

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

**THESE**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'université Montpellier II**

*Discipline : Microbiologie, Parasitologie*

*Ecole Doctorale : Systèmes intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,  
Hydrosciences et Environnement (SIBAGHE)*

**Aspects moléculaires et biochimiques des stylicines, peptides multifonctionnels identifiés chez la crevette bleue du Pacifique  
*Litopenaeus stylirostris* (Crustacea, Decapoda).**

Présentée et soutenue publiquement par

**Jean-Luc ROLLAND**

le 6 juillet 2010

Devant le jury composé de :

Pr. Vallaëys Tatiana, Université Montpellier II  
Pr. Vivarès Christian, Université Clermont-Ferrand  
Dr. Cochenec-Laureau Nathalie, IFREMER, Nantes  
Pr. Baghdiguian Stephen, Université Montpellier II  
Dr. Braquart-Varnier Christine, Université de Poitiers  
Dr. Romestand Bernard, Université Montpellier II

*Présidente*  
*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Directeur de Thèse*

## *Avant propos*

*Je remercie Monsieur Marc Trousselier de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche.*

*Je remercie Monsieur Bernard Godelle pour m'avoir accepté dans sa formation doctorale.*

*Merci à Madame Evelyne Bachère de m'avoir offert l'opportunité de participer aux travaux de son équipe.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Bernard Romestand, mon Directeur de thèse, pour la richesse de ses conseils, et sa disponibilité. Merci à toi Bernard de m'avoir supporté, il en fallait du courage. Merci surtout à toi de m'avoir fait confiance.*

*J'exprime toute ma gratitude à Madame Tatiana Vallaeys qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Christian Vivarès et Madame Nathalie Cochennec-Laureau pour avoir acceptés de juger ce travail en dépit de leurs nombreuses obligations.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude également à Monsieur Stephen Baghdiguan et Madame Christine Braquart-Varnier qui m'ont fait l'honneur d'être examinateur de ce travail.*

*Je tiens à remercier les îliens du pacifique pour m'avoir fourni une partie du matériel biologique nécessaire à la réalisation de cette thèse: Dra Marina Esquerra, Yannick Gueguen, Jean Goguenheim, Yannick Labreuche et Jean Cuzon.*

*Je remercie Delphine Destoumieux et Julien de Lorgeril pour leur contribution à ce travail.*

*Merci à Adrien Santini et Marc Leroy pour toute l'aide technique qu'ils m'ont apportée.*

*Merci aussi aux autres membres du laboratoire pour leur soutien, et leur amitié : Julie, Marie-Lyse, Paolina et Raphaël, sans oublier notre Staf administratif, Cédric, Marie-Claire, Solange et Marion.*

*Enfin, merci à l'IFREMER de m'avoir donné l'opportunité de valoriser mon activité professionnelle et de m'accorder sa confiance.*

*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.*

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	7
<b>INTRODUCTION</b>	8
<b>CHAPITRE I: L'IMMUNITE DES CRUSTACES</b>	12
<b>A. Le modèle de l'étude : <i>Litopenaeus stylirostris</i></b>	
<b>1. Taxonomie</b>	14
<b>2. Aspects morphologiques</b>	14
<b>3. Le système circulatoire, l'hémolymphe (sang)</b>	18
<b>B. Les hémocytes et les réactions hémocytaires.</b>	
<b>1. Les types hémocytaires</b>	18
<b>2. La coagulation</b>	20
<i>a) Chez la limule "horseshoe crab"</i>	22
<i>b) Chez les Crustacés</i>	22
<b>3. Mélanisation et système prophénoloxidase</b>	24
<b>4. La phagocytose et l'encapsulation</b>	26
<b>5. l'ARN interférence</b>	28
<b>6. Les peptides antimicrobiens (PAMs)</b>	28
<b>7. Régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens</b>	31
<b>8. Les facteurs d'adhésion cellulaire et de communication</b>	32
<b>CHAPITRE II : CARACTERISATION DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	
<b>CODANT LES STYLICINES</b>	35
<b>A. Matériels et méthodes</b>	
<b>1. Echantillonnage</b>	37
<b>2. Extraction, purification et dosage des ADN génomiques</b>	37
<b>3. Extraction des ARN</b>	38

<b>4. Synthèse des ADNc</b>	39
<b>5. Amplification par PCR</b>	39
<b>6. Séquençage</b>	41
<b>7. Analyse des séquences</b>	41
<b>8. Analyse de la diversité génétique</b>	41
<b>9. Expression des ARNm</b>	41
<i>a) Infections expérimentales</i>	41
<i>b) PCR quantitative.</i>	43
<b>B. Résultats</b>	
<b>1. Caractérisation du gène codant la stylicine1</b>	
<i>a) Séquence de l'ADN complémentaire</i>	45
<i>b) Séquence issue d'ADN génomique</i>	45
<b>2. Caractérisation du gène codant la stylicine2</b>	
<i>a) Séquence de l'ADN complémentaire</i>	49
<i>b) Séquence issue d'ADN génomique</i>	49
<b>3. Caractérisation des gènes dans diverses populations de <i>L. stylirostris</i></b>	
<i>a) Du gène codant la stylicine1</i>	49
<i>Polymorphisme intronique</i>	51
<i>Polymorphisme de l'exon 1</i>	51
<i>Polymorphisme de l'exon 2</i>	53
<i>b) Du gène codant la stylicine2</i>	57
<b>4. Expression des ARNm codant les stylicines 1 et 2</b>	
<i>a) Expression de l'ARNm codant la stylicine1</i>	59
<i>b) Expression de l'ARNm codant la stylicine2</i>	61
<b>5. Mise en évidence des stylicines chez d'autres crevettes pénéides.</b>	
<i>a) Par amplification PCR</i>	63
<i>b) Par homologie de séquences</i>	63
<b>C. Discussion</b>	64

**A. Matériels et méthodes**

<b>1. Production des stylicines recombinantes</b>	70
a) <i>Clonage des gènes et expression des peptides recombinants</i>	70
b) <i>Purification, clivage et renaturation des peptides recombinants</i>	71
c) <i>Analyse de la structure secondaire</i>	72
<b>2. Détection des rstylicines</b>	
a) <i>Préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques des rstylicines</i>	72
b) <i>Localisation des rstylicines</i>	72
<b>3. Propriétés biologiques</b>	
a) <i>Tests antiprolifératifs</i>	73
<i>Tests antibactériens</i>	73
<i>Tests antifongiques</i>	74
<i>Test anti-tumoral</i>	75
b) <i>Tests de « Binding »</i>	75
<i>A la paroi des bactéries Gram(-)</i>	75
<i>Au LPS des bactéries Gram(-)</i>	76
c) <i>Agglutination des bactéries Gram(-)</i>	77
d) <i>Test de perméabilisation des membranes microbiennes</i>	77
e) <i>Exploration de l'hémostase</i>	78
<i>Temps de Céphaline kaolin (TCK)</i>	78
<i>Temps de Quick (TQ)</i>	78
<i>Temps de thrombine (TT)</i>	78

**B. Résultats**

<b>1. Production des stylicines recombinantes en système <i>E. coli</i></b>	
a) <i>Stratégie de clonage</i>	80
b) <i>Expression en système hétérologue <i>E. coli</i></i>	80
c) <i>Purification</i>	84
d) <i>Structure bidimensionnelle</i>	84

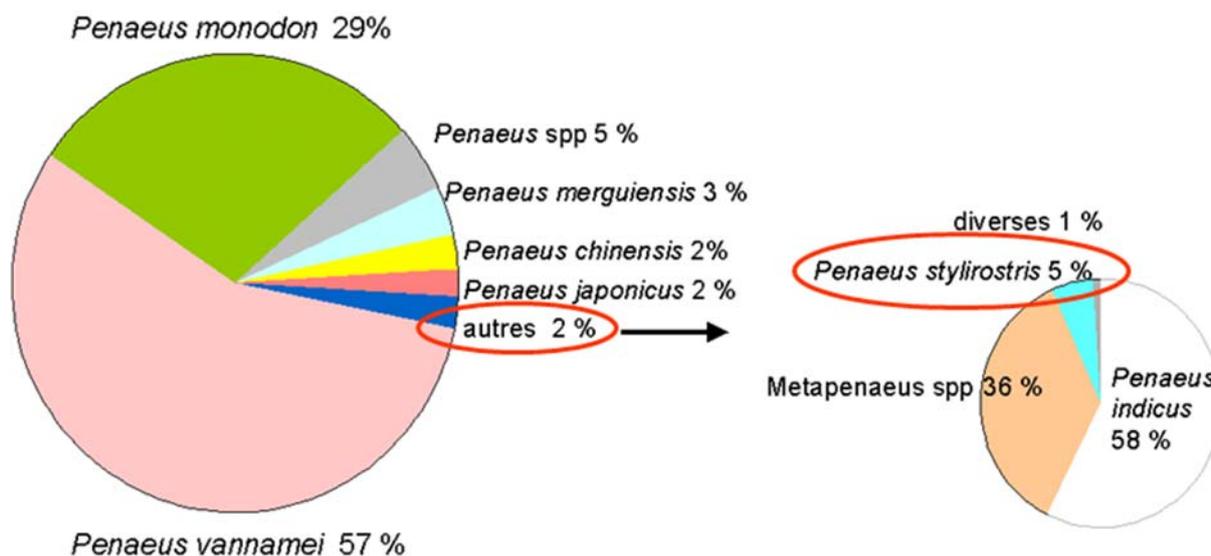
<b>2. Localisation des stylicines</b>	
<i>a) Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre les rstylicines.</i>	86
<i>Production des anticorps</i>	86
<i>Réactivité et spécificité des anticorps</i>	86
<i>b) Localisation des stylicines dans les hémocytes</i>	88
<b>3. Activités biologiques sur les bactéries</b>	
<i>a) Activités antibactériennes</i>	88
<i>b) Effets bactériostatiques</i>	92
<i>c) Agglutination</i>	92
<i>d) Fixation au LPS de la paroi des bactéries Gram(-)</i>	94
<b>4. Activités biologiques sur les champignons</b>	
<i>a) Activité antifongique</i>	96
<i>b) Perméabilisation des membranes</i>	96
<b>5. Activités sur les cellules de myélome murin</b>	96
<b>6. Activités anticoagulantes</b>	98
<b>C. Discussion</b>	100
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	103
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	106
<b>ANNEXE (publication)</b>	119

## LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
Abs	Absorbance
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALF	Anti-lipopolsaccharide-factor
Amp	Ampicilline
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BET	Bromure d'Ethidium
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosine
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNBr	Bromure de Cyanogène
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DMF	N, N diméthylformamide
dNTP	2'-désoxynucléotide-5'-phosphate
DO	Densité Optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	Expressed Sequence Tag
EDTA	Ethylène diamine tétracétique
G	Guanine
His	Histidine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycine
KDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani (milieu de culture)
LBP	Lipopolsaccharides binding protein
LPS	Lipopolsaccharides
Met	Méthionine
NTA	Nickel nitriloTriacetic Acid
PB	Poor Broth (milieu de culture)
pb	paires de base
PDB	Potatoes Dextrose Broth (milieu de culture)
Pep	Peptide
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
pI	point isoélectrique
PAM	Peptide Antimicrobien
Rnase A	Ribonucléase A
rpm	rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcription - PCR
SOD	Superoxide dismutase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SSH	Hybridation Soustractive (Subtractive Hybridization)
T	Thymine
TGase	Transglutaminase
Taq (polymérase)	Polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TFA	Acide Trifluoro Acétique
TGase	Transglutaminase
TEMED	N, N, N', N'- tétraméthylène diamine
X gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactopyranoside

## INTRODUCTION

L'aquaculture de la crevette a débutée dans les années 1970 elle est pratiquée dans plus de 60 pays dans le monde. Principalement dans les pays asiatiques et en Amérique Latine. La Chine étant le premier pays producteur, suivie par la Thaïlande, l'Indonésie, le Vietnam, le Brésil, le Mexique et l'Equateur. En valeur, le commerce des crevettes se situe au premier rang des échanges mondiaux de produits aquatiques (FAO, 2006). Parmi les nombreuses espèces de crevettes exploitées, principalement des crevettes pénéides, deux espèces dominent le marché mondial, *Litopenaeus vannamei* et *Penaeus monodon*. Elles représentaient à elles seules, en 2000, 86% de la production mondiale (Figure 1). Cette production aquacole, connaît une forte croissance en moyenne 18,9 % par an depuis ses débuts (Chim *et al.*, 2002) pour atteindre, en 2005, 2,6 millions de tonnes. Cette croissance s'est fortement ralentie dans tous les principaux pays producteurs, passant à 9,1 %, pendant les années 1990-2000 en raison de l'apparition de maladies d'origine virale ou bactérienne. Elles se sont même effondrées sous l'effet conjugué des virus WSSV (White Spot Syndrom Virus) et YHV (Yellow Head Virus) à Taïwan en 1987-88, puis en Chine, en Indonésie, en Equateur, au Mexique, et en Inde entre 1993 et 1996. Depuis d'autres viroses ont été répertoriées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) chez les crevettes pénéides: le Syndrome de Taura, la baculovirose tétraédrique (*Baculovirus penaei*), la baculovirose sphérique (baculovirus spécifique de *Penaeus monodon*), et la nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse (IHHNV). Si les pertes les plus importantes chez les crevettes pénéides sont dues aux virus, l'apparition de maladie liées à des bactéries appartenant au genre *Vibrio* comme *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*, ou encore *V. damsela*, constituent un problème zoonitaire important (Lightner, 1998 ; Song *et al.* 1993 ; Alday-Sanz *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2004 ; Goarant *et al.*, 2006a). A titre d'exemple, les pertes liées à ces types de pathologies dans les écloséries indonésiennes étaient de l'ordre de 100 millions de dollars US en 1991 (APEC, 2000). Les pertes annuelles liées à l'ensemble de ces maladies étant estimées en 2001 à 3 milliards de dollars US (Subasinghue *et al.*, 2001).



