observed with defensin from the scorpion *Androctonus australis* (48.8%), the dragonfly *Aeschna cyanea* (47.7%) and the tick *Dermacentor variabilis* (46.5%).

Phylogenetic tree was constructed with *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2* amino acid sequences and the corresponding sequences from members of the invertebrate defensin family. The tree showed that the sequences were split into three clearly distinct groups (Figure 2B). The oyster defensins clustered together with mussel defensins and bearing with the "ancestral group" that comprises paleopteran insect (dragonfly) and arachnids (scorpion and tick) defensins. In addition, all defensins from neopteran insects clustered in the third group (Figure 2B). Recently, it has been suggested that invertebrate defensins from arthropods and molluscs are genetically related and have most likely evolved via exon shuffling [12]. However, this hypothesis has been re-visited and contested a few months ago [13]. Authors indicated that, because of a lack of information (*i.e.* no defensin characterized in basal organism such as annelids or merostomatans or in sister groups of those that have defensins such as crustaceans, gastropods or spiders), there is not enough data at present to support the exon-shuffling model and then, the evolutionary history of these AMP remains unsolved [13].

#### **Real-Time PCR Analyses of *Cg-def* transcript levels after oyster bacterial challenges**

In order to determine the expression pattern of *Cg-defh1* and *Cg-defh2* during bacterial challenge, two batches of oysters were selected. In the first one, oysters were stimulated by bath with killed bacteria (see Material and Methods) and in the second one, non-stimulated oysters ("naïve oyster") were used as control. Then, qRT-PCR analyses were performed, with total RNA extract from hemocytes, mantle and gill, collected at two time points post-challenge (24 and 48 h). qPCR analysis revealed that the amount of *Cg-defh1* transcript measured during the experiment was very low; then, it was difficult to measure acute expression profile pattern of *Cg-defh1*. Concerning, *Cg-defh2*, qPCR analysis indicates that, in "naïve-oysters", *Cg-defh2* is expressed continuously. However, significant decrease of *Cg-defh2* was evidenced in hemocytes after a bacterial challenge. Indeed, very low level of *Cg-defh2* transcripts were detected 24 and 48 hours post bacterial-challenge (Figure 3). In addition, further investigation of the effects of the challenge on the tissues distribution of *Cg-defh2* revealed an increase of the level of *Cg-defh2* transcripts in the oyster mantle and gill, at 24 and 48

hours post-challenge (Figure 3). Because as for all experiment, the temperature melting curve and the size of the qPCR products were identical, we presume that, we detected in the mantle and the gill tissues, transcripts of the same defensin expressed from hemocytes. These preliminary results would suggest that, after a challenge the hemocytes population that expresses *Cg-defh2* could migrate towards the tissues implicated as a first defense barrier of the oyster. This pattern of expression is the same as the one observed for the defensin MGD-1 in the mussel *M. galloprovincialis* after a bacterial injection where hemocytes have been shown to concentrate at the site of infection [8]. Thus, it appears that in molluscs, defensin genes are not regulated as in insects, where the expression of the genes encoding antibacterial peptides is induced after bacterial challenge [14]. Consequently, the decrease of messenger concentration observed from the hemocytes could be either due to (i) an under-representative of the *Cg-defh2* producing cells in the circulation and/or (ii) to a gene under expression after bacterial challenge. Further studies investigating the ratio of the cells expressing *Cg-defh2*, after challenge, in the total population of circulating hemocytes are necessary.

#### **Conclusion**

The data in this report, which represent the first characterization of an antibacterial peptide from the hemocytes of an oyster, indicate a close relationship between the oyster defensins from hemocytes (*Cg-Defh1*, *Cg-Defh2*) and mantle (*Cg-Def*). Additional investigations of oyster immune peptides and their expression are underway to better understand the role of these AMPs in the oyster immune response. However, preliminary results would suggest that the different isoforms of the defensins, *Cg-Defh1*, *Cg-Defh2* from hemocytes and *Cg-Def* from mantle could be detected in one individual. Further studies on the influence of microbial challenge on peptide production and localisation, together with a determination of their complete activity spectra will permit us to elucidate the reason for such diversity.

## References

- [1] Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. (2004) Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- [2] Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S.M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B. and Bulet, P. (2004) Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72, 7140-7146.
- [3] Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schroder, J.M. (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276, 5707-5713.
- [4] Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198, 169-184.
- [5] Dimarcq, J.-L., Bulet, P., Hétru, C. and Fofmann, J.A. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47, 465-477.
- [6] Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hétru, C., Hoffmann, J.A. and Bulet, P. (1996) Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271, 21808-21813.
- [7] Hubert, F., Noël, T. and Roch, P. (1996) A member of the arthropod defensin family from the edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240, 302-306.
- [8] Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. (1999) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sc.* 112, 4233-4242.
- [9] Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M. and Roch, P. (2000) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954-12962.
- [10] Tincu, J.A. and Taylor, S.W. (2004) Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3645-3654.
- [11] Yang, Y.S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J.F., Roch, P. and Aumelas, A. (2000) Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin (MGD - 1). *Biochemistry* 39, 14436 - 14447.
- [12] Froy, O. and Gurevitz, M. (2003) Arthropod and mollusk defensins--evolution by exon-shuffling. *Trends Genet* 19, 684-687.
- [13] Rodriguez de la Vega, R.C. and Possani, L.D. (2005) On the evolution of invertebrate defensins. *Trends Genet* 21, 330-332.
- [14] Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. and Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8, 8-13.

## Legends figures

**Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cg-Defh1* (A) and *Cg-Defh2* (B) cDNAs and alignment of mature defensins (C).** (A, B) The deduced amino acid sequences of the ORF are indicated above the nucleotide sequence. Asterisks indicate the stop codons. Amino acids are numbered on the right. The incomplete sequences of signal peptides are underlined and mature peptides are indicated in bold letters. The sequences of the primers used for *Cg-defh1* and *Cg-defh2* cDNA cloning are in italics. (C) Cysteines are in bold and identical residues are boxed.

**Figure 2. (A)** Sequence alignment of defensins from arthropods and molluscs. Defensin obtained from hemocytes were alignment with others invertebrate defensins. Conserved cysteine residues are shaded. The two additional cysteine residues found in the *Cg-Def* mantle, *Cg-Def* A and B, MGD-1 and MGD-2 are in bold. The disulfide bonds are indicated. **(B)** Phylogenetic tree of invertebrate defensins. The tree was generated using an alignment made using CLUSTAL X. From this alignment a distance based phylogenetic tree was constructed using the Neighbour joining method of the MEGA package. The bootstrap values of the branches are indicated. Oyster *Crassostrea gigas* (*Cg-Def* [AJ565499], *Cg-Defh1* and *Cg-Defh2*); mussels *Mytilus edulis* (DEFA-MYTED, [P81610], DEFB-MYTED, [P81611]) and *M. galloprovincialis* (MGD-1, [P80571]; MGD-2, [AAD52660]); dragonfly *Aeschna cyanea* (Aescy-Def1, [P80154]), tick *Dermacentor variabilis* (varisin, VSNA1, [AAO24323]), scorpion *Androctonus australis* (DEF4-ANDAU, [P56686]), the african malaria mosquito *Anopheles gambiae* (DEFI-ANOGA, [Q17027]), fruit fly *Drosophila melanogaster* (DEFI-DROME, [P36192]) and yellowfever mosquito *Aedes aegypti* (DEFC-AEDAE, [P81603]). *Haemaphysalis longicornis* (HIDfs, [BAD93183]), *Boophilus microplus* (BOMICR, [AAO48943]) and *Leiurus quinquestriatus* (DEF4-LEIQH, [P41965]). The accession numbers are in brackets.

**Figure 3. Expression of *Cg-defh2* mRNA analyzed by real time quantitative RT-PCR.** *Cg-defh2* mRNA expression was measured in hemocytes, mantle and gills following bacterial challenge. Pooled mantle total RNA (10 individuals per pool) was used from non-stimulated (white) and stimulated (black) oysters, at 24 and 48 hours post-infection. Each bar represents an average of three independent experiments. Bars represent the relative *Cg-defh2* transcript levels normalized to e.f. transcript levels, as described in Materials and Methods.

**Figure 1**

**A**

**Cg-Defh1**

*ttgctgagtagaatgaaagtattcggactttttacattgggtcggttctcctgatggtttct*  
                   X X X X X L F T L V V L L M V S 16  
*gcagatatggcttttgctggatttgggtgtccgcgtgaccagtataagtgtaacagtcac*  
   A D M A F A G F G C P R D Q Y K C N S H 36  
*tgccaatccatcggttgtagagcgggctactgtgacgcagtcacactctggttaagatgt*  
   C Q S I G C R A G Y C D A V T L W L R C 56  
*acttgtaccgattgtaatggaaagaagtaagatctttcaagctgaataaaccagtcctga*  
   T C T D C N G K K \* 65  
*atctgaccaagaactaaacgtgtaataaatctttatgcaatctg*

**B**

**Cg-Defh2**

*ttgctgagtagaatgaaagtattcgtacttcttacattagccggttcttctgatggtttct*  
                   X X X X X L L T L A V L L M V S 16  
*gcagacatggctttcgctggatttgggtgtccgggtgaccagtatgagtgtaaccgtcac*  
   A D M A F A G F G C P G D Q Y E C N R H 36  
*tgcaggccatcggttgtagagcgggctactgtgacgcagtcacgctctggttaagatgt*  
   C R S I G C R A G Y C D A V T L W L R C 56  
*acttgtaccgggtgtagtggaaagaagtaagatcgttcaagctgaattgaccagtcctga*  
   T C T G C S G K K \* 65  
*Atctgaccaagaactaaacgtgtaataaatctttatgcaatctg*

**C**

**Cg-Defh1**

GFGCPRDQYKCNSHCQSIGCRAGYCDAVTLWLRCTCTDCCNGKK

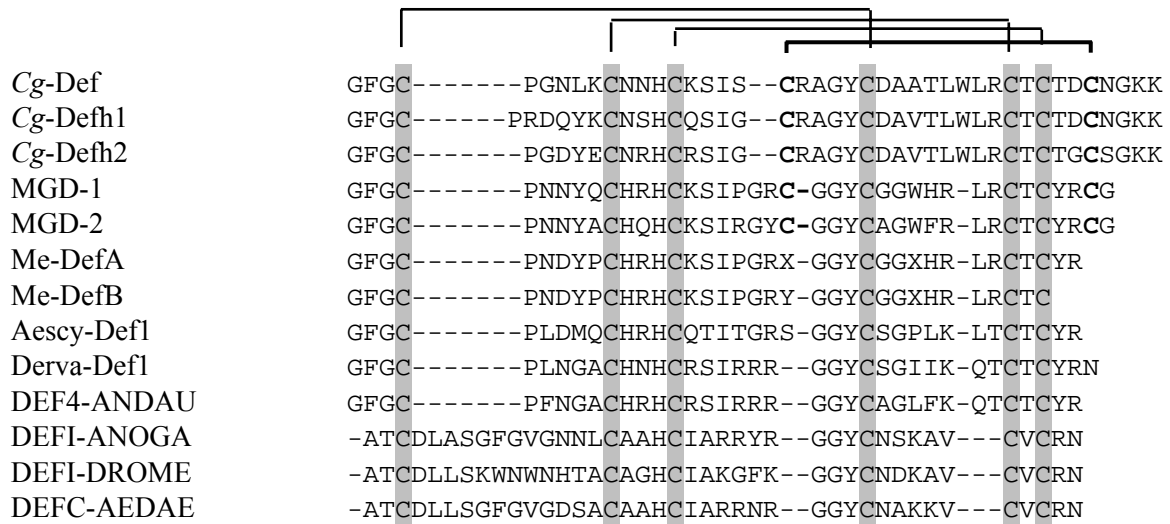
**Cg-Defh2**

GFGCPGDQYE CNRHCRSIGCRAGYCDAVTLWLRCTCTIGCSGKK

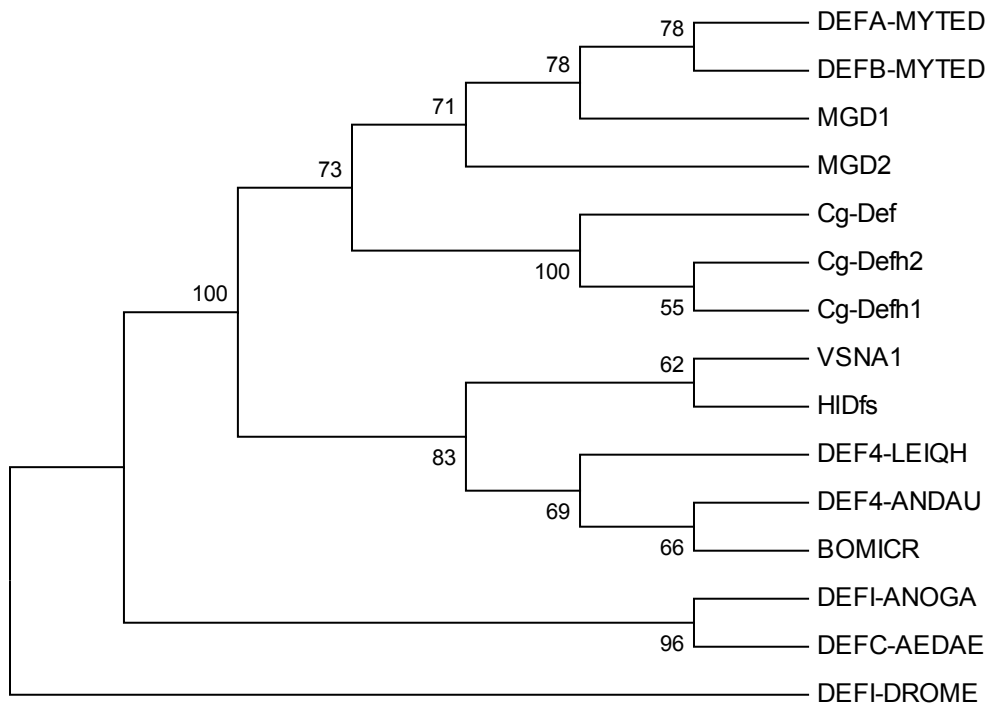


**Figure 2**

**A**

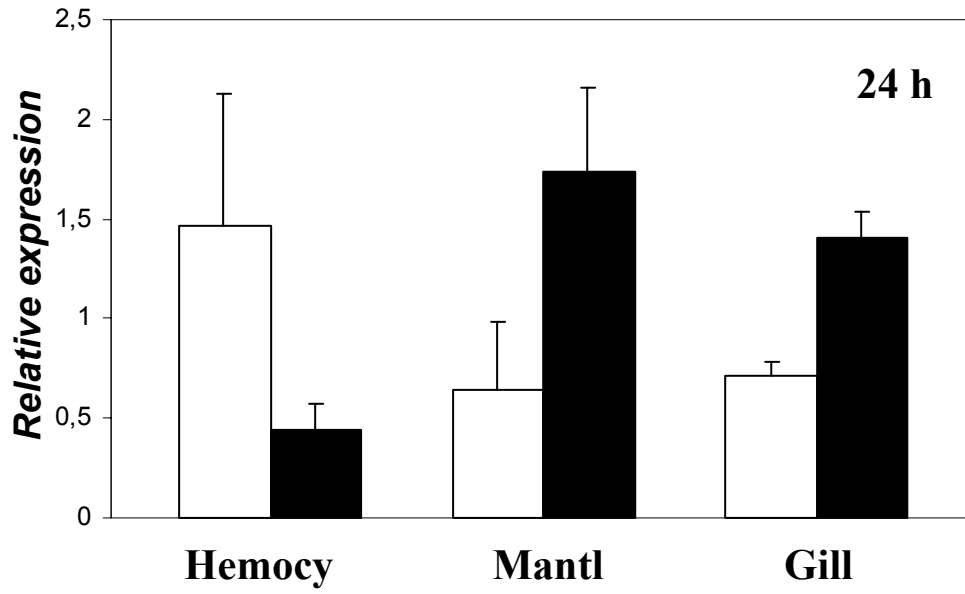


**B**

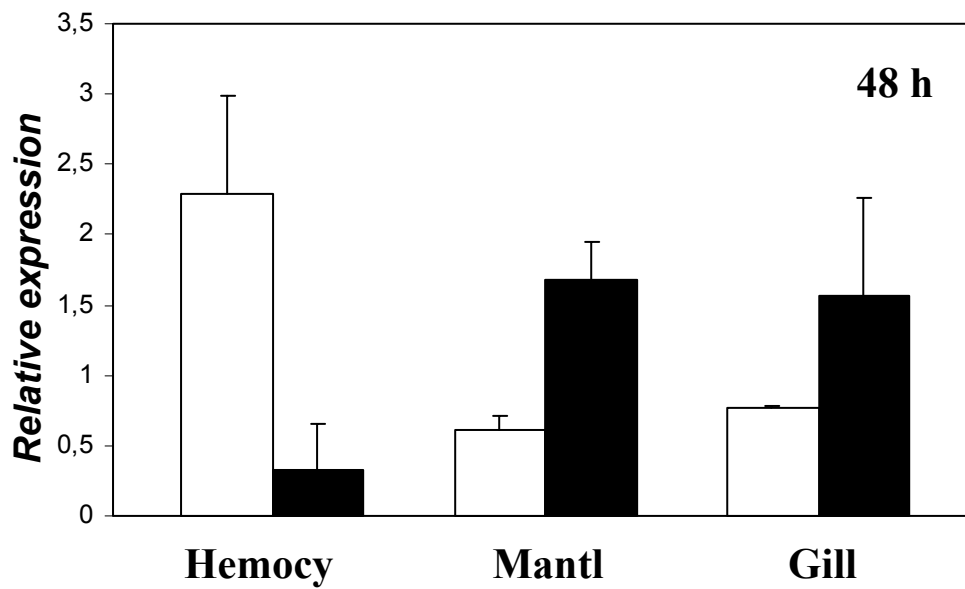


**Figure 3**

**24h post-challenge**



**48h post-challenge**



## Conclusions générales et perspectives

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, grâce notamment au développement de divers programmes de génomique fonctionnelle des progrès récents, ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de défense, par la recherche et l'expression de gènes impliqués dans les réactions immunitaires ou dans d'autres processus physiologiques. En effet, chez cette espèce d'intérêt économique certain, contrairement à d'autres modèles invertébrés (*Drosophile*), les connaissances sont restées longtemps basées essentiellement sur l'étude de réactions hémocytaires et leurs implications dans les processus biologiques.

Les premiers travaux basés sur l'analyse différentielle de l'expression de gènes ont été initiés par une approche de « mRNA-Differential Display » (mRNA-DD) et ont permis de caractériser un certain nombre d'effecteurs de l'immunité exprimés dans les hémocytes de l'huître *C. gigas* en réponse à une stimulation microbienne. Ainsi un premier gène a été isolé codant un inhibiteur de métalloprotéase et dénommé *Cg-Timp* (Montagnani *et al.*, 2001). L'étude de l'expression de ce gène a révélé que cet effecteur pouvait être impliqué chez l'huître dans des phénomènes de réparation tissulaire mais également dans des réactions de défense vis-à-vis de bactéries pathogènes potentielles. En effet, une accumulation de transcrits de *Cg-Timp* a été mise en évidence en réponse à des infections à *Vibrio* mais également en réponse à une métalloprotéinase hétérologue (Matrix Métalloprotéinase, ou thermolysine), suggérant que *Cg-Timp* pouvait agir vis-à-vis de protéases produites par les bactéries (Montagnani *et al.*, 2001). Par ailleurs, des gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B ont été également caractérisés pour la première fois chez un mollusque, *oIKK*, un homologue des IKKs et *Cg-Rel*, un homologue des protéines Rel, et leur fonctionnalité dans la régulation de l'expression de gènes a été abordée (Escoubas *et al.*, 1999) (Montagnani *et al.*, 2004). Enfin, cette approche de mRNA-DD a permis de mettre en évidence un gène homologue de Tal1/SCL, un facteur de transcription impliqué dans les processus d'hématopoïèse chez les mammifères. Ce gène est exprimé de façon constitutive par les hémocytes de l'huître (Barreau-Roumiguière *et al.*, 2003). Sa fonctionnalité en tant que facteur de transcription n'a toutefois pas encore été démontrée dans les processus de prolifération hémocytaire, qui restent chez l'huître un domaine largement méconnu. En effet, comme chez d'autres mollusques bivalves, les mécanismes et sites d'hématopoïèse, ainsi que la caractérisation des types hémocytaires et de leur origine n'ont pas encore été élucidés.

Ainsi, les différents programmes d'analyse du transcriptome, EST et des banques soustractives réalisés chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas* sont une source importante d'information sur les gènes de l'immunité, ouvrant la voie à des études fonctionnelles de leur expression au cours de la réponse immunitaire (Jenny *et al.*, 2002) (Gueguen *et al.*, 2003) (Huvet *et al.*, 2004) (Tanguy *et al.*, 2004).

Au sein de l'Ifremer, les recherches sur la réponse immunitaire des huîtres sont largement focalisés sur les problèmes posés par les mortalités estivales observées depuis plusieurs années dans les cheptels français de *C. gigas* (Gouletquer *et al.*, 1998). Afin de répondre à cette problématique, un programme pluridisciplinaire a été mis en place, dénommé MOREST (pour Mortalités Estivales), faisant intervenir pathologistes, immunologistes, écologistes et généticiens (Samain *et al.*, 2003). Ce travail de thèse s'est également intégré dans un programme européen, IMMUNAQUA (programme INCO-DEV de 2002 à 2005), qui a eu pour objectifs principaux le développement de nouveaux agents thérapeutiques et de nouvelles approches applicables au contrôle des maladies en aquaculture des organismes d'intérêts aquacoles (mollusques et crevettes). Des molécules antimicrobiennes (peptides) produites chez ces espèces élevées ont été caractérisées et étudiées pour leur utilisation (i) en tant qu'agents thérapeutiques au niveau des élevages larvaires (ii) ou comme critères potentiels d'évaluation de la capacité immunitaire ou de la santé des animaux en élevage utilisables en sélection génétique.