**Figure 1** : Répartition de la production mondiale des crevettes péneïdes.  
(Source FAO donnée 2005)

La crevette *Litopenaeus stylirostris*, importée du Mexique, a été introduite en Nouvelle-Calédonie en 1972 par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) (ex CNEXO). Cette espèce s'est avérée bien adaptée aux conditions climatiques locales qui présentent des fluctuations saisonnières marquées entre l'été et la saison fraîche des mois d'hiver. Cependant sa production reste confidentielle, avec une moyenne de 1 500 tonnes par an, soit 0.1% de la production mondiale (Figure 1). Mais sa haute valeur ajoutée fait de cette production la deuxième ressource d'exportation de la Nouvelle Calédonie après le nickel. Cela correspond à 5 écloséries, 19 fermes et plus de 1000 emplois permanents pour un chiffre d'affaires, se situant en 2004, à 22.7 millions d'Euros.

Malheureusement, depuis plusieurs années, cette filière fait face à différents problèmes qui affectent fortement son développement. D'abord, des problèmes économiques, structurels et conjoncturels, comme son manque de compétitivité par rapport aux grands pays producteurs d'Asie (Indonésie, Thaïlande, Inde...) et d'Amérique du sud (Brésil, Equateur, Argentine...) qui l'oblige à viser des créneaux "haut de gamme" sur des marchés exigeants tels que le Japon, l'Australie et l'Europe. Ces contraintes de marché ont favorisé des conditions d'élevages de plus en plus productives basées sur la rentabilité en négligeant la capacité de charge, la qualité

et la préservation de l'environnement et le contrôle sanitaire des individus en élevage (Kautsky *et al.*, 2000). Ceci a conduit à l'émergence de nombreuses maladies infectieuses. Si *L. stylirostris* en élevage en Nouvelle Calédonie sort indemnes de toutes les pathologies virales connues ceci est probablement dû au fait que toutes les populations d'élevages sont actuellement issues de la souche Tahitienne *L. stylirostris* SPR43, transférée en Nouvelle-Calédonie pour sa capacité à résister aux virus IHHN et Taura (Weppe *et al.*, 1993) et à l'origine de la relance de l'élevage, dans les années 1990. Il n'en est pas de même pour leurs résistances aux pathologies bactériennes. En effet, la première pathologie bactérienne saisonnière, nommée « Syndrome 93 » est apparue en Nouvelle Calédonie au cours de l'hiver 93. Due à la bactérie pathogène, *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998; Mermoud *et al.*, 1998 ; Lemonier, 2006), cette maladie a conduit à l'abandon des élevages en hiver sur l'ensemble du territoire Calédonien. Une seconde vibriose appelé « syndrome d'été », est apparue au cours de l'été 1997, son caractère septicémique étant à relier à la bactérie *Vibrio nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006a et b ; Lemonier, 2006 , Reynaud, 2008).

Devant ces problématiques, la prévention et le contrôle des maladies sont devenus des axes prioritaires pour l'industrie pénicole calédonienne qui représente une importante source de revenus et d'emplois. Ainsi depuis 2002, un programme d'études multidisciplinaires (DESANS) pour Défi Santé *Stylirostris* basé sur l'analyse croisée de résultats issus de différentes spécialités comme la zootechnie, l'écologie, la nutrition, la physiologie, l'immunologie, la pathologie et la génétique, a été entrepris par l'IFREMER (Herbland et Harache, 2008). Depuis de nouvelles approches basées sur l'évaluation de l'état de santé des animaux d'élevage et la sélection génétique de lignées résistantes ont été considérées. Une part importante étant réservée, à la compréhension des mécanismes immunitaires et plus particulièrement, à la caractérisation des substances impliquées dans la défense comme les molécules antimicrobiennes (Aguirre-Guzman *et al.*, 2009). C'est dans ce sens que les travaux de recherche effectués au sein de l'UMR 5119 (IFREMER/CNRS/UM2/IRD) équipe RIAE (Réponse Immunitaire Adaptation et Environnement), sont orientés sur l'étude la réponse immunitaire des invertébrés marins (Crevettes et Huîtres) d'intérêts aquacoles. Une attention particulière a été portée au cours des dernières années, sur les effecteurs anti-infectieux, et notamment, les peptides antimicrobiens, depuis leur caractérisation biochimique et génomique, à l'étude de la régulation et de la localisation de leur expression au cours de la réponse immunitaire.

C'est dans le cadre de la mise en place des méthodes d'évaluation de l'état de santé des crevettes d'élevages utilisables en prophylaxie et en sélection génétique, qu'un travail de Doctorat (de Lorgeril, 2005 ; thèse de l'université Montpellier 2) a été effectué. Ce travail a porté sur la recherche de gènes exprimés en réponse de la crevette *Litopenaeus stylirostris* à une infection par le pathogène, *Vibrio penaeicida*, (un des principaux agents affectant les élevages de Nouvelle Calédonie).

Les résultats de ces travaux ont mis en évidence une sur expression de transcrits hématocytaires codant :

- des effecteurs connus de la réponse antimicrobienne comme la pénécidine 3 et le lysozyme.

- Mais aussi un nouvel effecteur, un peptide riche en acides aminés proline et cystéine, nommé "cryptidine like" dont le rôle est inconnu. La séquence de ce dernier présentant des homologies avec une  $\alpha$  défensine (de Lorgeril *et al*, 2005), molécule antimicrobienne identifiée chez la souris (Ouellette *et al*, 1990).

C'est sur les aspects moléculaires et biochimiques (caractérisations) de deux de ces peptides riches en proline et cystéine que nous avons focalisé notre travail. Ces peptides que nous les avons renommés stylicines en remplacement du terme "cryptidine like".

Le premier chapitre de ce travail est un état des connaissances sur l'immunité des crustacés, et plus particulièrement des crevettes.

Le deuxième chapitre décrit les deux gènes qui codent les stylicines chez *L. stylirostris*, leurs diversités génétiques, et l'expression de leurs transcrits au cours d'une infection microbienne.

Le troisième chapitre traite des activités biologiques des formes recombinantes de ces peptides produits en système recombinant hétérologue *E. coli*.

La dernière partie présente, les principales conclusions de notre étude, ainsi que les perspectives qui s'ouvrent à la suite de ce travail.

## **CHAPITRE I**

### **L'IMMUNITE DES CRUSTACES**

L'immunité innée est le premier système de défense, phylogénétiquement parlant, présent chez tous les organismes pluricellulaires. Ce système constitue une première ligne de défense permettant de limiter l'infection à ses premiers stades. Il repose sur un système de reconnaissance de motifs moléculaires présents sur les parois et membranes des microorganismes. Contrairement aux vertébrés, le système immunitaire des crustacés se caractérise, par l'absence de mécanisme de défense acquis basé sur une mémoire immunitaire permettant la reconnaissance spécifique d'agents infectieux rencontrés préalablement.

La réponse immunitaire des crustacés fait appel à un système immunitaire inné impliquant des mécanismes peu spécifiques à médiations humorale et cellulaire. Elle passe tout d'abord, par une reconnaissance de l'agent pathogène via certaines molécules du non-soi, comme les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram (-), les peptidoglycanes de la membrane des bactéries Gram (+) et les  $\beta$ -glucanes de la paroi des champignons. Des molécules exogènes capables de lier spécifiquement ces éléments ont été décrits chez un grand nombre de crustacés, par exemple les lectines et les agglutinines qui réalisent des liaisons aux LPS ou autres GBP "Glucan Binding Proteins" qui se lient au  $\beta$ -1,3-glucane. Ces molécules de reconnaissance interagissent ensuite avec les cellules immunitaires.



**Figure 2.** La crevette bleue du pacifique *Litopenaeus stylirostris*

Ces dernières sont véhiculées par l'hémolymphe et appelées hémocytes. Il s'agit de cellules immunocompétentes qui constituent les effecteurs principaux de l'immunité des crustacés. Selon leurs caractéristiques, différentes fonctions ont pu être attribuées à ces types cellulaires : la coagulation serait associée aux hyalinocytes, la phagocytose et l'activation du système pro-PO seraient des fonctions jouées par les cellules granuleuses et semi-granuleuses. Quoiqu'il en soit, une fois activées, ces cellules sont capables à leur tour d'activer différents systèmes de défense comme : la coagulation cellulaire et plasmatique, le système pro-PO ; la phagocytose, l'encapsulation, l'ARN interférence ou la production de peptides antimicrobiens (AMPs).

## **A. Le modèle de l'étude : *Litopenaeus stylirostris***

### **1. Taxonomie**

La crevette *L. stylirostris* (Figure 2), communément appelée « crevette bleue du pacifique », appartient à l'embranchement des Arthropodes, ordre des Décapodes, famille des Pénéides:

**Phylum : Arthropoda**

**Sous-Phylum :**Crustacea

**Classe :** Malacostraca

**Sous-Classe :** Eumalacostraca

**Super-Ordre :** Eucarida

**Ordre : Décapoda**

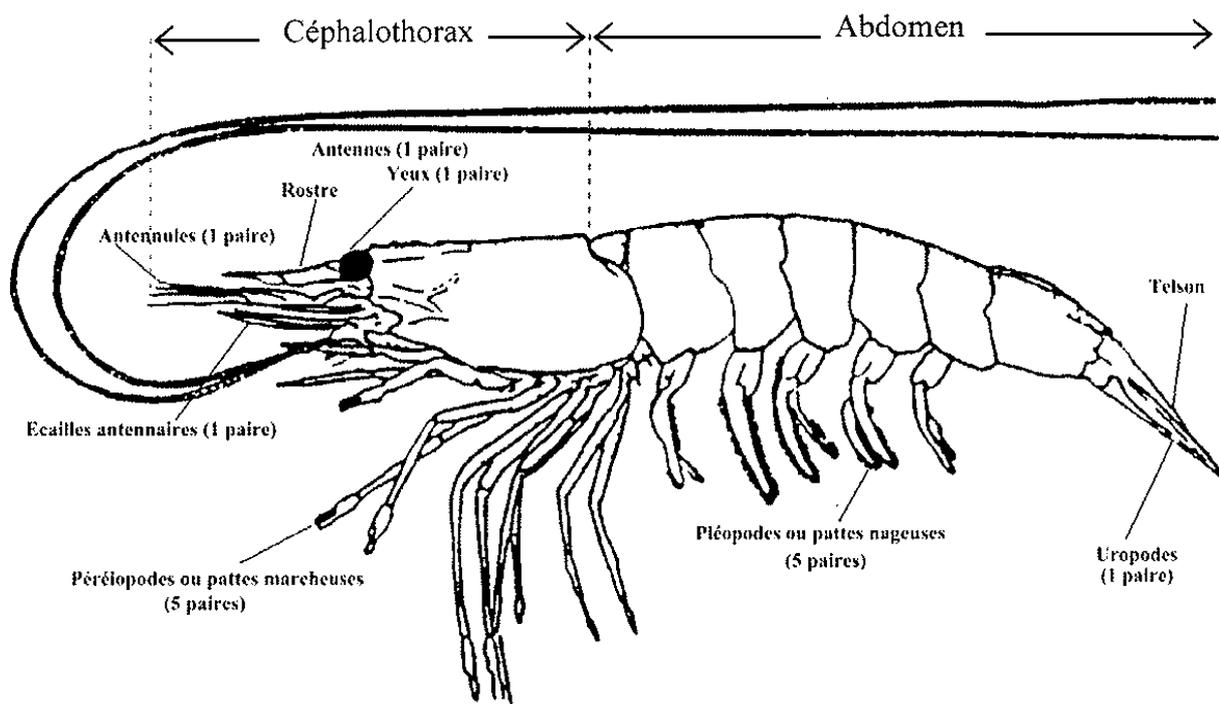
**Sous-Ordre :** Dendrobranchiata

**Super-Famille :** Penaeoidea

**Famille : Penaeidae**

**Genre :** *Litopenaeus* (Perez Farfante, 1997)

**Espèce :** *Litopenaeus stylirostris*



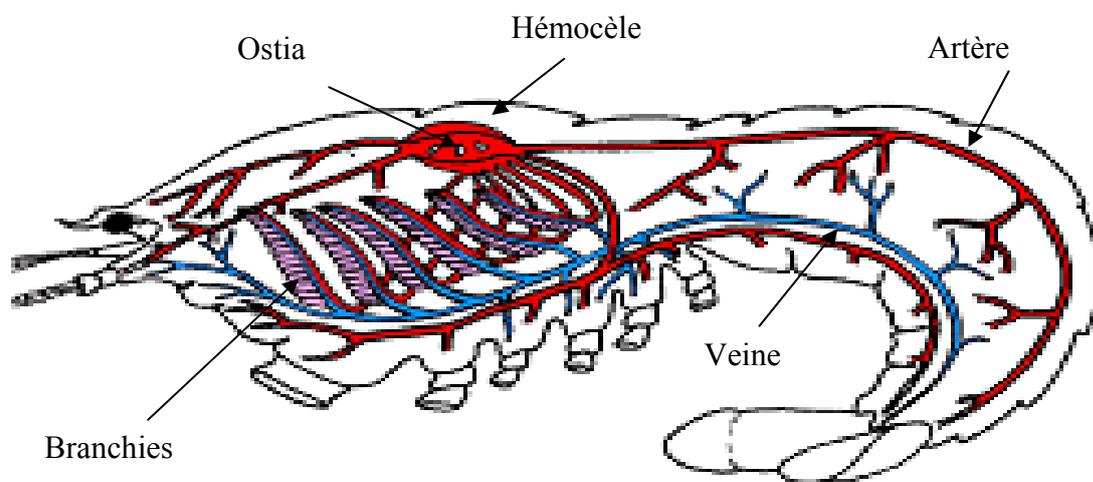
**Figure 3.** Morphologie externe d'une crevette

## 2. Aspects morphologiques

Les crevettes pénéides vivent par de faibles profondeurs (0 à 25 m) et leur distribution est limitée à une zone déterminée par les isothermes de surface de 20°C en été.