Dans le cadre de cette thèse, les travaux se sont focalisés sur la caractérisation d'effecteurs de l'immunité intervenant dans la reconnaissance des bactéries et notamment des LPS, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram (-) micro-organismes communément rencontrés chez les huîtres. En effet les *Vibrios* font partie des populations commensales des huîtres mais peuvent également se révéler hautement pathogènes dans des conditions qui sont encore peu déterminées. Dans ce contexte, les travaux ont porté sur la recherche de protéines ou de molécules antimicrobiennes considérées comme effecteurs directs de la réponse anti-infectieuse. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de protéines plasmatiques de l'huître présentant des capacités de liaison aux LPS ou aux bactéries. Nous nous sommes également appuyés sur l'analyse des bases de données d'ESTs disponibles chez *C. gigas* (<http://www.ifremer.fr/GigasBase>) pour la recherche d'effecteurs exprimés par les hémocytes impliqués dans la reconnaissance des bactéries.

## **Mise en évidence de protéines de reconnaissance ayant des affinités pour les Lipopolysacharides.**

Comme nous l'avons déjà développé dans les différentes parties du manuscrit, une réponse efficace vis-à-vis de pathogènes potentiels repose sur des mécanismes de reconnaissance des motifs moléculaires conservés, caractéristiques de différents microorganismes. Ainsi, cette première phase de reconnaissance peut être réalisée par des molécules soit solubles et circulantes, soit associées à la membrane des hémocytes.

Dans un premier temps, nous avons recherché dans le plasma des huîtres des protéines capables de se lier aux bactéries, ou aux LPS qui sont caractéristiques de la paroi des bactéries à Gram (-). Parmi les différents groupes de bactéries les LPS sont des substances conservées au niveau de la partie lipidique ou lipide A, cependant elles diffèrent au niveau des sucres. Chez les mammifères on sait que le lipide A est responsable du déclenchement de réactions inflammatoires ou chocs septiques pouvant provoquer la mort (Cohen, 2002).

Les premiers travaux que nous avons réalisés ont consisté à rechercher dans le plasma de l'huître des molécules ayant la capacité de se fixer aux LPS. En référence aux travaux de : Mannion *et al.*, 1989), Sun *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 1996, Koizumi *et al.*, 1997, la souche bactérienne retenue a été *E. coli*. Après incubation des bactéries dans du plasma d'huître deux protéines majoritaires ont été mises en évidence par SDS-PAGE. Ces protéines ont été purifiées par chromatographie, un séquençage du N-terminal a été effectué.

Par la recherche d'homologies sur les bases de données, une première protéine a pu être identifiée comme étant une Superoxyde Dismutase (SOD).. En effet, une séquence similaire codant pour une SOD avait déjà été identifiée dans un programme d'ESTs réalisé à partir de manteau de *C. gigas* (Huvet *et al.*, 2004). Les analyse d'expression de ce gène révèlent une origine hémocytaire, confirmée par l'hybridation « *in situ* ». La protéine dénommée *Cg-SOD* présente à la fois des activités de Superoxyde Dismutase et des capacités de liaison aux LPS, montrées expérimentalement. De plus, sa séquence en acides aminés présente deux motifs : (i) un motif DDED qui est connu chez les vertébrés pour être impliqué dans la liaison aux LPS via dans le récepteur CD14, et (ii) un motif RGD (Arg-Gly-Asp) impliqué dans l'association avec des protéines cellulaires de type intégrines intervenant dans des phénomènes d'adhésion cellulaire.

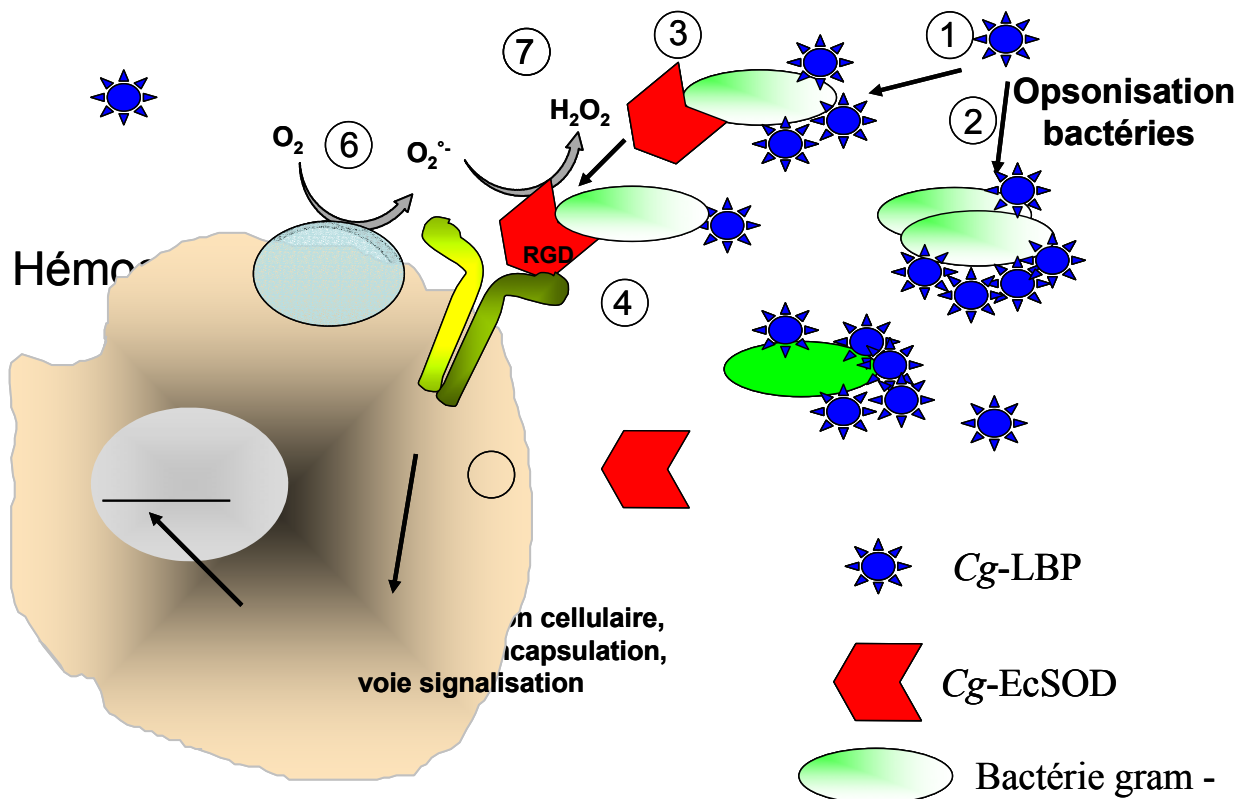
En ce qui concerne l'activité de liaison aux LPS, nous avons montré que *Cg-EcSOD* présente une affinité pour les LPS et les Lipides A. Les valeurs observées sont relativement faibles, comparées aux affinités rapportées pour d'autres protéines capables de se lier aux

LPS. Cependant, ces affinités sont compatibles avec une activité biologique de reconnaissance des bactéries si l'on considère que Cg-SOD est la protéine majoritaire du plasma de l'huître. La mise en évidence dans la séquence de Cg-EcSOD d'un motif RGD nous a incité à rechercher, comme cela a été montré chez d'autres invertébrés (Johansson *et al.*, 1999), une association possible avec des protéines de type intégrine présentes au niveau des hémocytes. Nous avons montré par immuno-analyse (ELISA indirect) que la Cg-EcSOD plasmatique se fixe à la membrane de quelques hémocytes, au niveau desquels elle a été immunocolocalisée avec une  $\beta$ -intégrine. Cette immunolocalisation d'une  $\beta$ -intégrine et de Cg-SOD a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti- $\beta$ -intégrine humaine spécifique de la partie cytosolique de la protéine. Cette mise en évidence d'une  $\beta$ -intégrine au niveau des hémocytes d'huître et d'une interaction avec la SOD est corroborée par la présence dans les banques d'ESTs d'hémocytes de séquences homologues à des intégrines (Gueguen *et al.*, 2003).

Ainsi, pour la première fois, nous avons caractérisé une SOD présentant des activités de liaison aux LPS. Sur la base des propriétés de cette protéine plasmatique (activité SOD, reconnaissance des LPS, capacité de liaison aux hémocytes via une protéine de type  $\beta$ -intégrine), nous permettons de proposer un modèle d'action de Cg-EcSOD dans la réponse immunitaire de l'huître. Ainsi, la Cg-EcSOD abondante dans le plasma de l'huître pourrait se fixer aux bactéries Gram(-) ou aux LPS via le motif DDED et le complexe ainsi formé pourrait être reconnu par les intégrines exposées à la surface des membranes de certaines populations d'hémocytes. Chez l'huître, cette réaction d'adhésion cellulaire est alors à l'initiative des processus de phagocytose qui s'accompagne de l'activation du choc respiratoire et la génération de radicaux oxygénés toxiques (Bachère *et al.*, 1991). Ces derniers agissent au niveau intracellulaire (phagosome), mais peuvent également être libérés de façon massive et provoquer des dommages dans les tissus. Par son activité SOD, la protéine de l'huître associée à ce processus de phagocytose pourrait participer à la génération de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et d'autres composés plus toxiques pour les microorganismes comme les hypochlorites (HOCl), les radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) ou le peroxyde d'azote ( $ONOO^\bullet$ ) (Klebanoff, 1982). Cependant, compte tenu que Cg-SOD représente la protéine majeure du plasma de l'huître, il est plus probable qu'elle contribue à un processus de détoxification destiné à limiter les dommages tissulaires pouvant être générés par les mécanismes cytotoxiques liés aux réactions de phagocytoses particulièrement actives chez les mollusques bivalves. La Cg-EcSOD plasmatique peut transformer les anions superoxydes par réaction avec l'hydrogène en peroxyde de hydrogène

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) moins toxique. Ainsi la diminution de la concentration en anions superoxydes pourrait assurer plutôt une protection des hémocytes et des tissus comme cela a été montré chez les mammifères (Salin and McCord, 1975). Par ailleurs, des travaux récents ont montré que le peroxyde d'hydrogène agissait comme messenger secondaire dans l'activation de la voie de signalisation NF-κB (Schreck *et al.*, 1992), contribuant à l'activation et la prolifération des lymphocytes (Reth, 2002). Compte tenu de la caractérisation chez l'huître, de divers éléments de cette voie de signalisation (Escoubas *et al.*, 1999) (Montagnani *et al.*, 2004), il est possible que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puisse participer à la régulation de la voie NF-κB et ainsi contribuer à une réponse immunitaire locale et systémique.