L'espèce *L. stylirostris* est originaire d'Amérique centrale et du sud, son aire de répartition se situe essentiellement à la hauteur de la ceinture tropicale, plus particulièrement étendue entre le golfe de Californie et le sud du Pérou. *L. stylirostris* était couramment élevée dans plusieurs pays d'Amérique latine jusque dans les années 1980, date à laquelle apparut le virus IHHNV auquel cette espèce est particulièrement sensible. Certaines souches domestiquées, comme celle présente en Nouvelle Calédonie, ont développé un état de tolérance à ce virus (Flegel, 2007). Sur le marché américain, *L. vannamei* et *L. stylirostris* sont commercialisées sous l'appellation "western white shrimp".

Comme tous les crustacés, les crevettes pénéides sont caractérisées par une métamérisation du corps, divisé en trois parties (Figure 3): tête (ou acron), thorax (ou péréion) et un abdomen (ou pléion) qui se termine par un telson. Chez les Crustacés Décapodes, la tête et le thorax sont soudés forment le céphalothorax. Les crevettes de la famille des Pénéidés sont caractérisées par un rostre à dents en position ventrale et en position dorsale. *L. stylirostris* possède un rostre très développé possédant huit dents sur le bord dorsal et trois en position ventrale. On reconnaît aussi les pénéides à la présence de pinces aux trois premières paires de pattes thoraciques (péréiopodes). La partie abdominale est composée de 6 segments (métamères) portant chacun une paire de pattes nageuses (pléopodes) sauf le dernier segment qui se termine par le telson. La cuticule est lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert chez la crevette *L. stylirostris*, d'où son appellation « crevette bleue ».



**Figure 4.** L'appareil circulatoire de la crevette *L. stylirostris*

### **3. Le système circulatoire, l'hémolymphe (sang)**

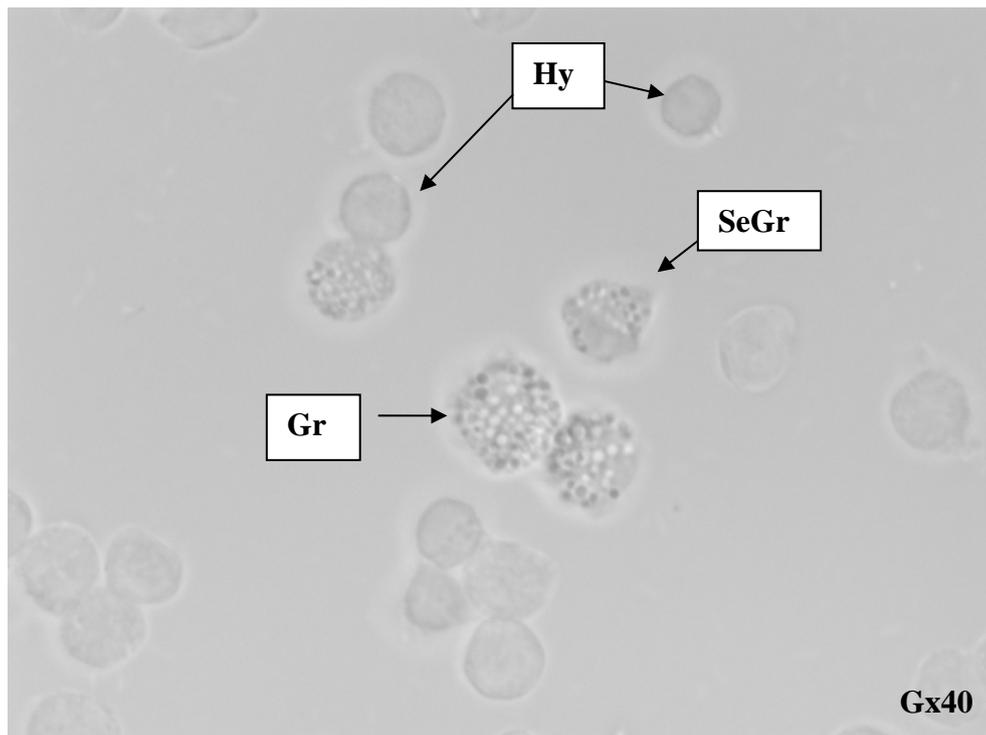
L'appareil circulatoire des crustacés (Figure 4) est très différent de celui de l'homme. L'hémolymphe (ou sang des arthropodes) qui y circule est composée de matières dissoutes comme des glucides, des sels minéraux, des protéines et contient des hémocytes. Le cœur pompe l'hémolymphe contenu dans la cavité péricardique (qui entoure le cœur) par des orifices nommés ostia ou ostioles. Il le propulse dans un vaisseau dorsal et dans des vaisseaux latéraux pour remplir l'hémocèle. L'hémocèle est une cavité interne dans laquelle les organes baignent directement dans l'hémolymphe. L'hémolymphe est conduite jusqu'aux branchies pour s'oxygéner puis est reconduite dans la cavité péricardique. L'hémolymphe ne circulant pas en permanence dans les vaisseaux, on parlera de circulation ouverte.

#### **B. Les hémocytes et les réactions hémocytaires.**

Chez la crevette, la réponse immunitaire comporte deux phases. Une première phase, ou réaction locale, qui se caractérise par du chimiotactisme, c'est à dire le recrutement et la lyse d'hémocytes granuleux dans le foyer infectieux. La deuxième phase correspond à une amplification de la réponse immunitaire.

##### **1. Les types hémocytaires**

Des populations d'hémocytes ont été décrites pour la première fois chez l'isopode terrestre *Porcellio dilatatus* (Coutant, 1977) mais aussi chez les décapodes (Söderhäll et Smith, 1983; Vazquez *et al*, 1997; Gargioni et Barracco, 1998). Trois types d'hémocytes morphologiquement différents ont été mis en évidence dans la circulation générale chez les crustacés (Bauchau, 1980). On distingue les cellules hyalines, de petites tailles et dépourvues de granules, les hémocytes semi-granulaires pourvus de petits granules denses aux électrons, et les hémocytes granulaires pourvus de nombreux gros granules. Cependant plusieurs études réalisées sur le tissu hématopoïétique de différentes crevettes, comme : *Sicyonia*, *Macrobrachium* et *Penaeus*, avancent l'hypothèse de l'existence de seulement deux lignées hémocytaires morphologiquement et fonctionnellement distinctes (Martin and Graves, 1985; Gargioni and Barracco, 1998; van de Braak *et al*, 2002), une lignée granulaire et une lignée agranulaire.



**Figure 5.** Observation microscopique des trois types d'hémocytes présents dans l'hémolymphe de la crevette *L. stylirostris* :

Hémocyte granuleux (**Gr**)

Hémocyte semi-granuleux (**SeGr**)

Cellule hyaline ou hyalinocyte (**Hy**)

Quoi qu'il en soit, chez *L. stylirostris* on distingue trois types hémocytaires : les hémocytes granuleux, semi-granuleux et les hyalinocytes (Figure 5).

Les hémocytes granuleux et semi-granuleux synthétisent puis stockent dans leurs granules les protéines du système immunitaire, comme les agglutinines, les péroxinectines, des enzymes cytolytiques, les enzymes du système pro-phénoloxydase ou encore des peptides antibactériens. Ces différentes molécules sont libérées dans l'hémolymphe, sur le site de l'infection ou de la blessure (Smith et Söderhäll, 1983; Söderhäll *et al*, 1985; Söderhäll *et al*, 1986; Kobayashi *et al*, 1990; Johansson *et al*, 2000; Munoz *et al*, 2002, Supamattaya *et al*, 2003). Chez les crevettes, la phagocytose est effectuée par ces hémocytes.

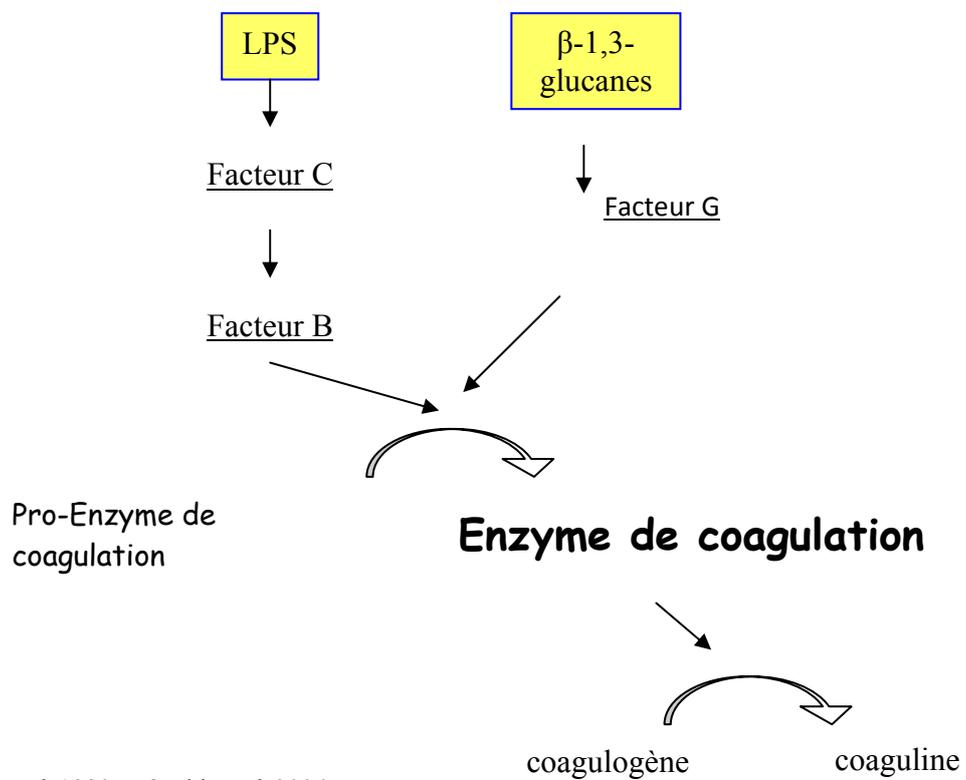
Les cellules hyalines contrairement aux deux autres types cellulaires, ont un contenu cytoplasmique moins riche en protéines et plus particulièrement en protéines lysosomales (Hose *et al*, 1990; Lanz *et al*, 1993, Johansson, 1999). Elles ont été décrites comme jouant un rôle dans la coagulation (Hose *et al*, 1990; Gargioni et Barracco, 1998).

## **2. La coagulation**

La coagulation chez les invertébrés comme chez les vertébrés, est une réaction importante, qui permet de stopper les hémorragies et de limiter la pénétration de microorganismes lors de blessures. La coagulation fait partie des mécanismes de la réponse humorale des crustacés et constitue une première ligne de défense vitale. En effet, leur système circulatoire étant ouvert, une obturation rapide par coagulation des liquides biologiques d'une blessure peut éviter, non seulement une perte de sang rapide et grave pour ces animaux, mais également la propagation d'agents infectieux tels que bactéries ou virus dans leur organisme (Söderhäll et Serenius, 1992). Elle consiste en une coagulation plasmatique ou une coagulation cellulaire, selon qu'elle implique la formation d'un gel constitué par la polymérisation sous l'action d'une transglutaminase (Lee and Söderhäll, 2001) d'une protéine du plasma, ou d'un agrégat de protéines issues d'un lysat hémocytaire.



**Figure 6.** La limule "horseshoe crab": *Limulus polyphemus* (gauche) et un fossile de limule (droite)



**Figure 7.** Représentation schématique de la cascade de la coagulation chez la limule

### **a) Chez la limule "horseshoe crab"**

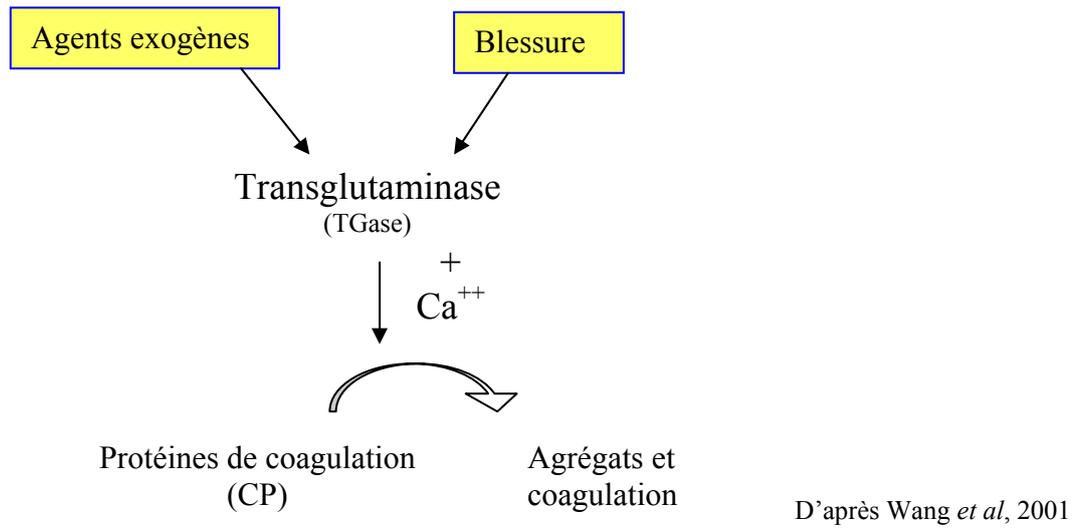
La limule, *Limulus polyphemus*, qualifiée d'espèce fossile (Figure 6) car elle ne semble pas avoir évolué depuis 500 millions d'années, est un arthropode proche phylogénétiquement des arachnides mais aussi des crustacés par certaines caractéristiques. Cet animal possède des mécanismes de coagulation sanguine originaux.

La coagulation se traduit par la gélification de son hémolymphe au site de blessure ou de l'entrée de l'agent exogène (bactérie, champignon). Ce phénomène résulte de la polymérisation du coagulogène (protéine de coagulation plasmatique) en coaguline sous l'action d'une enzyme de coagulation, la transglutaminase. La reconnaissance des micro-organismes se fait grâce à des composants présents sur leur membrane ou de leur paroi, comme les lipo-polysaccharides (LPS) des bactéries Gram (-) et les  $\beta$ -1,3-glucanes des champignons. Une fois le micro-organisme détecté, une cascade enzymatique est activée durant laquelle participent le coagulogène et quatre zymogènes de sérines protéases: le facteur C (qui reconnaît les LPS), le facteur B, le facteur G (qui reconnaît les  $\beta$ -1,3-glucanes) et l'enzyme de pro-coagulation (Figure 7). Une fois les coagulines produites, elles s'agglutinent les unes aux autres puis se lient, sous l'action d'une enzyme la transglutaminase, aux protéines de la surface des hémocytes, les proxines pour former le « caillot » (Osaki et Kawabata, 2004).

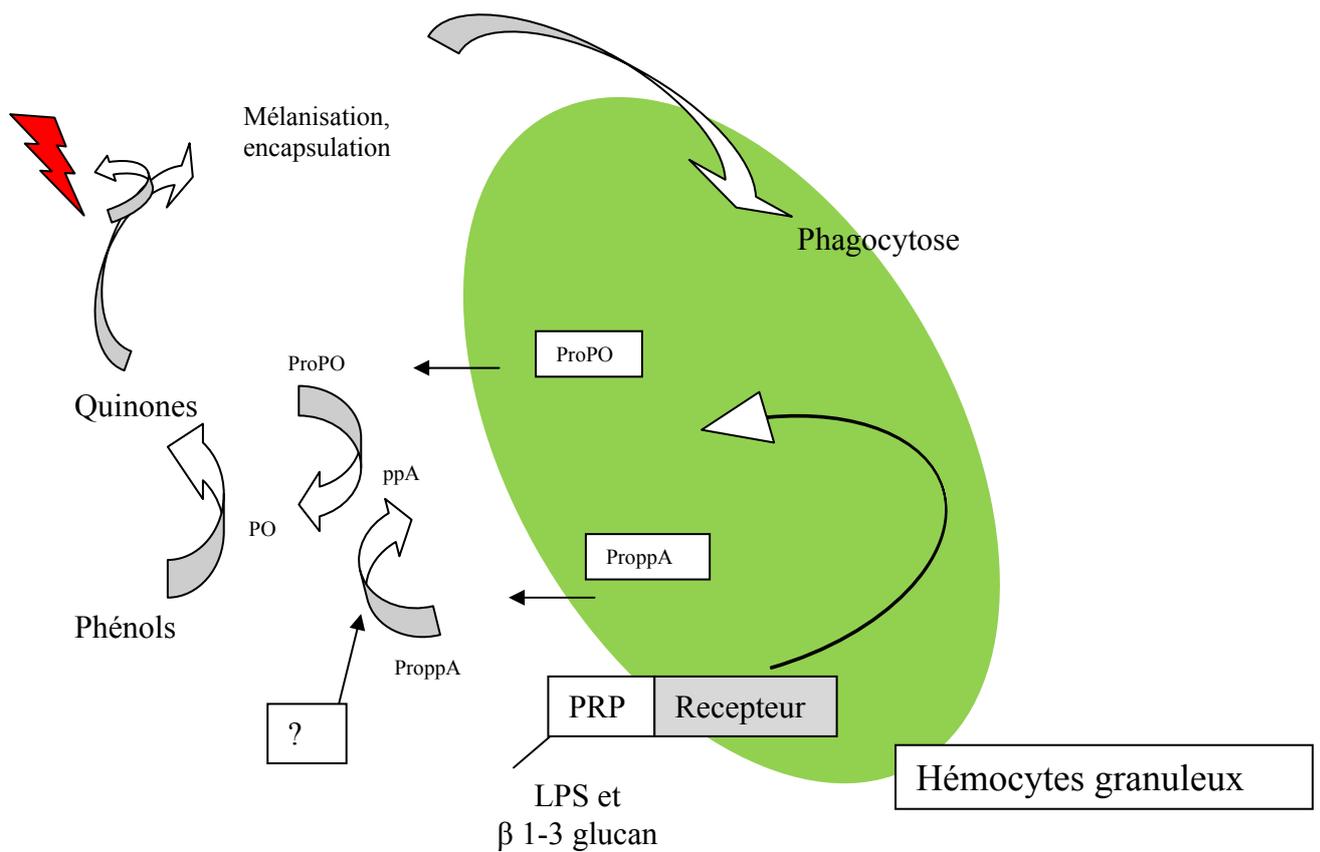
### **b) Chez les Crustacés**

Chez les crustacés, contrairement aux limules, aucune cascade enzymatique impliquée dans la coagulation n'a été mise en évidence à ce jour. Cependant deux éléments majeurs impliqués dans la coagulation et l'immunité des crevettes sont décrits, Il s'agit des protéines de coagulation (CP) et des transglutaminases (TGases) (Maningas *et al*, 2008).

Les transglutaminases sont des enzymes  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes produites principalement par les hyalinocytes (Wang *et al*, 2001) et certains tissus suite à une blessure ou à la détection d'un agent exogène. Elles peuvent avoir plusieurs substrats différents, le plus connu étant le facteur XIIIa de la coagulation. Ces enzymes chez les crustacés sont libérées dans le plasma et induisent la coagulation dès leur sécrétion en catalysant la formation de liaisons covalentes entre les résidus lysine et glutamine présents sur la protéine de coagulation (CP) afin de former un gel (Kopacek *et al*, 1993a). Il a été montré que les TGases chez le poisson chat qui sont abondantes dans les cellules du tissu hématopoïétique, contrôlent la différenciation et la migration dans l'hémolymphe des cellules hématopoïétiques (Lin *et al*, 2008).



**Figure 8.** Représentation schématique de la coagulation chez la crevette



**Figure 9 :** Schéma du système prophénoloxydase (ProPO) chez l'écrevisse.

 : Molécules bactéricides

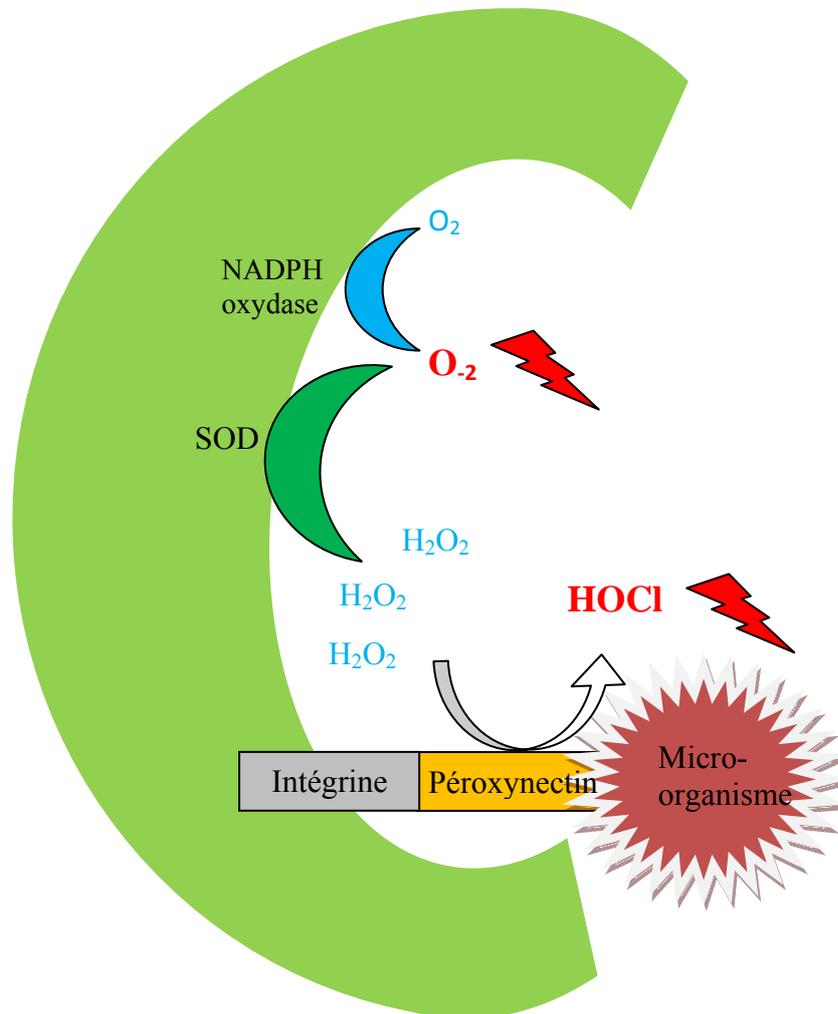
A ce jour si plusieurs transglutaminases ont été identifiées et leurs expressions étudiées chez les crevettes pénaïdes (Yeh *et al*, 2009 ; Prapavorarat *et al*, 2010) mais aucune, à notre connaissance, n'a encore été caractérisée.

Les protéines de coagulation (CP) sont des lipo-glycoprotéines qui s'associent entre elles pour former des agrégats de coagulation (Hall et Söderhäll, 1994; Yeh *et al*, 1999) sous l'action d'une transglutaminase (Figure 8). Chez la crevette *Penaeus monodon*, la protéine de coagulation, exprimée dans tous les tissus à l'exception des hémocytes circulants (Yeh *et al*, 1999), est responsable de la coagulation de l'hémolymphe. Multifonctionnelles, les CP produites dans les gonades de *Penaeus monodon* pourraient même être utilisées comme complément alimentaire par les embryons de cette crevette (Cheng *et al*, 2008). Quatorze de ces protéines de coagulation ont été partiellement caractérisées chez les crustacés décapodes : *Penaeus vannamei* et *Marsupenaeus japonicus* (Cheng *et al*, 2008), *Farfantepanæus paulensis* (Parazzolo *et al*, 2005), *Penaeus monodon* (Yeh *et al*, 1998; Yeh *et al*, 1999), *Homarus americanus* (Fuller et Doolittle, 1971a), *Panulirus interruptus* (Fuller et Doolittle, 1971b; Doolittle et Riley, 1990), *Pacifastacus leniusculus* (Kopacek *et al*, 1993a,b) et chez *Ibacus ciliatus* (Komastu et Ando, 1998).

### **3. Mélanisation et système prophénoxidase**

Le phénomène de mélanisation est observé chez les crustacés à la suite de blessures ou d'infections, il est notamment essentiel à la cicatrisation.

Chez l'écrevisse, les lipopolysaccharides,  $\beta$  glucanes ou peptidoglycanes bactériens sont reconnus par des PRP "Pattern Recognition Protein" qui en se liant à des récepteurs membranaires entraînent la libération dans l'hémolymphe de la pro-PO stockée dans les granules des hémocytes. La pro-PO est activée par une autre sérine protéase, la "prophénoxidase activating protein" (ppA) (Wang *et al*, 2001) (Figure 9). D'autres protéines sont activées en même temps, notamment des facteurs d'adhésion cellulaire (péroxynectine, masquerade), mais aussi des inhibiteurs des sérines protéases (pacifastine et  $\alpha$ -macroglobuline) qui régulent la cascade de mélanisation (Söderhäll et Söderhäll, 2001). Chez la crevette, l'expression de la pro-PO peut être régulée par des virus (Ai *et al*, 2009).



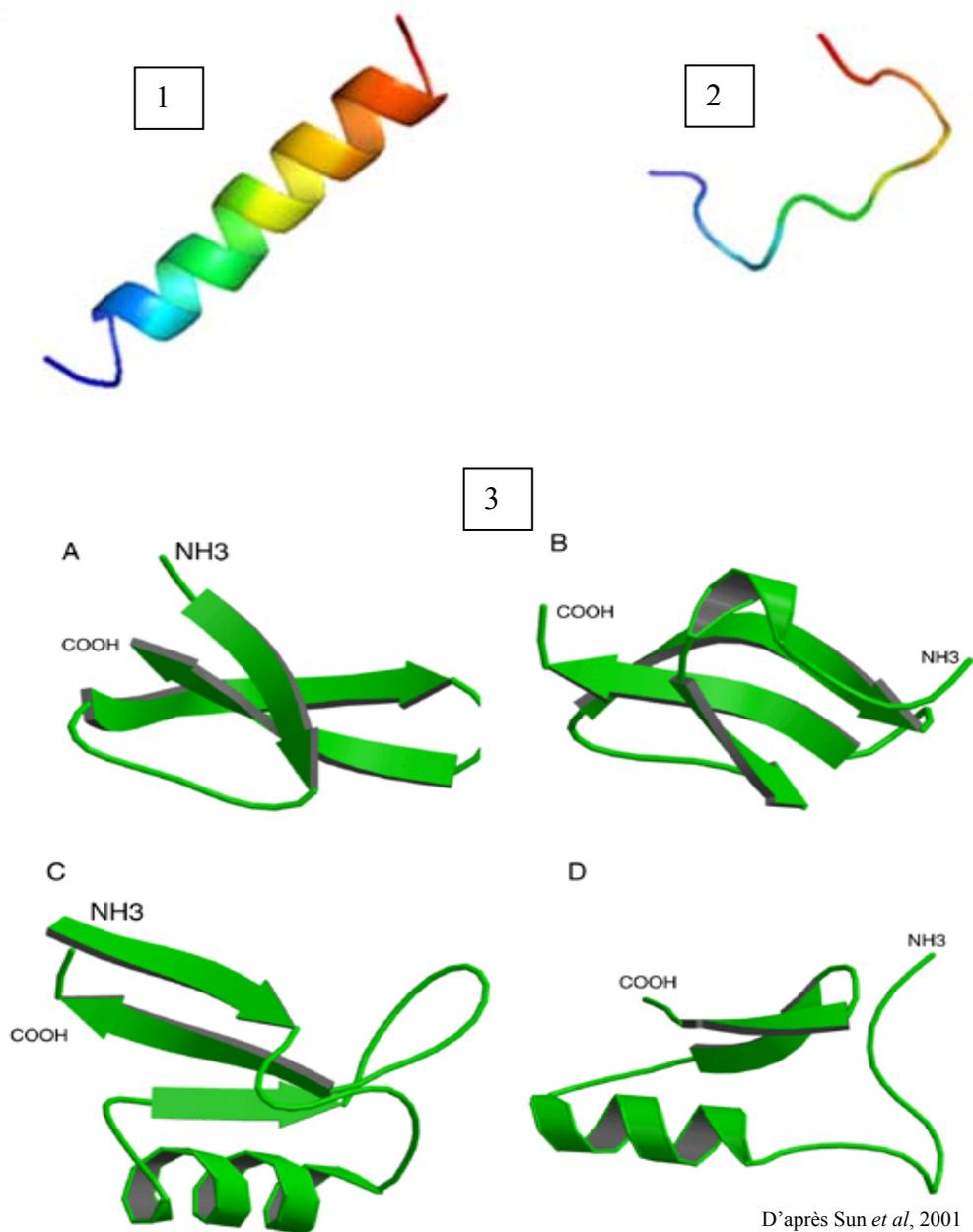
**Figure 10.** Schéma de la dégradation des microorganismes après phagocytose par la voie du choc respiratoire chez l'écrevisse.