La deuxième protéine plasmatique que nous avons caractérisée chez *C. gigas* présente également des propriétés de liaison aux LPS et nous l'avons appelée Cg-LBP pour « LPS-Binding Protein ». Cette protéine apparaît être impliquée dans les mécanismes de reconnaissance des bactéries Gram (-). Nous avons déterminé que Cg-LBP montre de affinités plus fortes pour les LPS que pour le Lipide A, qui sont comparables aux affinités observées pour des LBP décrites chez d'autres modèles biologiques (Tan *et al.*, 2000). Le séquençage de l'extrémité N-terminale de Cg-LBP révèle toutefois qu'elle diffère des protéines déjà décrites. Afin de caractériser la structure primaire de cette nouvelle protéine et obtenir plus d'informations sur la fonctionnalité de la protéine Cg-LBP, des analyses de masse sont envisagées. Toutefois, les données expérimentales obtenues sur l'affinité de liaison de Cg-LBP aux LPS, nous permettent de supposer que cette protéine plasmatique pourrait participer aux mécanismes de reconnaissance et d'opsonisation des bactéries à Gram (-). Il s'agira par ailleurs d'étudier comment, cours de la réponse immunitaire, cette protéine agit dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries par rapport à la protéine Cg-SOD (Figure 9).



**Figure 9. Modèle illustrant l'implication de *Cg-EcSOD* et *Cg-LBP* dans la réponse immunitaire de *Crassostrea gigas*.** Dans ce modèle les bactéries gram (-) sont reconnues par, *Cg-EcSOD* et *Cg-LBP*, les deux protéines majoritaires de l'hémolymphe. Ainsi, *Cg-LBP* s'associerait aux LPS ① et participerait aux mécanismes d'opsonisation des bactéries ②. Pour sa part, *Cg-EcSOD* se lierait aussi aux LPS des bactéries ③ pour former par la suite un complexe avec les intégrines localisées dans la membrane des hémocytes ④. Cette interaction serait à l'origine du déclenchement des processus comme la phagocytose ou l'adhésion cellulaire ⑤. Au même moment, *Cg-EcSOD* serait impliquée dans la dismutation des anions superoxydes, produits pendant la phagocytose ⑥, en  $H_2O_2$  ⑦. Cette réaction contribuerait à un processus de détoxification de ces radicaux dangereux pour les cellules.



## **Caractérisation d'une « Bactericidal/Permeability Increasing protein » Cg-BPI et de défensines chez l'huître *C. gigas*.**

Au moment où ce travail de thèse a été initié chez *C. gigas*, aucune protéine ou peptide antimicrobien n'avait été décrits chez ce mollusque bivalve. La disponibilité de séquences de type ESTs (Gueguen *et al.*, 2003) (Huvet *et al.*, 2004), nous a permis de mettre en évidence et de cloner des effecteurs antimicrobiens exprimés chez cette espèce.

Au cours de l'analyse des bases de données d'ESTs d'hémocytes de *C. gigas*, une séquence présentant des homologues avec les protéines de la famille des LBP/BPI (LPS-binding protein/Bactericidal Permeability Increasing protein) de vertébrés a été mise en évidence. Cette séquence a été utilisée pour cribler la banque d'ADNc d'hémocytes d'huître et obtenir une séquence complète d'un ADNc. L'analyse de la séquence déduite en acides aminés a permis de mettre en évidence pour cette protéine d'huître une conservation des deux domaines caractéristiques de la famille des LBP/BPI (Levy, 2000a, Weiss, 2003) connus chez les mammifères. Le développement de programmes de génomique, des séquences homologues aux LBP/BPI ont aussi été décrites chez les vertébrés inférieurs comme les poissons (Kono and Sakai, 2003) (Inagawa *et al.*, 2002) (Stenvik *et al.*, 2004), mais également chez deux invertébrés *Caenorhabditis intestinalis* (Beamer *et al.*, 1998) et *Biomphalaria glabrata* (Mitta *et al.*, 2005).

Chez l'huître, les analyses de séquences nous ont permis de mettre en évidence les motifs ou régions conservés intervenant dans la reconnaissance et la liaison aux LPS, par exemple la conservation de plusieurs lysines dans le domaine N-terminal des LBP et BPI. Toutefois, la modélisation tridimensionnelle, la répartition des charges et le calcul du point isoélectrique (PI) de la protéine d'huître tendaient plus à la rapprocher d'une BPI que d'une LBP. Seuls les résultats relatifs à l'activité biologique de la molécule devaient permettre de définir sans ambiguïté l'existence ou non d'une BPI. Compte tenu des premières difficultés rencontrées pour purifier la protéine à partir des hémocytes ou des tissus de l'huître, nous avons entrepris de produire la protéine en système recombinant sur *Pichia pastoris*. L'identité de la protéine recombinante produite a été analysée et vérifiée par établissement d'une carte peptidique massique, révélant en outre que la protéine était glycosylée. Dans un premier temps, la capacité de la BPI putative d'huître de se lier aux LPS a été vérifiée expérimentalement puis nous nous sommes attachés à rechercher une activité de perméabilisation des membranes bactériennes caractéristiques des BPIs selon un protocole

développé par (Lehrer *et al.*, 1988) Nos résultats encore fragmentaires mettent en évidence uniquement une perméabilisation de la membrane externe.. Ce type de résultat pourrait s'expliquer par des temps d'incubation trop courts empêchant la protéine de pénétrer au travers des membranes. Afin de mieux caractériser l'activité antibactérienne de la protéine de l'huître, de nouvelles expérimentations seront nécessaires. Néanmoins, ces tests préliminaires apportent la preuve qu'il existe bien chez l'huître une substance liant les LPS et présentant une activité de perméabilisation membranaire, cette molécule nous l'avons dénommée Cg-BPI.

Un peptide antimicrobien homologue à une défensine a été identifié par approche EST à partir du manteau de l'huître (Huvet *et al.*, 2004). Ce premier peptide, dénommé Cg-Def, a été cloné et caractérisé du point de vue structural et fonctionnel par la production d'un peptide recombinant dans le système bactérien *E. coli*. Cg-Def présente de fortes homologues (50% d'identités) avec les défensines, MGD1, caractérisées chez la moule (Mitta *et al.*, 1999b). Son spectre d'activité est comparable à celui observé généralement chez les défensines cependant, contrairement à ce qui a été observé chez cette famille de peptides Cg-Def conserverait son activité antimicrobienne dans des conditions de fortes salinités.

Sur la base de la séquence de Cg-Def, nous avons par la suite recherché par RT-PCR si des substances de type défensines pouvaient être exprimées dans les hémocytes. Deux isoformes présentant 80% d'homologies avec Cg-Def ont été obtenues, que nous avons nommées Cg-Defh1 et Cg-Defh2 (« h » pour hémocytes). Les précurseurs de Cg-Def et des défensines hémocytaires de l'huître sont composés d'un peptide signal suivi de la séquence correspondant au peptide mature, mais à la différence de MGD1 de moule, ils ne présentent pas d'extension C-terminale riche en résidus anioniques.

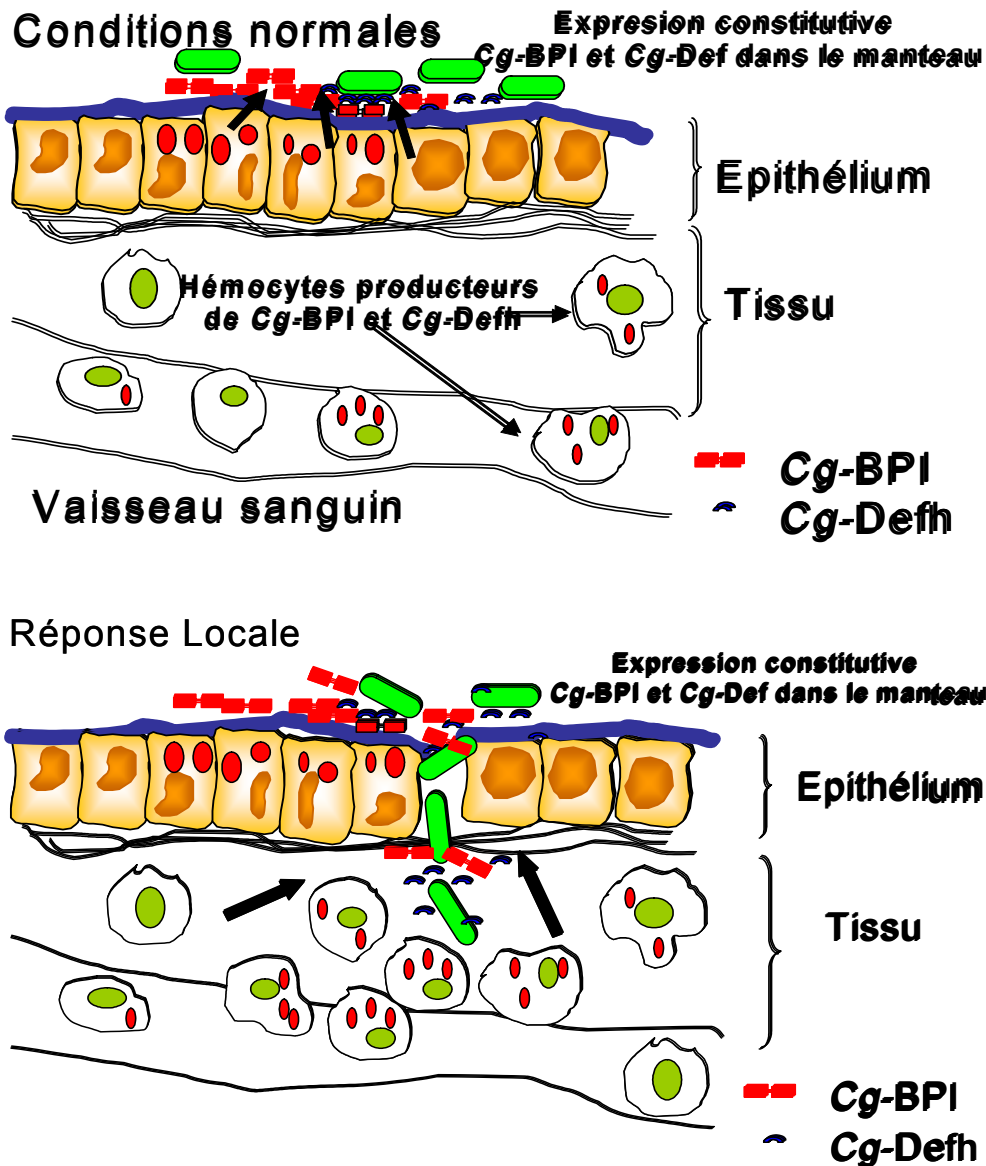
### **Localisation et régulation de l'expression de Cg-BPI et des défensines en réponse à des stimulations bactériennes.**

Afin d'aborder le rôle de ces effecteurs antimicrobiens dans la réponse immunitaire de l'huître, nous avons analysé leur expression chez des animaux après une stimulation microbienne comparativement à des animaux non stimulés dits « naïfs ». Ces analyses ont été réalisées par hybridation « *in situ* » et PCR quantitative au niveau des hémocytes circulants et des tissus de l'huître.