 : Molécules bactéricides

Chez la crevette, la mélanisation joue un rôle très important dans la résistance aux infections bactériennes (Amparyup *et al*, 2009). Le système prophénoloxidase (pro-PO) s'appuie sur l'action d'une oxydoréductase, la phénol oxydase (PO). Cette enzyme catalyse l'oxydation des phénols en quinones qui conduisent à la formation de mélanine et de composés intermédiaires bactéricides, puis à l'encapsulation et à la phagocytose.

#### **4. La phagocytose et l'encapsulation**

L'élimination directe d'agents pathogènes exogènes passe par la phagocytose. Ce processus comprend la reconnaissance de l'agent étranger, son attachement à la surface cellulaire, la formation de pseudopodes, l'internalisation et la fusion phagosome-lysosome (organites cytoplasmiques contenant des enzymes lysosomiales : phosphatases acides, estérases,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -N-acétylglucosaminidase) qui aboutira à la dégradation de la particule phagocytée. Cette dégradation peut aussi passer par une autre voie, le choc respiratoire, faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species). Ce choc consiste en la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde  $O_2^-$  par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase). Les ROS hautement réactifs sont microbicides et participent à la destruction des corps étrangers. L'anion superoxyde est alors converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase (SOD) de façon, à limiter son accumulation dans l'organisme (Munoz *et al*, 2000). Chez l'écrevisse les cellules hémocytaires sont attachées aux microorganismes par l'intermédiaire du récepteur intégrine et de la péroxynectine. Le peroxyde peut être réutilisé par la péroxinectine pour produire des composés comme l'acide hypochloreux qui est toxique pour les microorganismes envahisseurs (Söderhäll et Söderhäll, 2001) (Figure 10). Dans le cas où les particules étrangères sont de trop grande taille ou en trop grand nombre pour pouvoir être éliminées par phagocytose, un agrégat d'hémocytes peut se former autour de la particule (nodule). Les bactéries retenues sont alors lysées, mais le devenir du nodule reste à élucider. Ce phénomène peut être aussi associé à la libération d'enzymes lysosomiales à la surface de la particule étrangère, on parle d'encapsulation.



D'après Sun *et al.*, 2001

**Figure 11 :** Représentation schématique des principales classes structurales des peptides antimicrobiens cationiques. Ces modèles sont basés sur des études en résonance magnétique des peptides en milieu aqueux ou mimant les conditions membranaires.

- 1: Structure en hélice amphiphile de la magainine.
- 2: Structure allongée de l'indolicidine bovine.
- 3. Structures de différente défensines en feuillets et/ou hélices. A.  $\alpha$ -défensine humaine ; B.  $\beta$ -défensine humaine ; C. 3 défensine de plante ; D. défensine d'insecte.

## **5. l'ARN interférence**

Il existe chez les crevettes pénéides un mécanisme immunitaire reposant sur la voie de l'ARN interférence (Robalino *et al*, 2005). Le processus d'ARN interférence repose sur la suppression post-transcriptionnelle d'un gène par des ARN doubles brins détruisant les ARN messagers de séquences homologues de manière spécifique. Ce phénomène de défense naturelle essentiellement dirigé contre les virus a été observé chez les Plantes, les Nématodes, les Insectes et les Mammifères. Parmi les travaux qui tendent à démontrer l'intérêt de l'ARN interférence comme moyen de lutte contre des maladies virales (affectant les élevages de crevettes) nous citerons ceux de Tirasophon *et al*, 2005, Robalino *et al*, 2007 et Sarathi *et al*, 2008.

## **6. Les peptides antimicrobiens (PAMs)**

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée constituant l'une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Après la découverte des cécropines, en 1980, par Boman, dans l'hémolymphe de la puppe d'un insecte l'hyménoptère, *Cecropia hyalophora* (Steiner *et al*, 1981) et en 1983 des deux premières défensines par Lehrer et Selsted, dans des macrophages du poumon du lapin, la recherche de peptides antibactériens s'est généralisée. Rapidement on a identifié des peptides antibactériens dans tout le monde vivant : animaux, végétaux, bactéries et même virus. En 2004, plus de 880 de ces peptides antimicrobiens ont été isolés (Zasloff *et al*, 2002; Ganz *et al*, 2003; Marshall *et al*, 2003, Lehrer *et al*, 2004), et l'on en découvre encore.

Les PAMs naturels sont des molécules principalement poly-cationiques et amphiphiles (Epanand et Vogel, 1999; Hancock, 2001) qui présentent une très grande diversité de séquences et de structures (Figure 11). Leur petite taille, en général inférieure à 10 kDa est comprise entre 12 et 50 acides aminés, ce qui facilite leur synthèse et leur diffusion jusqu'au point d'infection (Relf *et al*. 1999). Ils ont été classés en fonction de leur charge, leur structure mais aussi de leur richesse en certains acides aminés (pour revue, Bulet *et al*. 2004).

**Les PAMs cationiques** présentent une grande diversité structurale. On peut toutefois les classer en trois grandes familles:

### *Cycliques en feuillets $\beta$ ou « $\beta$ -hairpin-like»*

Ces peptides antimicrobiens contiennent des résidus cystéines qui sont impliqués dans la formation de ponts disulfures, généralement de 1 à 4 et parfois 6. Ces peptides forment, en solution, des structures en feuillets  $\beta$ , en «  $\beta$ -hairpin-like » ou en hélice  $\alpha$  /  $\beta$ -sheet (Bulet *et al.*, 1999). Ils se replient, grâce à la présence de ponts disulfures ou au contact des membranes, en structures amphiphiles tridimensionnelles dans lesquelles, les domaines positivement chargés et hydrophiles sont distinctement séparés des domaines hydrophobes (Powers et Hancock, 2003). La structure de ces molécules permet leur interaction avec les groupements fonctionnels hydrophiles négativement chargés des extrémités antérieures, ainsi que les cores hydrophobes des membranes bactériennes (Hancock, 2001). Cependant, cette interaction n'est pas uniquement le fait du peptide, mais elle est également fonction de la composition lipidique des membranes biologiques (Epanand et Vogel, 1999). Ils possèdent par ailleurs des propriétés antimicrobiennes stœchiométriques par opposition aux activités enzymatiques (Relf *et al.*, 1999).

Les seuls PAMs avec un pont disulfure, comme les thanatines, ont été isolés chez les arthropodes dans le corps gras de l'insecte hémiptère *Podisus maculiventris*, (Fehlbaum, 1996). Les premiers PAMs présentant deux ponts disulfures sont les tachyplésines et les polyphémusines, isolés chez les arthropodes (pour revue, Kawabata *et al.*, 2003). L'ensemble de ces peptides présentent un spectre d'activité large contre les bactéries Gram (-) et Gram (+), les levures et les champignons (pour revue, Bulet *et al.*, 2004).

Les PAMs possédant trois ou quatre ponts disulfures font partie de la famille des défensines. Cette famille reste la plus représentée, avec plus de 70 défensines isolées chez les arthropodes (Dimarcq *et al.*, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Iwanaga, 2002). La structure tridimensionnelle des défensines comprend un domaine en hélice  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$  antiparallèles stabilisés par deux ponts disulfures (structure  $\alpha\beta$ -stabilisée). Chez les invertébrés les défensines, sont actives principalement sur les bactéries à Gram (+) (pour revue Bulet *et al.*, 2004).

### ***Linéaires à hélice $\alpha$***

Le premier membre de cette famille, la cécropine, est aussi le premier peptide découvert et isolé chez *Hyalophora cecropia*. (Steiner *et al*, 1981). Aujourd'hui, ils sont plusieurs centaines à avoir été identifiés chez un grand nombre d'organismes, arthropodes, procordés, amphibiens, poissons et mammifères. Ces peptides sont en général de petite taille (< 40aa.), très amphiphiles, fortement chargés positivement et possédant deux caractéristiques majeures (1) la présence d'un résidu tryptophane en position 1 ou 2 (2) un résidu amidé en C-terminal. Ces PAMs présentent un spectre d'activité très large et sont actifs sur les bactéries Gram(-) et Gram(+), les champignons et les protozoaires. Certains de ces peptides sont également capables d'activités hémolytiques, d'autres sont insecticides (pour revue Bulet *et al.*, 2004). A notre connaissance aucune molécule de cette famille de peptides n'a été identifié, chez les crustacés.

### ***Linéaires riches en résidus proline ou glycine***

Les peptides riches en proline font de 15 à 39 résidus. Cette famille est divisée en deux sous-groupes, les peptides non substitués et les peptides *o*-glycosylés. Les PAMs sans substitution sont représentés par la famille des apidaecines, isolée chez l'abeille *Apis mellifera* (Casteels *et al*, 1989). Les peptides *o*-glycosylés sont représentés par la drosocine, isolée pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*. Ces peptides sont essentiellement actifs contre les bactéries à Gram (-). Des peptides riches en proline ont également été trouvés chez les crustacés. Chez le crabe *Carcinus maenas* (Schnapp *et al*, 1996) et chez les crevettes pénéides (Destoumieux *et al*, 1997).

Les peptides riches en glycine ont d'abord été isolés chez les insectes. Les premiers membres de cette famille très hétérogène qui ont été isolés sont les sarcotoxines (Ando et Natori, 1988) et les diptéricines (Dimarcq *et al*, 1988). Ces PAMs possèdent à leur extrémité N-terminale un court domaine riche en résidus proline et à leur extrémité C-terminale un long domaine riche en résidus glycine. Ces PAMs sont essentiellement actifs contre les bactéries Gram (-) et les champignons. Plus récemment, des peptides de cette famille ont également été isolés chez la crevette *Penaeus monodon* (Somboonwiwat *et al*, 2005).

**Les PAMs anioniques** issus du clivage de l'hémocyanine (pigment respiratoire des crustacés) ont été isolés chez les crevettes *Penaeus vannamei* et *Penaeus stylostris* ainsi que chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus* (Destoumieux *et al*, 2001; Lee *et al*, 2003).

### ***Les PAMS chez les crevettes pénéides***

Les premiers PAMs décrits chez les crevettes pénéides sont des peptides cationiques, les pénéidines (Destoumieux *et al*, 1997). Ces peptides sont composés de 50 à 60 acides aminés et divisés en deux domaines, un domaine amino-terminal riche en résidus proline et un domaine carboxyl-terminal cyclique riche en résidus cystéine (Destoumieux *et al*, 2000; Gueguen *et al*, 2006). Les six cystéines sont impliquées dans la formation de trois ponts disulfures, ce qui théoriquement devrait les ranger dans la famille des défensines, cependant leur extrémité N-terminale riche en proline, les classent dans la famille des PAMs riches en résidus proline. Quoiqu'il en soit les pénéidines jouent un rôle primordial dans la défense immunitaire des crevettes, elles inhibent la sporulation du champignon filamenteux (*Fusarium oxysporum*) et ont des activités antibactériennes dirigées contre les bactéries Gram (+) (Destoumieux *et al*, 1997). Elles ont également une activité limitée vis-à-vis des bactéries Gram (-), notamment celles appartenant au genre *Vibrio*. Cette dernière serait liée à des mécanismes d'agglutination et d'opsonisation qui favoriseraient la phagocytose. Ce modèle d'action hypothétique des pénéidines sur les bactéries Gram (-) a été proposé par Bachère (Bachère *et al*, 2004).

D'autres PAMs cationiques ont également été décrits chez les crevettes, il s'agit : de facteurs anti-LPS (ALF) (Mekata *et al*, 2010; Somboonwiwat *et al*, 2005), de crustines (Bartlett *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2007; Amparyup *et al*, 2008), d'histones (Patat *et al*, 2004) et plus récemment d'un lysozyme (Mai *et al*, 2009). Toutes ces molécules présentent des activités antimicrobiennes essentiellement dirigées contre des bactéries Gram (+).

Enfin un PAM anionique dérivé de l'hémocyanine (partie C-terminale) présentant une activité antifongique a été décrit chez deux crevettes pénéides par Destoumieux (Destoumieux *et al*, 2001).