En premier lieu, nous avons confirmé que *Cg*-BPI et *Cg*-Defh1 et 2 étaient bien exprimés dans les hémocytes de *C. gigas* et *Cg*-Def dans le manteau, mais des différences notables ont été montrées au sujet de la régulation de l'expression de ces divers effecteurs.

En ce qui concerne *Cg*-BPI, les analyses en hybridation « *in situ* » ont révélé que ce gène est exprimé de façon constitutive au niveau des épithélia de la plupart des tissus de l'huître : au niveau du manteau, des palpes labiaux, des branchies, des diverticules digestifs, de l'intestin, du caecum, mais également au niveau de follicules gonadiques. Ces observations sont particulièrement intéressantes et permettent de rapprocher *Cg*-BPI des BPI de mammifères qui sont également exprimés de façon constitutive dans les épithélia (Canny *et al.*, 2002) (Levy *et al.*, 2003). Une stimulation de la réponse immunitaire par une balnéation des huîtres dans un milieu enrichi en bactéries ne s'accompagnerait pas d'une stimulation notable de l'expression de *Cg*-BPI au niveau des épithélia. De la même façon, l'expression de la défensine *Cg*-Def du manteau de l'huître ne semble pas modulée en réponse à une infection bactérienne. Des analyses par hybridation « *in situ* » seront néanmoins nécessaires pour déterminer le site d'expression de ce peptide au niveau des tissus du manteau.

*Cg*-BPI est très faiblement exprimé dans les hémocytes d'huîtres naïves. Par contre, cette stimulation se traduit au niveau des hémocytes par une activation de la transcription de *Cg*-BPI qui a pu être mesurée par hybridation « *in situ* » à l'aide de sondes radioactives. Cette augmentation de l'activité transcriptionnelle de *Cg*-BPI atteint un pic à 24 heures et s'accompagne d'une augmentation importante du nombre d'hémocytes qui expriment ce gène, à la fois dans la circulation sanguine et dans les tissus, révélant une réaction systémique. Toutefois, dans les mêmes conditions de stimulation, les profils d'expression des défensines *Cg*-Defh2 sont totalement différents de ceux observés pour *Cg*-BPI. En effet, *Cg*-Defh2 est exprimé continuellement dans les hémocytes d'huîtres naïves. En réponse à la stimulation bactérienne, l'abondance relative des transcrits de *Cg*-Defh2 dans les populations hémocytaires diminue de façon significative, alors que comparativement dans les tissus comme le manteau ou les branchies, le taux des transcrits augmente. De telles observations ont été faites d'une part chez la moule (Mitta *et al.*, 1999b) (Mitta *et al.*, 2000b) et d'autre part chez les crevettes pénaïdes (Munoz *et al.*, 2004). Chez ces invertébrés, les modulations des taux de transcrits de peptides observés dans les hémocytes circulants se sont révélées liées à des modifications de la composition des populations hémocytaires circulantes. En effet, suite à une infection, des migrations massives d'hémocytes exprimant les peptides antimicrobiens vers les sites d'infection sont observées. Ce type de réaction peut correspondre chez l'huître à l'observation de la diminution de l'abondance des transcrits de *Cg*-Defh2 dans les hémocytes



**Figure 10. Modèle de la réponse antimicrobienne chez l'huître *Crassostrea gigas*, impliquant les hémocytes et les cellules des épithélia. (A) Dans des conditions normales, l'expression de Cg-Def dans le manteau, Cg-Defh dans les hémocytes et Cg-BPI dans les tissus semble être constitutive. Par contre, les taux de transcrits de Cg-BPI dans les hémocytes sont très faibles. (B) La réponse, suite à une stimulation microbienne, est caractérisée par une augmentation de l'expression des transcrits de Cg-BPI dans les hémocytes. L'expression de Cg-Def au niveau du manteau et de Cg-BPI dans les epithelia ne varie pas en réponse à la stimulation. Par contre, l'augmentation du taux de transcrit de Cg-Defh observée dans les tissus pourrait être liée, comme chez la moule, à une migration massive des hémocytes aux sites d'infection. En effet, les hémocytes sont présents dans la circulation et dans les tissus.**

circulants, conjointement à leur augmentation dans les tissus. L'expression de *Cg-Defh2* en réponse à la stimulation ne serait pas régulée transcriptionnellement dans les hémocytes contrairement à ce qui est observé pour *Cg-BPI*. Des analyses complémentaires devront être menées pour confirmer ce phénomène chez l'huître. Il s'agira de déterminer également dans quels types hémocytaires *Cg-BPI* et *Cg-Defh* sont exprimés afin de mieux comprendre les modifications de profils d'expression observés (Figure 10).

## **Perspectives**

Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons pu caractériser plusieurs acteurs de la réponse immunitaire de l'huître, intervenant dans la reconnaissance, la liaison aux LPS et la lutte antimicrobienne. L'ensemble des résultats obtenus nous permet d'avancer dans la compréhension des mécanismes mis en place par l'huître pour contrôler ou éliminer des bactéries potentiellement pathogènes (Figure 9 et 10).

Ainsi, l'expression constitutive de *Cg-BPI* et *Cg-Def* au niveau des épithelia pourrait contribuer à un contrôle des populations microbiennes au niveau des tissus les plus exposés au milieu extérieur. Chez les mammifères, il est établi que la BPI agit en synergie avec d'autres effecteurs ayant des activités antimicrobiennes comme la phospholipase ou les défensines et cathélicidines (Levy, 2000b). Chez l'huître, il sera nécessaire de rechercher également chez ces effecteurs de telles activités de synergie en réponse à des infections. Il sera particulièrement intéressant de localiser *Cg-BPI* et les défensines au niveau des hémocytes d'un point de vue ultrastructural. La localisation hémocytaire de ces effecteurs, dont l'expression apparaît régulée différemment en réponse à une infection, devrait permettre en outre de progresser sur la distinction de types hémocytaires qui reste encore confuse chez l'huître.

Sur un plan plus général, la compréhension du rôle des effecteurs caractérisés devrait nous permettre de les utiliser pour évaluer les capacités de défense des huîtres dans différentes conditions environnementales ou pathologiques, par la mesure des niveaux d'expression de leur gène. Par ailleurs, des résultats préliminaires obtenus par PCR quantitative suggèrent que différentes isoformes de défensines comme de *Cg-BPI*, peuvent être détectées chez un même individu et que les niveaux d'abondance peuvent varier. Il sera particulièrement intéressant de caractériser ces différents isoformes et d'analyser leurs expressions respectives dans différentes conditions d'infections ou vis-à-vis de différents types de bactéries, pathogènes *versus* commensales.

D'un point de vue appliqué, ces travaux sur la réponse antimicrobienne des huîtres doivent permettre à terme de fournir des connaissances et d'apporter les outils nécessaires à la mise en place de programmes de sélection génétique d'huîtres présentant des capacités de défense ou de survie accrues face à des infections potentielles.

## Liste des publications

### Articles acceptés

**Gonzalez, M.**, Romestand, B., Fievet, J., Huvet A., Lebart M-C., Gueguen, Y., Bachère, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma Extracellular Superoxide Dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 338: 1089-1097.

Gueguen Y, Amaury H, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, Bulet P, **Gonzalez M**, Lelong C, Favrel P, Bachère E. (2005). Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression. Publication sous-pressé à « *Journal of Biological Chemistry* »

Bachère E, Gueguen Y, **Gonzalez M.**, de Lorgeril J., Garnier J., and Romestand B. (2004) Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Reviews*, 198: 149-168.

**Articles en preparation pour soumission ou soumis:**

**Gonzalez M,** Roquet F, Gueguen Y, Pugnère M, Bachère E. Identification of a Lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Manuscrit devant être soumis à « *Developmental and Comparative Immunology* »

**Gonzalez M,** Gueguen Y, Fievet J, Romestand B, Pugnère M, Roquet F, Bulet P, Escoubas JM, Vandebulcke F, Bachère, E. First evidence of a Bactericidal Permeability Increasing protein (BPI) in an invertebrate, the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. Manuscrit devant être soumis à « *Journal of Biological chemistry* »

**Gonzalez M.,** Gueguen Y., Desserre G., Romestand B. and Bachère E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Manuscrit devant être soumis à « *Developmental and Comparative Immunology* »



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. Aug. **406**: 782-787.
- Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., Kosugi, A. and Miyake, K. (2003) Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med*. **198**: 1035-1042.
- Aketagawa, J., Miyata, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Morita, T., Hayashida, H., Iwanaga, S., Takao, T. and Shimonishi, Y. (1986) Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J Biol Chem*. **261**: 7357-7365.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. and Ford, S.E. (2002) Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*. **13**: 141-158.
- Amura, C.R., Kamei, T., Ito, N., Soares, M.J. and Morrison, D.C. (1998) Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J Immunol*. **161**: 2552-2560.
- Andrews, J.D. (1988) Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *Amer. Fish. Soc. Special Publication*. **18**: 47-63.
- Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., de Boer, H.A., MacLaren, D.M., *et al* (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun*. **62**: 2628-2632.
- Arata, Y., Hirabayashi, J. and Kasai, K. (1997) The two lectin domains of the tandem-repeat 32-kDa galectin of the nematode *Caenorhabditis elegans* have different binding properties. Studies with recombinant protein. *J Biochem (Tokyo)*. **121**: 1002-1009.
- Arditi, M., Zhou, J., Dorio, R., Rong, G.W., Goyert, S.M. and Kim, K.S. (1993) Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect Immun*. **61**: 3149-3156.
- Ashton-Alcox, K.A. and Ford, S.E. (1998) Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue&Cell*. **30**: 195-204.
- Babior, B.M. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*. **64**: 959-966.
- Bachère, E. (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. **191**: 3 - 11.
- Bachère, E., Chagot, D. and Grizel, H. (1988) Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol*. **12**: 549-559.

- Bachère, E., Hervio, D. and Mialhe, E. (1991) Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 173-180.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. (2004) Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* **198**: 149-168.
- Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* **1**: 141-150.
- Barreau-Roumiguiere, C., Montagnani, C. and Escoubas, J.M. (2003) Characterization of a Tal/SCL-like transcription factor in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.* **27**: 793-800.
- Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. and Warr, G.W. (2002) Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar Biotechnol (NY)*. **4**: 278-293.
- Bayne, C.J. (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defence. *Bioscience*. **40**: 723-731.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K. and Bender, R.C. (2001) Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology*. **123 Suppl**: S159-167.
- Beamer, L.J. (2003) Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans.* **31**: 791-794.
- Beamer, L.J., Carroll, S.F. and Eisenberg, D. (1997) Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science*. **276**: 1861-1864.
- Beamer, L.J., Fischer, D. and Eisenberg, D. (1998) Detecting distant relatives of mammalian LPS-binding and lipid transport proteins. *Protein Sci.* **7**: 1643-1646.
- Bender, R.C. and Bayne, C.J. (1996) Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biochem J.* **316 ( Pt 3)**: 893-900.
- Bender, R.C., Broderick, E.J., Goodall, C.P. and Bayne, C.J. (2005) Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than susceptible snails. *J Parasitol.* **91**: 275-279.
- Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P. and Timmermans, M. (1998) Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem.* **273**: 24948-24954.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* **40**: 845-859.

- Bevins, C.L., Martin-Porter, E. and Ganz, T. (1999) Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*. **45**: 911-915.
- Boutet, I., Tanguy, A. and Moraga, D. (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*. **329**: 147-157.
- Brackett, D.J., Lerner, M.R., Lacquement, M.A., He, R. and Pereira, H.A. (1997) A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on the neutrophil-derived protein CAP37 prevents endotoxin-induced responses in conscious rats. *Infect Immun*. **65**: 2803-2811.
- Brandenburg, K., Koch, M.H. and Seydel, U. (1998) Biophysical characterisation of lysozyme binding to LPS Re and lipid A. *Eur J Biochem*. **258**: 686-695.
- Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. **198**: 169-184.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L. and Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol*. **23**: 329-344.
- Bulet, P., Dimarcq, J.-L., Hetru, C., Lagueux, M., Charles, M., Hegy, G., Van Dorselaer, A. and Hoffmann, J. A. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem*. **268**: 14893-14897.
- Burke, R.D. (1999) Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol*. **191**: 257-284.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C. and Gallo, G. (2002) Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev Comp Immunol*. **26**: 325-334.
- Canny, G., Levy, O., Furuta, G.T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R.B., Serhan, C.N. and Colgan, S.P. (2002) Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 3902-3907.
- Castro, M.S. and Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett*. **12**: 13-18.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E.T., Iwanaga, S. and Söderhäll, K. (1994) Structure and biological activity of a 1,3-beta-Glucan-binding protein in Crustacean blood. *Journal of Biological Chemistry*. **269**: 29462-29467.
- Chaby, R. (2004) Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell Mol Life Sci*. **61**: 1697-1713.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hétru, C., Hoffmann, J.A. and Bulet, P. (1996) Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem*. **271**: 21808-21813.

- Chen, Y.A., McKillen, D.J., Wu, S., Jenny, M.J., Chapman, R., Gross, P.S., Warr, G. W. and Almeida, J. S. (2004) Optimal cDNA microarray design using expressed sequence tags for organisms with limited genomic information. *BMC Bioinformatics*. **5**: 191.
- Cheney, D.P., Macdonald, B.F. and Elston, R.A. (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research*. **19**: 353-359.
- Cheng, T.C. (1981) Bivalves. In *Invertebrates Blood Cells*, Chap. Ratcliffe, N.A., and Rowley, A.F. (eds.) London: Academic Press, pp. 233-301.
- Cheng, T.C. (1996) Hemocytes: Forms and functions. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Edited by Maryland Sea Grant College, University of Maryland System, College Park.
- Choi, D.L., Lee, N.S., Choi, H.J., Park, M.A., McGladdery, S.E. and Park, M.S. (2004) Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Dis Aquat Organ*. **59**: 205-209.
- Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. **420**: 885-891.
- Comps, M., Tige, G. and Grizel, H. (1980) Etude ultrastructurale d'un protiste de l'huitre *Ostrea edulis* L. *C.R. Acad. Sci. Paris*.
- Comps, M., Bonami J, R., Vago, C. and Campillo, A. (1976) Une virose de l'huitre portugaise (*Crassostrea angulata* lmk). *C. R. Acad. Sc. Paris, T.* **282**: 1991-1993.
- Connors, V.A. and Yoshino, T.P. (1990) In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol*. **76**: 895-902.
- Cooper, D.N. and Barondes, S.H. (1999) God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. **9**: 979-984.
- Cuthbertson, B.J., Bullesbach, E.E., Fievet, J., Bachere, E. and Gross, P.S. (2004) A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem J*. **381**: 79-86.
- Dankesreiter, S., Hoess, A., Schneider-Mergener, J., Wagner, H. and Miethke, T. (2000) Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J Immunol*. **164**: 4804-4811.
- David, S.A., Mathan, V.I. and Balaram, P. (1992) Interaction of melittin with endotoxic lipid A. *Biochim Biophys Acta*. **1123**: 269-274.
- Davids, B.J., Wu, X.J. and Yoshino, T.P. (1999) Cloning of a beta integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Gene*. **228**: 213-223.

de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M.G., Gueguen, Y. and Bachère, E. (2005) Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicidae*. *Physiol. Genomics*. **21**: 174-183.

De Lucca, A.J., Jacks, T.J. and Brogden, K.A. (1995) Binding between lipopolysaccharide and cecropin A. *Mol Cell Biochem*. **151**: 141-148.

Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M. and Bachère, E. (1999) Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem*. **266**: 335-346.

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachère, E. (1997) Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem*. **272**: 28398-28406.

Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachère, E. (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci*. **113**: 461-469.

Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J. and Rebuffat, S. (2002) Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*. **84**: 511-519.

Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P. and Bachère, E. (2001) Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem*. **276**: 47070-47077.

Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F. and Dissous, C. (1999) *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol Res*. **85**: 481-486.

Dziarski, R. (2004) Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol*. **40**: 877-886.

Elass-Rochard, E., Legrand, D., Salmon, V., Roseanu, A., Trif, M., Tobias, P.S., Mazurier, J. and Spik, G. (1998) Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. **66**: 486-491.

Elsbach, P. and Weiss, J. (1993) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology*. **187**: 417-429.

Elston, R.A. and Wilkinson, M.T. (1985) Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture*. **48**: 189-210.

Escoubas, J.M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C. and Roch, P. (1999) Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett*. **453**: 293-298.

FAO (2003) Yearbooks of fishery statistics summary tables - 2002: World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc... by principal species <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>.

Farley, C.A. (1978) Viruses and viruslike lesions in marine mollusks. *Mar. Fish. Rev.*: 18-20.

Farley, C.A., Wolf, P.H. and Elston, R.A. (1988) A long-term study of microcell disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (G.N.) and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.N.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.N.). *Fish. Bull.* **86**: 581-593.

Feng, S.Y. (1988) Cellular Defense Mechanisms of Oysters and Mussels. *American fisheries society special publication.* **18**: 153-168.

Ferrandon, D., Jung, A.C., Criqui, M.C., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Reichhart, J.-M. and Hoffmann, J.A. (1997) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the *Toll* pathway. *Embo J.* **17**: 1217-1227.

Fisher, W.S. and Ford, S.E. (1988) Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. *Am Fisheries Soc Spec Publ.*

Ford, S.E. and Haskin, H.H. (1982) History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in delaware bay, 1957-1980. (1). *J. Invertebr. Pathol.* **40**: 118-141.

Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A. and Kanaley, S.A. (1994) Comparative cytometric and microscopic analysis of oyster hemocytes. *J Invertebr Pathol.* **164**: 114-122.

Foukas, L.C., Katsoulas, H.L., Paraskevopoulou, N., Metheniti, A., Lambropoulou, M. and Marmaras, V.J. (1998) Phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes requires both activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and beta3 integrin for internalization. *J Biol Chem.* **273**: 14813-14818.

Frey, E.A., Miller, D.S., Jahr, T.G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B. B., and Wright, S. D.(1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **176**: 1665-1671.

Friedl, F.E., Alvarez, M.R., Johnson, J.S. and Gratzner, H.G. (1988) Cytometric investigations on hemocytes of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Tissue Cell.* **20**: 933-939.

Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R. A., Burrenson, E. M. and Reece, K. S. (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Organ.* **63**: 33-41.

Fujita, T., Matsushita, M. and Endo, Y. (2004) The lectin-complement pathway-its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev.* **198**: 185-202.

Ganz, T. and Weiss, J. (1997) Antimicrobial Peptides of Phagocytes and Epithelia. *Seminars in Hematology.* **34**: 343 - 354.

Ganz, T. and Lehrer, R. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Cur. opinion Immunol.* **10**: 41-44.

Ganz, T. and Lehrer, R.I. (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today.* **5**: 292.

Ganz, T., Selsted, M.E. and Lehrer, R.I. (1990) Defensins. *Eur. J. Haemathol.* **44**: 1-8.

Gay, M., Berthe, F.C. and Le Roux, F. (2004a) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ.* **59**: 49-56.

Gay, M., Renault, T., Pons, A.M. and Le Roux, F. (2004b) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ.* **62**: 65-74.

Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A. and Ferrandon, D. (2003) Dual activation of the Drosophila toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science.* **302**: 2126-2130.

Goedken, M. and De Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* **16**: 539-552.

Goodall, C.P., Bender, R.C., Broderick, E.J. and Bayne, C.J. (2004) Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Mol Biochem Parasitol.* **137**: 321-328.

Gouletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. and Taillade, S. (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). *Conseil International pour l'Exploration de la Mer CM 1998.* **14**: p20.

Gray, P.W., Flagg, G., Leong, S.R., Gumina, R.J., Weiss, J., Ooi, C.E. and Elsbach, P. (1989) Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J. Biol. Chem.* **264**: 9505-9509.

Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami J, R. and Vago, C. (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observe au cours de l'epizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Sc. Paris, T.* **279**: 783-784.

Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W. and Warr, G.W. (2001) Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 565-577.

- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E. and Escoubas, J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*. **16**: 139-145.
- Guillou, F., Mitta, G., Dissous, C., Pierce, R. and Coustau, C. (2004) Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **138**: 175-181.
- Gutsmann, T., Fix, M., Larrick, J.W. and Wiese, A. (2000) Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *J Membr Biol*. **176**: 223-236.
- Guyard-Dangremont, V., Tenekjian, V., Chauhan, V., Walter, S., Roy, P., Rassart, E. and Milne, A.R. (1999) Immunochemical evidence that cholesteryl ester transfer protein and bactericidal/permeability-increasing protein share a similar tertiary structure. *Protein Sci*. **8**: 2392-2398.
- Hahn, U.K., Bender, R.C. and Bayne, C.J. (2001) Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *J Parasitol*. **87**: 292-299.
- Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M. and Wright, S. D. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. **179**: 269-277.
- Haziot, A., Rong, G.W., Silver, J. and Goyert, S.M. (1993) Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol*. **151**: 1500-1507.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. II. Haemocyte functions, aggregation, viability, phagocytosis and respiratory burst. *J. Exp. Marine Biol. Ecol*. **293**: 249-265.
- Hertel, L.A., Adema, C.M. and Loker, E.S. (2005) Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Dev Comp Immunol*. **29**: 295-303.
- Hervio, D., Bachère, E., Mialhe, E. and Grizel, H. (1989) Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostrea* (Ascetospora). *Dev. Comp. Immunol*. **29**: 4.
- Hibbetts, K., Hines, B. and Williams, D. (1999) An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med*. **13**: 302-308.
- Hine, P.M., Wesney, B. and Hay, B.E. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org*. **12**: 135-142.