### **7. Régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens**

L'analyse génétique des mécanismes régulant la réponse antimicrobienne chez les insectes, a permis d'identifier deux voies de signalisation de type NF-Kb, les voies Toll et Imd (Figure 12): La voie Toll est activée par les bactéries Gram (+) et les champignons. Elle active et régule la transcription de la drosomycine qui est un peptide antifongique. La voie Imd répond plutôt à une infection par les bactéries Gram – et induit, l'expression des gènes codant les PAMs comme la cécropine, la diptéricine et l'attacine (Zasloff, 2002).

Chez les chélicérates, les hémocytes granulaires stockent les molécules de défense (Iwanaga et Kawabata, 1998; Iwanaga, 2002; Kawabata et Tsuda, 2002). Lors d'une infection microbienne, les LPS ou les  $\beta$ -1,3 - glucanes des membranes des pathogènes sont reconnus par les hémocytes induisant la libération par exocytose des protéines de défense (Iwanaga et Kawabata, 1998) et des facteurs de coagulation. Ces derniers pourraient être à l'origine de l'activation de la cascade de signalisation intracellulaire.

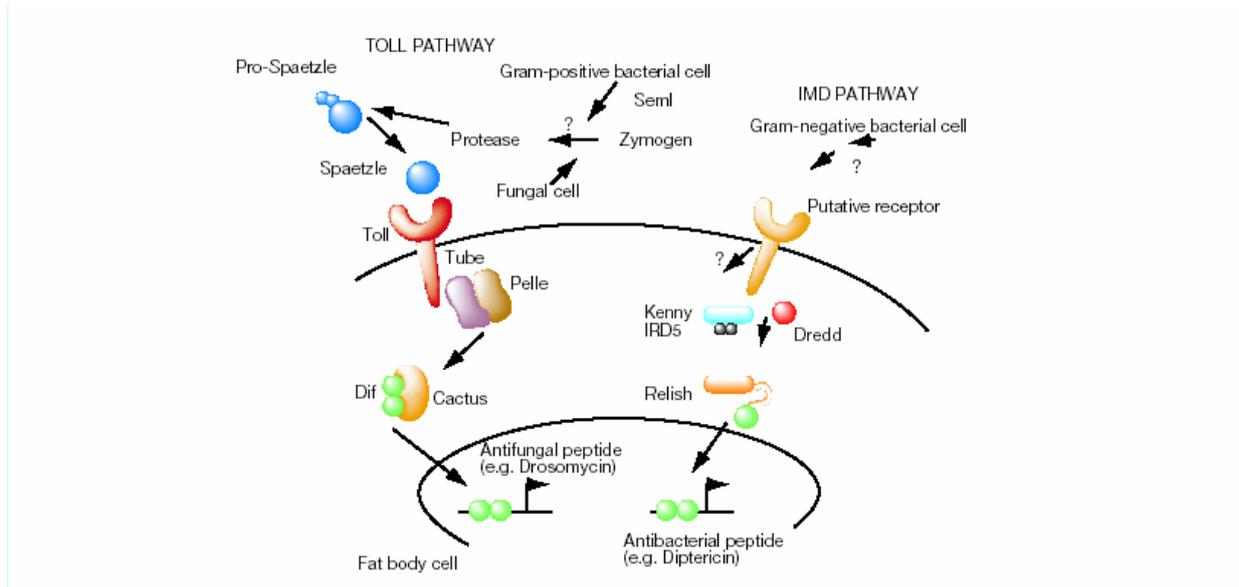
Chez les crustacés, le mécanisme régulant la réponse antimicrobienne ressemble à celui proposé pour les chélicérates. En effet, les études sur les crevettes pénéides (Munoz *et al*, 2002; Munoz *et al*, 2004) et sur l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus*, montrent que la plupart des protéines impliquées dans le système immunitaire sont produites constitutivement et stockées dans les hémocytes. De plus l'étude de l'expression et la localisation des pénéïdines au cours d'une infection bactérienne (Munoz *et al*, 2002) a permis de mettre en évidence chez la crevette *L. vannamei*, une action en deux phases:

*Phase I* : Recrutement des hémocytes : Les hémocytes granuleux quittent le système circulatoire et la plupart des tissus pour migrer vers le site d'infection. Ils libèrent alors leur contenu par un phénomène de lyse cellulaire (Munoz *et al*, 2002 ; Munoz *et al*, 2004).

*Phase II* : Prolifération des hémocytes : Elle est caractérisée par une activation de l'hématopoïèse et donc une forte production d'hémocytes. Cette réponse systémique contribue à la restauration de l'homéostasie chez les animaux soumis à des infections (Bachère *et al*, 2004).

## **8. Les facteurs d'adhésion cellulaire et de communication**

En synergie de ces molécules antimicrobiennes, d'autres effecteurs de l'immunité des crevettes ont été décrits et caractérisés. Ces effecteurs sont capables de reconnaître les micro-organismes et en se liant à leur membranes, déclenchent des réactions de défense (Medzhitov *et al*, 2002 ; Janeway *et al*, 2002).



**Figure 12 :** Voies de signalisation Toll et IMD dans la réponse immunitaire innée chez les insectes. (D'après Zasloff, 2002).

**La voie Toll** est activée par les bactéries Gram (+) et les champignons. Ces microorganismes sont reconnus par des PRP qui entraînent le clivage de Spaetzle. Spaetzle active à son tour le récepteur Toll, qui entraîne la dégradation de Cactus suivi de la translocation nucléaire de la protéine **DIF**. Ce facteur de transcription active l'expression de nombreux gènes dont celui de la drosomycine.

**La voie IMD** est activée par les bactéries Gram (-). Cette voie de signalisation fait intervenir des caspases et aboutit à la translocation nucléaire du facteur de transcription **Relish**, qui va activer l'expression de nombreux gènes dont celui de la diptéricine.

Les premières molécules capables de déclencher des réactions de défense ont été mises en évidence chez l'écrevisse (Unestam et Söderhäll, 1977 ; Söderhäll et Hall, 1984 ; Johansson *et al*, 1995). Ce sont des molécules capables de se lier aux polysaccharides microbiens, LPS et  $\beta$ -glucanes. Par exemple, la  $\beta$ GBP " $\beta$ -glucan binding protein", en présence de  $\beta$ -glucane, adhère à la surface des hémocytes granuleux et semi-granuleux par l'intermédiaire d'un récepteur aux facteurs d'adhésions, probablement des intégrines (pour revue voir Sonnenberg, 1993). Cette adhésion aux hémocytes entraîne leur dégranulation par un mécanisme d'exocytose contrôlé (Barracco *et al*, 1991). Plusieurs de ces molécules de reconnaissance ont été décrites chez les crevettes pénéides.

Les protéines capables de se lier au LPS de la paroi des bactéries Gram(-). Il s'agit des LBP "Lipopolysaccharide Binding Protein" (ou ALF) de *Penaeus monodon* (Somboonwiwat *et al*, 2005) et *Marsupenaeus japonicus* (Mekata *et al*, 2010), d'une lectine de type C (Luo *et al*, 2006) et d'une forme recombinante de la masquerade, une sérine protéase multifonctionnelle identifiées chez *P. monodon* (Jitvarapas *et al*, 2009).

Des protéines capables de se lier au  $\beta$ -1,3-glucane de la membrane des champignons. Il s'agit des GBP " $\beta$ -1,3-Glucan Binding Protein" de *P. monodon* (Sritunyalucksana *et al*, 2002) et *P. vannamei* (Romo-Figueroa *et al*, 2004).

Enfin des protéines capables de se lier à la fois au LPS de la paroi des bactéries Gram (-) et au  $\beta$ -1,3-glucane de la membrane des champignons. Il s'agit de la LGBP "Lipopolysaccharide,  $\beta$ -1,3-Glucan Binding Protein" de *P. stylirostris* (Roux *et al*, 2002).

Parmi les effecteurs antimicrobiens riches en cystéines identifiés chez les crevettes, les pénéidines comme les crustines révèlent des activités antibactériennes principalement dirigées contre les bactéries Gram (+), alors que les principales maladies connues des crevettes pénéides sont d'origines virale et bactérienne et plus précisément à relier aux bactéries Gram (-) de l'espèce *Vibrio*. Les travaux, que nous vous présentons dans les chapitres suivants, ont pour objectifs de traiter les aspects moléculaires et biochimiques de peptides riches en cystéine dont l'un des transcrit est exprimé dans les hémocytes de *L. stylirostris* en réponse à une infection par la bactérie Gram (-) *V. penaeicida*.

## **CHAPITRE II**

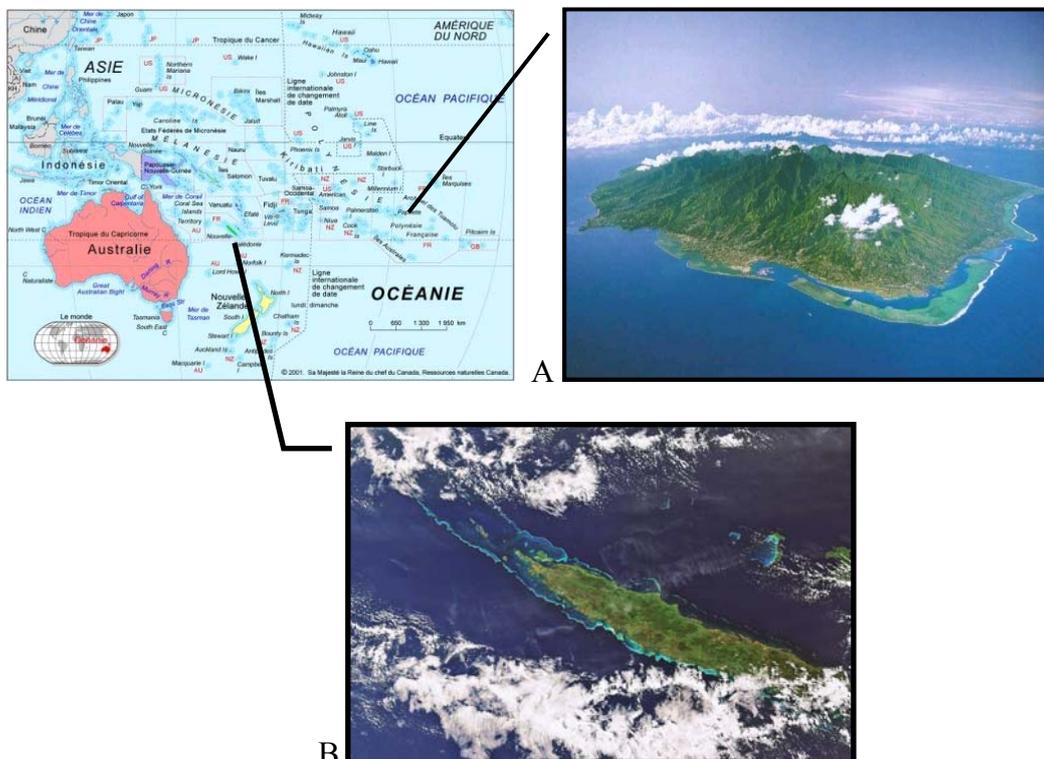
### **CARACTERISATION DES ACIDES NUCLEIQUES CODANT LES STYLICINES**

Ce chapitre est consacré à la caractérisation des acides nucléiques codant les stylicines 1 et 2, identifiées chez la crevette bleue du pacifique *L. stylirostris*. Dans un premier temps, nous présenterons la caractérisation moléculaire de leurs structures. Dans un second temps, dans des populations de crevettes sauvages et d'élevages, nous étudierons le polymorphisme de leurs gènes. Dans une troisième partie, nous analyserons l'expression de leurs transcrits, à la suite d'une infection par *V. penaeicidae*. Enfin, nous aborderons la recherche et l'identification d'autres membres de cette famille de gènes chez les crevettes pénéides.

**Tableau 1.** Caractéristiques des populations de crevettes péneïdes échantillonnées (n=24) pour cette étude.

Espèces	Types	Lieu du prélèvement	Année
<i>L. stylirostris</i>	Elevage1	Tahiti	2007
<i>L. stylirostris</i>	Elevage2*	Tahiti	2007
<i>L. stylirostris</i>	Elevage	Nouvelle Calédonie	2008
<i>L. stylirostris</i>	Sauvage	Large du Mexique	2008
<i>P. merguensis</i>	Sauvage	Thaïlande	2003
<i>P. monodon</i>	Sauvage	Thaïlande	2003
<i>P. japonicus</i>	Elevage	St Just Luzac, France	2008

\*Population issue de la population 1 sélectionnée sur le facteur croissance



**Figure 1.** Lieux d'échantillonnages des populations d'élevages de *L. stylirostris*: Photographies des îles du Pacifique. A. Tahiti. B. Nouvelle Calédonie.

## **A. Matériels et méthodes**

### **1. Echantillonnage**

Quatre populations de crevettes *L. stylirostris* (n=24) ont été échantillonnées dans le Pacifique (Tableau 1) : deux populations d'élevages prélevées en novembre 2007 dans des bassins expérimentaux de la station IFREMER à Tahiti (Figure 1A), en septembre 2008 une population d'élevage en Nouvelle Calédonie (Figure 1B) et une population sauvage prélevée au large du Mexique.

Trois autres populations appartenant à d'autres espèces de crevettes pénéides ont été prélevées (Tableau 1): *P. merguensis*, *P. monodon* (prélevées en 2003 en Thaïlande dans la région de Surat Thani) et *P. japonicus* (prélevée en 2008 dans une ferme d'élevage Française Boyard SA. 17320 St Just Luzac, France).

### **2. Extraction, purification et dosage des ADN génomiques**

Des échantillons d'appendices locomoteurs (pléopodes) ont été prélevés sur chaque individu et introduits individuellement dans 1 mL d'éthanol absolu froid. Une heure après avoir renouvelé cette solution, les échantillons ont été congelés à -20°C, conservés dans de la carboglace pour le transport et placés à -20°C avant extraction des ADN. Les ADN génomiques des pléopodes ont été extraits après une incubation de 18h à 60°C avec 500 µL de tampon (10 mM Tris-Base, pH 8, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA dihydrate, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL protéinase K).