- Hoess, A., Schneider-Mergener, J. and Liddington, R.C. (1995) Identification of the LPS-binding domain of an endotoxin neutralising protein, Limulus anti-LPS factor. *Prog Clin Biol Res.* **392**: 327-337.
- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.-M. (1997) *Drosophila* immunity. *Trends Cell Biol.* **7**: 309-316.
- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J. (2002) Drosophile innate immunity an evolutionary perspective. *Nature.* **3**: 121-126.
- Holmblad, T., Thörnqvist, P.-O., Söderhäll, K. and Johansson, M.W. (1997) Identification and cloning of an integrin beta subunit from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Exp. Zool.* **277**: 255-261.
- Hudson, K.J., Bliska, J.B. and Bouton, A.H. (2005) Distinct mechanisms of integrin binding by *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins determine the phagocytic response of host macrophages. *Cell Microbiol.* **7**: 1474-1489.
- Hughes, P.E., Oertli, B., Han, J. and Ginsberg, M.H. (2001) R-Ras regulation of integrin function. *Methods Enzymol.* **333**: 163-171.
- Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F. and Cunningham, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene.* **343**: 211-220.
- Imai, T., Numachi, K.-i., Oizumi, J. and Sato, S. (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute.* **25**: 27-38.
- Imler, J.L. and Bulet, P. (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy.* **86**: 1-21.
- Inagawa, H., Honda, T., Kohchi, C., Nishizawa, T., Yoshiura, Y., Nakanishi, T., Yokomizo, Y. and Soma, G.(2002) Cloning and characterization of the homolog of mammalian lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal permeability-increasing protein in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Immunol.* **168**: 5638-5644.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2002) ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci.* **27**: 219-221.
- Iovine, N.M., Elsbach, P. and Weiss, J. (1997) An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 10973-10978.
- Iwaki, D., Osaki, T., Mizunoe, Y., Wai, S.N., Iwanaga, S. and Kawabata, S. (1999) Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. *Eur J Biochem.* **264**: 314-326.

Iwanaga, S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol.* **14**: 87-95.

Iwanaga, S., Kawabata, S.-I. and Muta, T. (1998) New types of clotting factors and defense molecules found in Horseshoe Crab hemolymph: Their structures and functions. *J. Biochem.* **123**: 1-15.

Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W. and Chapman, R.W. (2002) Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* **4**: 81-93.

Johansson, M.W. (1999) Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev Comp Immunol.* **23**: 313-315.

Johansson, M.W., Lind, M.I., Holmblad, T., Thörnqvist, P.O. and Söderhäll, K. (1995) Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **216**: 1079-1087.

Johansson, M.W., Holmblad, T., Thörnqvist, P.O., Cammarata, M., Parrinello, N. and Soderhall, K. (1999) A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *J Cell Sci* **112**: 917-925.

Juan, T.S., Hailman, E., Kelley, M.J., Wright, S.D. and Lichenstein, H.S. (1995) Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. *J Biol Chem.* **270**: 17237-17242.

Juliano, R.L., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A. and Aplin, A. (2004) Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans.* **32**: 443-446.

Kagan, B.L., Ganz, T. and Lehrer, R.I. (1994) Defensins : a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology.* **87**: 131-149.

Kawabata, S. and Tsuda, R. (2002) Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab lectins. *J Endotoxin Res.* **8**: 437-439.

Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T. and Fujita, T. (2001) Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Biol Chem.* **276**: 19959-19965.

Kim, Y.S., Ryu, J.H., Han, S.J., Choi, K.H., Nam, K.B., Jang, I.H., Lemaitre, B., Brey, P. T. and Lee, W. J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem.* **275**: 32721-32727.

Klebanoff, S.J. (1982) Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. In *Advances in Host Defence Mechanisms*. Gallin, J.I., and Fauci, A.S. (eds.) New York: Raven Press.

- Kobayashi, M., Johansson, M.W. and Söderhäll, K. (1990) The 76 kD cell adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res*: 13-18.
- Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H. and Sato, R. (1997) Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Biochem*. **248**: 217-224.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1999) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett*. **443**: 139-143.
- Kono, T. and Sakai, M. (2003) Molecular cloning of a novel bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (BPI/LBP) from common carp *Cyprinus carpio* L. and its expression. *Mol Immunol*. **40**: 269-278.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. and Nicolas, J.L. (2005) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.in press*.
- Lambert, C. and Nicolas, J.L. (1998) Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*. **71**: 53-63.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. and Paillard, C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol*. **15**: 225-240.
- Languino, L.R., Plescia, J., Duperray, A., Brian, A.A., Plow, E.F., Geltosky, J.E. and Altieri, D.C. (1993) Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell*. **73**: 1423-1434.
- Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G. and Butcher, E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev*. **186**: 37-46.
- Lawrence, M.B. and Springer, T.A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. **65**: 859-873.
- Lazaron, V. and Dunn, D.L. (2002) Molecular biology of endotoxin antagonism. *World J Surg*. **26**: 790-798.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L. and Berthe, F. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. **15**: 251-258.
- Leclerc, V. and Reichhart, J.M. (2004) The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev*. **198**: 59-71.

- Lee, S.Y., Wang, R. and Söderhäll, K. (2000) A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*: 1337-1343.
- Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. and Brey, P.T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 7888-7893.
- Lehrer, R.I., Barton, A. and Ganz, T. (1988) Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J Immunol Methods*. **108**: 153-158.
- Lepore, L.S., Roelvink, P.R. and Granados, R.R. (1996) Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol*. **68**: 131-140.
- Levy, O. (2000a) A Neutrophil-Derived Anti-Infective Molecule: Bactericidal/Permeability-Increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother*. **44**: 2925-2931.
- Levy, O. (2000b) Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood*. **96**: 2664-2672.
- Levy, O., Canny, G., Serhan, C.N. and Colgan, S.P. (2003) Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochem Soc Trans*. **31**: 795-800.
- Levy, O., Ooi, C.E., Elsbach, P., Doerfler, M.E., Lehrer, R.I. and Weiss, J. (1995) Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J Immunol*. **154**: 5403-5410.
- Little, R.G., Kelner, D.N., Lim, E., Burke, D.J. and Conlon, P.J. (1994) Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23). *J. Biol. Chem*. **21**: 1865-1872.
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D. and Dziarski, R. (2001) Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem*. **276**: 34686-34694.
- Liu, T.Y., Minetti, C.A., Fortes-Dias, C.L., Liu, T., Lin, L. and Lin, Y. (1994) C-reactive proteins, limunectin, lipopolysaccharide-binding protein, and coagulin. Molecules with lectin and agglutinin activities from *Limulus polyphemus*. *Ann N Y Acad Sci*. **712**: 146-154.
- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. (1990) The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *J Invertebr Pathol*. **56**: 75-85.
- Ma, H., Mai, K., Xu, W. and Liufu, Z. (2005) Molecular cloning of alpha2- macroglobulin in sea scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia, Mollusca). *Fish Shellfish Immunol*. **18**: 345-349.

- Mancek, M., Pristovsek, P. and Jerala, R. (2002) Identification of LPS-binding peptide fragment of MD-2, a toll-receptor accessory protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **292**: 880-885.
- Mandal, C., Biswas, M., Nagpurkar, A. and Mookerjee, S. (1991) Isolation of a phosphoryl choline-binding protein from the hemolymph of the snail, *Achatina fulica*. *Dev Comp Immunol.* **15**: 227-239.
- Mannion, B.A., Kalatzis, E.S., Weiss, J. and Elsbach, P. (1989) Preferential binding of the neutrophil cytoplasmic granule-derived bactericidal/permeability increasing protein to target bacteria. Implications and use as a means of purification. *J Immunol.* **142**: 2807-2812.
- Martello, L.B., Friedman, C.S. and Tjeerdema, R.S. (2000) Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone. *Aquatic Toxicol.* **49**: 213-225.
- Martin, K.J. and Pardee, A.B. (1999) Principles of differential display. *Methods Enzymol.* **303**: 234-258.
- Masson, P.L., Heremans, J.F. and Schonke, E. (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* **130**: 643-658.
- Mathieu-Daude, F., Cheng, R., Welsh, J. and McClelland, M. (1996) Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1504-1507.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* **91**: 295-298.
- Meister, M., Lemaitre, B. and Hoffmann, J.A. (1997) Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays.* **19**: 1019-1026.
- Metheniti, A., Giannakas, N., Katsoulas, H.L., Soldatos, A.N., Tsakas, S. and Lambropoulou, M. (2003) Evidence for a LPS-binding protein in medfly hemocyte surface: mediation in LPS internalization but not in LPS signaling. *Arch Insect Biochem Physiol.* **54**: 25-36.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. and Roch, P. (2000a) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters.* **486**: 185-190.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T. and Roch, P. (1999a) Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* **264**: 1-9.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. (1999b) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sc.* **112**: 4233-4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M. and Roch, P. (2000b) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* **275**: 12954-12962.

- Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J.F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A. and Coustau, C. (2005) Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Dev Comp Immunol.* **29**: 393-407.
- Miura, Y., Kawabata, S. and Iwanaga, S. (1994) A *Limulus* intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem.* **269**: 542-547.
- Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**: 186-192.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. and Escoubas, J.M. (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett.* **500**: 64-70.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M. and Escoubas, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett.* **561**: 75-82.
- Montes, J.F., Durfort, M. and Garcia-Valero, J. (1995) Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Research.* **279**: 529-538.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P. and Snider, D. (2004) Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science.* **304**: 297-300.
- Mullen, G.E., Kennedy, M.N., Visintin, A., Mazzoni, A., Leifer, C.A., Davies, D.R. and Segal, D.M. (2003) The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 3919-3924.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. and Bachère, E. (2002) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2678-2689.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D. and Bachère, E. (2004) Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 961-972.
- Muroi, M., Ohnishi, T. and Tanamoto, K. (2002) Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF-kappa B. *J Biol Chem.* **277**: 42372-42379.
- Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **274**: 21491-21494.
- Newlands, G.F., Skuce, P.J., Knox, D.P., Smith, S.K. and Smith, W.D. (1999) Cloning and characterization of a beta-galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* **119**: 483-490.

- Nicolas, J.-L., Comps, M. and Cochenec, N. (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **12**: 11-13.
- Niere, M., Meisslitzer, C., Dettloff, M., Weise, C., Ziegler, M. and Wiesner, A. (1999) Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III(1). *Biochim Biophys Acta.* **1433**: 16-26.
- Noda, S. and Loker, E.S. (1989a) Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology.* **98**: 35-41.
- Noda, S. and Loker, E.S. (1989b) Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snails: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. *J Parasitol.* **75**: 261-269.
- Nonaka, M. (2001) Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol.* **13**: 69-73.
- Nottage, A.S. and Birkbeck, T.H. (1987) Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *J. of Fish Diseases.* **10**: 211-220.
- Noursadeghi, M., Bickerstaff, M.C., Gallimore, J.R., Herbert, J., Cohen, J. and Pepys, M.B. (2000) Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 14584-14589.
- Ochiai, M. and Ashida, M. (2000) A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem.* **275**: 4995-5002.
- Ohno, N. and Morrison, D.C. (1989) Lipopolysaccharide interactions with lysozyme differentially affect lipopolysaccharide immunostimulatory activity. *Eur J Biochem.* **186**: 629-636.
- Okemoto, K., Nakajima, Y., Fujioka, T. and Natori, S. (2002) Participation of two N-terminal residues in LPS-neutralizing activity of sarcotoxin IA. *J Biochem (Tokyo).* **131**: 277-281.
- Olafsen, J.A., Fletcher, T.C. and Grant, P.T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol.* **16**: 123-138.
- Ouellette, A.J. (1999) IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. *Amer J Physiol.* **277**: 257-261.
- Ouellette, A.J. and Selsted, E. (1996) Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *Faseb J.* **10**: 1280-1289.
- Pace, K.E. and Baum, L.G. (2004) Insect galectins: roles in immunity and development. *Glycoconj J.* **19**: 607-614.

- Pace, K.E., Lebestky, T., Hummel, T., Arnoux, P., Kwan, K. and Baum, L.G. (2002) Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. Expression in developing immune, neural, and muscle tissues. *J Biol Chem.* **277**: 13091-13098.
- Panyutich, A. and Ganz, T. (1991) Activated alpha2-Macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology.* **5**: 101-106.
- Panyutich, A.V., Hiemstra, P.S., van Wetering, S. and Ganz, T. (1995) Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **12**: 351-357.
- Pereira, H.A. (1995) CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator. *J Leukoc Biol.* **57**: 805-812.
- Periathamby, A.R. and Dentino, A.R. (2002) Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology letters.* **206**: 9-18.
- Plows, L.D., Cook, R.T., Davies, A.J. and Walker, A.J. (2004) Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1692**: 25-33.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W. and Orkin, S.H. (1996) The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* **86**: 47-57.
- Rabinovich, G.A. and Gruppi, A. (2005) Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol.* **27**: 103-114.
- Ramanathan, B., Davis, E.G., Ross, C.R. and Blecha, F. (2002) Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* **4**: 361-372.
- Reichhart, J.M., Essrich, M., LDimarq, J., Hoffmann, D., Hoffmann, J.A. and Lagueux, M. (1989) Insect immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to dipterecin, an inducible antibacterial peptide from *Phormia terranova* (Diptera). Transcriptional profiles during immunization. *Eur J Biochem.* **182**: 423-427.
- Relf, J.M., Chisholm, J.R.S., Kemp, G.D. and Smith, V.J. (1999) Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDA antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* **264**: 350-357.
- Renault, T., Le Deuff, R.S., Chollet, B., Cochenec, N. and Gérard, A. (2000) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Carssostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms.* **42**: 173-183.
- Reth, M. (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* **3**: 1129-1134.



- Richman, A.M., Bulet, P., Hetru, C., Barillas-Mury, C., Hoffmann, J.A. and Kafatos, F.C. (1996) Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Molecular Biology*. **5**: 203-210.
- Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, Y. and Aoki, T. (2002) Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol*. **13**: 69-83.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Soderhall, K. and Yepiz-Plascencia, G. (2004) Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev Comp Immunol*. **28**: 713-726.
- Saladino, R., Garcia, C., Thompson, C., Hammer, B., Parsonnet, J., Novitsky, T., Siber, G. and Fleisher, G. (1994) Efficacy of a recombinant endotoxin neutralizing protein in rabbits with *Escherichia coli* sepsis. *Circ Shock*. **42**: 104-110.
- Salin, M.L. and McCord, J.M. (1975) Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest*. **56**: 1319-1323.
- Samain, J.F., Boudry, P., Dégremont, L., Soletchnik, P., Pouvreau, S., Ropert, M., Bédier, E., Thouard, E., Haure, J., Moal, J., Huvet, A., Van Hormhoudt, A., Boulo, V., Mathieu, M., Costil, K., Kellner, K., Heude, C., Lambert, C., Soudant, P., Nicolas, J. L., Le Roux, F., Renault, T., Thomas, H., Burgeot, T., Quiniou, F., Knoery, J., Lelong, C., Moraga, D., Tanguy, A., Bacher, C., Lefèbvre, S., Mille, D., Blin, J. L., Pajot, R., Haffray, P. and Dupé, F. (2003) MORTALITÉS ESTIVALES de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (MOREST), rapport 2003, synthèse intermédiaire des résultats 2001-2002-2003, IFREMER, Brest. 27p.
- Sasamura, T., Kobayashi, T., Kojima, S., Qadota, H., Ohya, Y., Masai, I. and Hotta, Y. (1997) Molecular cloning and characterization of Drosophila genes encoding small GTPases of the rab and rho families. *Mol Gen Genet*. **254**: 486-494.
- Schreck, R., Albermann, K. and Baeuerle, P.A. (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*. **17**: 221-237.
- Schwartz, M.A. and Assoian, R.K. (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*. **114**: 2553-2560.
- Seki, N., Muta, T., Oda, T., Iwaki, D., Kuma, K., Miyata, T. and Iwanaga, S. (1994) Horseshoe crab (1,3)-beta-D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to beta-glucan-binding proteins. *J Biol Chem*. **269**: 1370-1374.
- Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y. and Fujita, T. (2001) An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol*. **167**: 4504-4510.

Shapiro, R.A., Cunningham, M.D., Ratcliffe, K., Seachord, C., Blake, J., Bajorath, J., *et al* (1997) Identification of CD14 residues involved in specific lipopolysaccharide recognition. *Infect Immun.* **65**: 293-297.

Shin, S.W., Park, D.S., Kim, S.C. and Park, H.Y. (2000) Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through O-specific chain. *FEBS Lett.* **467**: 70-74.

Shrive, A.K., Metcalfe, A.M., Cartwright, J.R. and Greenhough, T.J. (1999) C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of Limulus SAP. *J Mol Biol.* **290**: 997-1008.

Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J. and Whisstock, J. C (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* **276**: 33293-33296.

Smolowitz, R., Leavitt, D. and Perkins, F. (1998) Observations of a Protistan Disease Similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the Coast of Massachusetts. *J Invertebr Pathol.* **71**: 9-25.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1992) Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish Diseases*: 3-23.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 23-28.

Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., Bachère, E. (2005) Recombinant expression and antimicrobial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **29**:841-851.

Sonnenberg, A. (1993) Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*: 7-35.

Soulages, J.L., van Antwerpen, R. and Wells, M.A. (1996) Role of diacylglycerol and apolipoprotein-III in regulation of physicochemical properties of the lipoprotein surface: metabolic implications. *Biochemistry.* **35**: 5191-5198.

Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **76**: 301-314.

Sritunyalucksana, K., Lee, S. and Söderhäll, K. (2002) A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* **26**: 237-245.

Steiner, H. (2004) Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol Rev.* **198**: 83-96.

- Stelter, F., Loppnow, H., Menzel, R., Grunwald, U., Bernheiden, M., Jack, R.S., Ulmer, A. J. and Schutt, C. (1999) Differential impact of substitution of amino acids 9-13 and 91-101 of human CD14 on soluble CD14-dependent activation of cells by lipopolysaccharide. *J Immunol.* **163**: 6035-6044.
- Stenvik, J., Solstad, T., Strand, C., Leiros, I. and Jorgensen, T.T. (2004) Cloning and analyses of a BPI/LBP cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol.* **28**: 307-323.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirita, Y., Matsubara, D. and Muroga, K. (1998) Phagogenecity of *Vibrio splendidus* biovar II, the causative bacterium of bacillary necrosis of Japanese oyster larvae. *Fish Pathol.* **33**: 79-84.
- Sun, S.C., Lindstrom, I., Boman, H.G., Faye, I. and Schmidt, O. (1990) Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science.* **250**: 1729-1732.
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2004) Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Organ.* **61**: 123-135.
- Szalai, A.J., Briles, D.E. and Volanakis, J.E. (1995) Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J Immunol.* **155**: 2557-2563.
- Tack, B.F., Sawai, M.V., Kearney, W.R., Robertson, A.D., Sherman, M.A., Wang, W., Hong, T., Boo, L. M., Wu, H., Waring, A. J. and Lehrer, R. I.(2002) SMAP-29 has two LPS-binding sites and a central hinge. *Eur J Biochem.* **269**: 1181-1189.
- Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X.K., Strong-Sparks, W.J. and Hashimoto, Y. (1995) LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck. *Embo J.* **14**: 3403-3414.
- Tall, A. (1995) Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem.* **64**: 235-257.
- Tan, N.S., Ng, M.L., Yau, Y.H., Chong, P.K., Ho, B. and Ding, J.L. (2000) Definition of endotoxin binding sites in horseshoe crab factor C recombinant sushi proteins and neutralization of endotoxin by sushi peptides. *Faseb J.* **14**: 1801-1813.
- Tanguy, A., Guo, X. and Ford, S.E. (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene.* **338**: 121-131.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J. and Moraga, D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *Febs J.* **272**: 390-403.
- Thomas, C.J., Kapoor, M., Sharma, S., Bausinger, H., Zyilan, U., Lipsker, D., Hanau, D. and Surolia, A. (2002) Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Lett.* **531**: 184-188.

Toh, Y., Mizutani, A., Tokunaga, F., Muta, T. and Iwanaga, S. (1991) Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. *Cell Tissue Res.* **266**: 137-147.

Tong, Y. and Kanost, M.R. (2005) *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *J Biol Chem.* **280**: 14923-14931.

Tossi, A. and Sandri, L. (2002) Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 743-761.

Tzou, P., De Gregorio, E. and Lemaitre, B. (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* **5**: 102-110.

Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2000) Tissue-Specific Inducible Expression of Antimicrobial Peptide Genes in *Drosophila* Surface Epithelia. *Immunity.* **13**: 737 - 748.

van der Knaap, W.P. and Loker, E.S. (1990) Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol Today.* **6**: 175-182.

Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H. and O'Leary, N. (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol.* **23**: 401-420.

Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M. and Mitta, G. (2005) Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int J Parasitol.* **35**: 215-224.

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. and Berthe, F. (2002) Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C R Biol.* **325**.

Walker, A.J. and Plows, L.D. (2003) Bacterial lipopolysaccharide modulates protein kinase C signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biol Cell.* **95**: 527-533.

Weinstein, S.L., Sanghera, J.S., Lemke, K., DeFranco, A.L. and Pelech, S.L. (1992) Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* **267**: 14955-14962.

Weiss, J. (2003) Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 785-790.

Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I. and Odeberg, H. (1978) Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **253**: 2664-2672.

- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. and Hultmark, D. (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 13772-13777.
- Westphal, O., Jann, K. and Himmelsbach, K. (1983) Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins. *Prog Allergy*. **33**: 9-39.
- Wimley, W.C., Selsted, M.E. and White, S.H. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*. **3**: 1362-1373.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. **249**: 1431-1433.
- Yang, Y., Poncet, J., Garnier, J., Zatylny, C., Bachère, E. and Aumelas, A. (2003) Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem*. **278**: 36859-36867..
- Yang, Y.S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J.F., Roch, P. and Aumelas, A. (2000) Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin (MGD - 1). *Biochemistry*. **39**: 14436 - 14447.
- Yigzaw, Y., Gielens, C. and Preaux, G. (2001) Isolation and characterization of an alpha-macroglobulin from the gastropod mollusc *Helix pomatia* with tetrameric structure and preserved activity after methylamine treatment. *Biochim Biophys Acta*. **1545**: 104-113.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. and Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem*. **271**: 13854-13860.
- Yu, B., Hailman, E. and Wright, S.D. (1997) Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest*. **99**: 315-324.
- Zanetti, M., Gennaro, R. and Romeo, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters*. **374**: 1-5.