L'ADN a ensuite été purifié avec 250 µL du mélange phénol/chloroforme/alcool iso amylique (25:24:1). Après 30 secondes d'agitation, le mélange est centrifugé à 10.000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure qui contient l'ADN est prélevée, puis est précipité par addition d'1 mL d'éthanol absolu froid pendant 1 heure à -20°C. L'ADN est ensuite centrifugé à 10.000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ADN est séché pendant 15 min puis remis en solution dans 250 µL de tampon TE 20.5 (Tris 20 mM, EDTA 5 mM).

Le taux de dégradation des ADN génomiques a été analysé sur gel d'agarose 0.8%. Deux microlitres de chaque extrait d'ADN ont été complétés par 8 µL de Te 20.5 et 8 µL de tampon de charge 6X. L'ensemble déposé dans un gel d'agarose 0.8%. Après une migration de 30 min à 100 V, les ADN sont visualisés sous UV après balnéation du gel dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET) à 0.5 µg/mL. Les quantités et qualités des ADN ont été

déterminées par spectrophotométrie à l'aide du Nano Drop ND-1000 et du logiciel ND-1000 V3 3.0. La concentration d'ADN en solution est calculée en appliquant la formule suivante :  $A_{260} \times 50 = x \mu\text{g}$  d'ADN par  $\mu\text{L}$ . Un ADN est considéré comme pur si le rapport  $A_{260}/A_{280}$  est compris entre 1.8 et 2.

### 3. Extraction des ARN

Après prélèvements individuels de l'hémolymphe, les hémocytes sont sédimentés par centrifugation (10 min, 12000g, 4°C), et additionnés par 1 mL de Trizol<sup>®</sup> à -20°C. Les échantillons sont congelés à -20°C, conservés dans de la carboglace pour le transport et placés à -20°C avant extraction de l'ARN.

Les ARN ont été extraits en utilisant le protocole standard décrit dans les *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley *et al*, 2003). Après addition de 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme, les tubes refroidis dans de la glace ont été vortexés pendant 15 secondes puis centrifugés à 4 °C pendant 15 min à 12000 rpm (Eppendorf 5415 R). La phase aqueuse supérieure, contenant les ARN, a été prélevée et transférée dans de nouveaux tubes. Les ARN ont été précipités avec 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol. Après avoir été homogénéisé manuellement, le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé 10 min à 4 °C à 12000 rpm , enfin le culot a été séché. Le lavage a été effectué en ajoutant 1 mL d'éthanol à 75 % dans les tubes puis ces derniers ont été centrifugés à 7500 rpm à 4 °C pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et le culot dissous dans 90  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure. Afin de limiter la contamination des ARN par le phénol, une seconde précipitation a été effectuée. Pour cela, 10  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M ont été déposés dans les tubes et homogénéisés (vortex). Les ARNm ont été précipités à nouveau avec 100  $\mu\text{L}$  d'isopropanol et après agitation, le mélange a été incubé 12 min à température ambiante puis centrifugé à 13000 rpm à 4 °C pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et 800  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 75 % ont été ajoutés dans les tubes avant qu'ils ne soient centrifugés à 13000 rpm à 4 °C pendant 7 minutes. Finalement le surnageant a été éliminé et les culots ont été repris dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure sans RNase. La pureté des ARN a ensuite été contrôlée sur NanoDrop (ND-1000).

#### 4. Synthèse des ADNc

Tous les ADNc ont été synthétisés en suivant le protocole du Kit commercialisé par la société Invitrogen(<http://www.invitrogen.com>). Dans un mélange réactionnel contenant 200 ng d'ARN, 1  $\mu$ L de mix dNTP (10 mM/nucléotide), 1  $\mu$ L d'oligo dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L), qsp 12  $\mu$ L avec de l'eau distillée ultra pure. Ce premier mélange a été incubé à 65°C pendant 5 minutes avant d'être complété d'un second mélange de 7  $\mu$ L contenant 4  $\mu$ L de Buffer (5 x), 2  $\mu$ L de DDT (0,1 M) et 1  $\mu$ L de Rnase out (40 U/ $\mu$ L) et incubé 2 minutes à 37 °C. Enfin, 1  $\mu$ L de reverse transcriptase M-MLV (200 U/ $\mu$ L) a été rajouté. Ce nouveau mélange a été incubé 50 minutes à 37 °C puis l'enzyme a été inactivée par une incubation de 15 minutes à 70°C.

#### 5. Amplification PCR

Le gène et l'ADN complémentaire codant la stylicine1 ont été amplifiés par PCR à partir soit d'ADN génomique, soit du produit de transcription reverse d'ARN messenger obtenu à partir d'extraits d'hémocytes individuels de *L. stylirostris*. L'amplification a été effectuée à l'aide de deux amorces spécifiques dessinées aux extrémités 5' et 3' de la séquence du gène codant la séquence de la cryptidine like (Litsty 004-A-01 L) identifiée par de Lorgeril (de Lorgeril et al, 2005). L'amplification a été réalisée selon un protocole adapté des Currents Protocols in Molecular Biology (1994-2002). L'amplification a été réalisée dans un volume de 10  $\mu$ L d'un mélange réactionnel contenant, 1  $\mu$ L de DNA génomique ou 1  $\mu$ L de cDNA, 0.5 mM de dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% de BSA, 0.5 U de *Taq* DNA polymérase (Qbiogene) et 10 pmol des amorces R1F et R1R (Tableau 2). La réaction débute par 10 min de dénaturation à 94°C puis 35 cycles de (1min à 94°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C) et une élongation finale de 10 min à 72°C. Une fraction de 3  $\mu$ L du produit d'amplification a été déposée sur gel d'agarose 1.5%, visualisée sous UV après balnéation du gel dans du Bromure d'Ethidium (BET) à 0.5  $\mu$ g/mL et les produits d'amplification ont été séquencés.

Pour la recherche de gènes codant la stylicine1 chez d'autres espèces de crevettes péniéides, nous avons fait varier la température d'hybridation des amorces entre 37 et 55°C.

**Tableau 2.** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène codant la stylicine1 et pour son séquençage.

Amorces	Séquences (5'-3')	Gènes	Taille du fragment amplifié
RIF RIR	ATGAAGACCTACAGTC GACTGTAGGTCTTCAT	Stylicine1	<b>525pb</b>
IIF IIR	ATC-ACA-CGT-CGG-ACA-CTT-GTA AAG-TTA-AGC-TGC-AGC-AGA-GAC	Séquençage	

## 6. Séquençage

Le séquençage des produits d'amplification PCR a été effectué sur plaques 96 puits avec 10 µL d'un mélange contenant 40 ng de produit PCR, 1 µL d'amorce (Tableau 2) et 1 µL de mix de séquençage BigDye (Applied Biosystem) suivant les cycles: 1 à 96°C 10 min, 60 cycles à 96°C 10 sec, 52°C 5 sec et de 4 min à 60°C. Chaque produit de séquençage a été précipité par l'addition de 5 µL d'EDTA 125mM et de 60 µL d'éthanol absolu froid. Après centrifugation (30 min 3700 rpm à 4°C), le culot a été lavé par 60 µL d'éthanol 75%, centrifugé 15min 3000rpm à 4°C, le surnageant éliminé et le culot repris dans 20 µL d'eau. La plaque est introduite dans le séquenceur à capillaire 3130Xl Genetic.

## 7. Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du programme Chromas 1.45, et les alignements réalisés à l'aide des programmes Clustal W (Higgins *et al*, 1992) et Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Les séquences d'ADN et d'ADNc ont été comparées aux séquences présentes dans différentes bases de données accessibles comme Genbank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou la banque d'EST de Campagen (<http://www.compagen.org>) en utilisant les programmes BLASTn et BLASTx. Les séquences peptidiques correspondantes ont été analysées à l'aide des outils ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools>).

## 8. Analyse de la diversité génétique

Les paramètres de la diversité génétique intrapopulationnelle (nombre d'allèles, hétérozygotie observée :  $H_o$ , estimation non biaisée de l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg :  $H_{nb}$ ) ainsi que le déséquilibre potentiel (Fis) aux proportions de Hardy-Weinberg (fixation des allèles à l'intérieur des populations) sont calculés à l'aide du logiciel GENETIX version 4,02.

## 9. Expression des ARNm

### a) Infections expérimentales

Dans le but de déterminer si l'expression des transcrits codant les stylicines 1 et 2 était modulée à la suite d'une infection microbienne, nous avons infecté par *V. penaeicida* des animaux issus de la troisième génération de deux lignées de crevettes juvéniles *L. stylirostris* (20-30 g) produites au laboratoire IFREMER de Nouvelle Calédonie en 2006 (IFREMER, BP2059, 98846 Nouméa cédex, France).

**Tableau 3.** Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des ARNm codant les stylicines 1, 2 et du facteur d'élongation (contrôle) dans les hémocytes de *L. stylirostris* après une infection par *V. penaeicidae*.

Amorces	Séquences (5'-3')	Gènes	Taille du fragment amplifié
QPCR1	ACAAGTGTCCGACGTGTGATA	Stylicine1	134 pb
QPCR	CTCGGCGATGGGACTCTCG		
QPCR2	TGATGATGAGTGTCCGAAGTGC	Stylicine2	142 pb
EF sens EF antisens	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG	Facteur d'élongation	200 pb

Brièvement, la première lignée qualifiée (S), a été obtenue par sélection sur trois générations des animaux ayant survécu expérimentalement au “Syndrome 93” pendant les six premiers mois de leur vie (densité initiale : 20-25 crevettes/m<sup>2</sup>). A chaque génération ces animaux ont été conditionnés en plus faible densité (1 à 2 crevettes/m<sup>2</sup>). La seconde lignée non sélectionnée (NS) a été obtenue en reproduisant des animaux dans des conditions “traditionnelles” dans lesquelles le “Syndrome 93” a été très faible (densité initiale: 2 crevettes/m<sup>2</sup>).

Les infections ont été pratiquées en immergeant les crevettes (15 individus/groupe) pendant deux heures dans de l’eau de bassin contenant 10<sup>3</sup> *V. penaeicida* AM101 par mL. Cette densité bactérienne correspondant à une concentration en bactéries permettant de tuer 20% des crevettes (DL20) (Saulnier *et al*, 2000). Chaque animal infecté a ensuite été rincé avec de l’eau de mer filtrée, puis transféré dans un premier bassin de 100 litres pour les individus issus de la lignée S, et un second bassin de 100 litres pour les individus issus de la lignée NS. Les animaux non infectés (témoins) ont été transférés dans un troisième bassin. L’hémolymphe de chaque individu (15 par lignée) a été prélevé avant l’expérimentation (contrôle avant infection). L’hémolymphe des lignées S et NS ont été prélevées aux temps : 12, 24 et 48 heures après l’infection, les ARNm ont été extraits et les ADNc correspondants synthétisés.

#### ***b) PCR quantitative.***

Chaque réaction de Q-PCR a été réalisée sur un volume de 5 µL composé de 2,5 µL de SYBR green (2 X) master mix (Roche), 3,33 µM des amorces spécifiques des ARNm codant les stylicines et 1 µL d’ADNc. L’amplification a été effectuée sur LightCycler480 plaques 384 puits (Roche). Celle-ci débute par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles d’amplification. Chaque cycle d’amplification comprenant une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, une phase d’hybridation à 52°C pendant 20 secondes et enfin une phase d’élongation à 72°C pendant 25 secondes. Au terme des 45 cycles d’amplification, une courbe de fusion tracée, nous a permis de vérifier la spécificité de la réaction pour chaque gène. Enfin, l’expression relative des gènes a été obtenue à partir du 2<sup>-2ΔCt</sup> selon la méthode de Ptaffl (Ptaffl *et al*, 2001) et normalisée par rapport au gène de référence le Facteur d’Elongation (EF) en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 3).

tctaatacgactcactatagggctcgagcggccgcccgggcaggtccagacgctgttctgctcctgtgtggtggcc  
aactctggacgcatccctgccatc

**ATG**AAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGTCTTACTGGTTGCGATCTTGCACACGTCACAAGGA

M K T Y S R V S V F V L L V A I L H T S Q G

TCTTCCTTTGCACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGCTGGGGACCTCCATGCGTACAACAACCGTGCCCT

S S F S P P R G P P G W G P P C V Q Q P C P

▲ ▲

AAGTGCCCATATGATGATTACAAGTGTCCGACGTGTGATAAATCCCGGAGTGTGAGGAGTGCCCC

K C P Y D D Y K C P T C D K F P E C E E C P

▲ ▲ ▲ ▲ ▲

CATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTACTTTAGCTGCGAATGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCG

H I S I G C E C G Y F S C E C P K P V C E P

▲ ▲ ▲ ▲ ▲

TGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGATAA

C E S P I A E L I K K G G Y K G \*

▲ ■ ■

aggataagaagcgagaacgaagccacagcattcacaaacctcactgaaactgaaagaagagagaggggagagagggggg  
gagggagaggggagagagagagagagaatagaacgtgagatgggagaaaggagagatggt

**Figure 2.** Séquence de l'ADN complémentaire codant la stylicine1 (**EU177435**) et de sa séquence peptidique correspondante identifiée chez *L. stylirostris*.

**En gras** : Les codons d'initiation et stop.

Souligné : La séquence du peptide signal composée de 22 acides aminés.

**En grisée** : La région riche en résidus proline.

**En jaune** : Motifs MT

▲ : Résidu cystéine.

■ : Site de prohormone convertase Lys–Lys.

## B. Résultats

### 1. Caractérisation du gène codant la stylicine1

#### *a) Séquence de l'ADN complémentaire*

La séquence de L'ADNc codant la stylicine1 (numéro d'enregistrement GenBank **EU177435**) correspond à la séquence Litsty 004-A-01 L. Cette séquence codante est composée de 312 paires de bases (Figure 2), à partir du codon d'initiation de la transcription ATG jusqu'au codon d'arrêt de la traduction. La protéine correspondante est longue de 104 résidus (Figure 3). Dans cette séquence aminée, un peptide signal composé de 22 acides aminés (Met<sup>1</sup>-Gly<sup>22</sup>) a été identifié selon les règles définies par Van Heijne's (Nielsen *et al*, 1997). Le peptide mature est un peptide anionique (pI=5.00) composée de 82 acides aminés. Il débute par une Ser<sup>23</sup> et se termine par une Gly<sup>104</sup>. Ce peptide possède un site de clivage par l'enzyme prohormone convertase dans sa région C-terminale Lys<sup>98</sup>-Lys<sup>99</sup>. Il est riche en résidus proline, 16 résidus qui représentent à eux seuls 19.5% du total de la séquence aminée, localisés dans la région N-terminale de la séquence. Il est également riche en résidus cystéine, 13 résidus qui représentent 15.9 % de la séquence, et qui sont localisés dans la partie centrale et C-terminale de la molécule (Figure 3).

L'analyse de la structure primaire de ce peptide a mis en évidence 4 motifs Cys-X-X-Cys et deux motifs Cys-X-Cys de fixation d'ions métalliques, caractéristiques des métallothionéines (MTs) d'eucaryotes (Furey *et al*, 1987). Le motif connu des MTs de mollusques Cys-X-Cys-X-X-X-Cys-Thr-Gly-X-X-X-Cys-X-Cys-X(n)-Cys-X-Cys-Lys identifié par Tanguy (Tanguy *et al*, 2001), n'a pas été décelé dans notre séquence, ainsi que d'autres motifs : Gln-Pro-Asp de fixation des ligands, Cys-Thr-Leu-Asp de liaison des lectines, connus et impliqués dans la réponse immunitaire des crustacés.

#### *b) Séquence issue d'ADN génomique*

Le gène correspondant à la stylicine1 a été amplifié à partir d'ADN génomique de *L. stylirostris* originaire de nouvelle Calédonie. Ce gène (numéro d'enregistrement GenBank **EU177437**) se caractérise par une taille de 525 paires de bases. Il présente deux exons et un intron (Figure 3). Le premier exon est constitué par 76 paires de bases, le second par 236 paires de bases. L'intron présente une taille de 213 paires de bases.

1 50  
**ATG**AAGACCTACAGTCGGGTCTCTGTCTTTGTCTTACTGGTTGCGATCTT  
**M K T Y S R V S V F V L L V A I V**

51 100  
 GCACACGTCACAAGGATCTTCCTTTT**GTAAGTTAAGCTGCAGCAGAGACC**  
**H T S Q G S S F S**

101 150  
**GCTCTTTTTTATTTGTTATTTTGA**ACTTCAGTGTTGTAATAAATCGAAGC

151 200  
**AAGTCTGGTTACTCCTACTGGAGGAAAAGTAGATTGTCGTTATAGTACTA**

201 250  
**TGCTGATGGCAATAATGATGCTCTAAATGATAATGACGTGGTTATTTCTT**

251 300  
**TTTCTATTTTTTCATTTTTGGCTTGCTTGTCTTGTTCAG**CACCTCCCAGA  
**P P R G**

301 350  
 GGACCTCCGGGCTGGGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTG  
**P P G W G P P C V Q Q P C P K C**

351 400  
 CCCATATGATGATTACAAGTGTCCGACGTGTGATAAATTCCCGGAGTGTG  
**P Y D D Y K C P T C D K F P E C E**

401 450  
 AGGAGTGCCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTA**C**TTTAGCTGC  
**E C P H I S I G C E C G Y F S C**

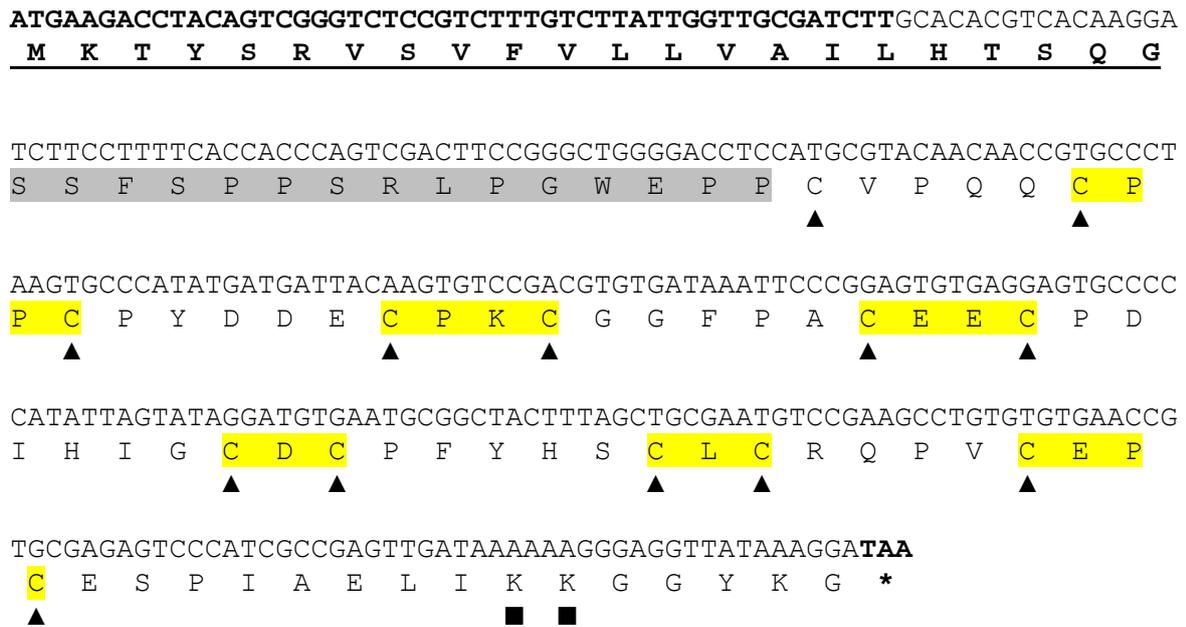
451 500  
 GAATGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTT  
**E C P K P V C E P C E S P I A E L**

501 525  
 GATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA  
**I K K G G Y K G**

**Figure 3.** Séquence du gène codant la stylicine1 identifié chez *L. stylirostris* (**EU177436**).

**En grisé :** La séquence de l'intron de 213 bp.

**\*C** (**EU177436**); **T** (**Litsty 004-A-01 L**)



**Figure 4.** Séquence de l'ADN complémentaire codant la stylicine2 et de sa séquence peptidique correspondante identifiée chez *L. stylirostris*.

**En gras :** Les codons d'initiation et stop.

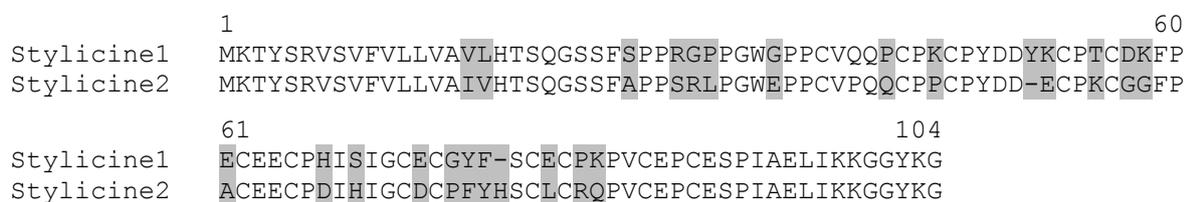
**Souligné :** La séquence du peptide signal composée de 22 acides aminés.

**En grisée :** La région riche en résidus proline.

**En jaune :** Motifs MT

**▲ :** Résidu cystéine.

**■ :** Site de prohormone convertase Lys–Lys.



**Figure 5.** Alignement des séquences en amino-acides consensus issues de la traduction de séquences nucléotidiques de stylicine1 (EU177435 and CV758538) et de stylicine2 (EU177437).

**En grisé :** Les acides aminés différents.

1 50  
**ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGTCTTATTGGTTGCGATCTT**  
 M K T Y S R V S V F V L L V A I L  
 51 100  
 GCACACGTCACAAGGATCTTCCTTTT**GTAAGTTAAGCTGCAGCAGAGACC**  
**H T S Q G S S F S**

101 150  
**GCTCTTTTTTATTTGTTATTTTGTGTAATTAGATGCTAGTCTGATTATT**

151 200  
**ATCATTGAAGAAGAAAATAATAACTCTGCTATGTAACGAATGGCAATA**  
 201 250  
**AAGATGCTCTAAATGATAGTGATATCAATGTTTACTTCCTTTTTATTTTC**

251 300  
**CATTCTTGGCTTGCTTGTCTTGTCCAGCACCACCCAGTCGACTTCCGGG**  
**P P S R L P G**

301 350  
 CTGGGAACCTCCATGCGTACCGCAGCAGTGCCCACCGTGCCCATATGATG  
**W E P P C V P Q Q C P P C P Y D D**

351 400  
 ATGAGTGTCCGAAGTGCGGGGGTTTCCCTGCGTGTGAGGAGTGCCCCGAT  
**E C P K C G G F P A C E E C P D**

401 450  
 ATTCATATAGGATGTGACTGCCCTTTCTACCACAGCTGCTTGTGTGTCGGCA  
**I H I G C D C P F Y H S C L C R Q**

451 500  
 GCCTGTGTGTGAACCTTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTAATCAAAAAGG  
**P V C E P C E S P I A E L I K K G**

501 514  
 GAGGTTATAAAGGA  
**G Y K G**

**Figure 6.** Séquence du gène codant la stylicine2 identifié chez *L. stylirostris* (**EU177437**).

**En grisé :** La séquence de l'intron de 202 pb.

## **2. Caractérisation du gène codant la stylicine2**

### ***a) Séquence de l'ADN complémentaire***

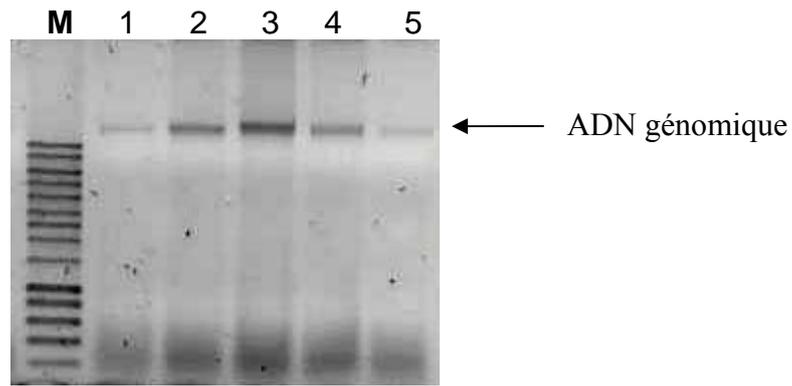
Lors de l'amplification du cDNA codant la stylicine1, une seconde séquence composée de 312 paires de bases a été amplifiée, du codon d'initiation de la transcription ATG jusqu'au codon d'arrêt de la traduction (Figure 4). Cette séquence nucléotidique présente 85 % d'homologie avec la séquence codant la stylicine1. Le peptide correspondant a été nommé stylicine2, il est composé de 104 résidus (Figure 5). Ce peptide a une séquence en acides aminés, une structure et un point isoélectrique théorique calculé de 4.74 très proche de celui de la stylicine1. L'analyse de la structure primaire, de cet homologue de la stylicine1 (81% d'homologie), révèle également la présence de six motifs de fixation d'ions métalliques et d'un site de prohormone convertase.

### ***b) Séquence issue d'ADN génomique***

L'ensemble du gène codant la stylicine2 a été amplifié à partir du même ADN génomique de *L. stylirostris*. Ce gène (numéro d'enregistrement GenBank **EU177437**) se caractérise par une taille de 514 paires de bases. Il est composé, comme pour la stylicine1, de deux exons et d'un intron. Les deux exons présentent respectivement des tailles de 76 et 236 paires de bases et l'intron une taille de 202 paires de bases (Figure 6). Son organisation génomique est similaire à celle du gène codant la stylicine1. Son intron ne présente aucune similarité avec l'intron du gène de la stylicine1, il est même plus court de 13 bases. Ce gène pourrait être un paralogue du gène codant la stylicine1, du fait du haut degré d'homologie entre leurs séquences codantes.

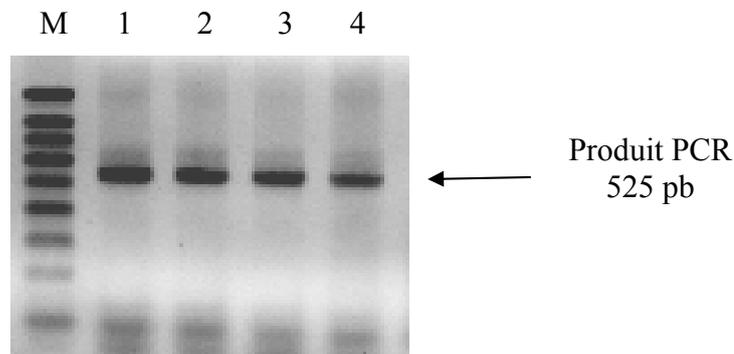
## **3. Caractérisation des gènes dans diverses populations de *L. stylirostris***

L'étude de ce polymorphisme a pour objectif principal de caractériser des allèles ou des génotypes susceptibles de conférer aux individus qui les portent, un caractère de résistance aux agressions par des bactéries pathogènes. La recherche de substitution ou de délétion au niveau de la partie codante des gènes, pourrait nous permettre de relier la présence de mutations éventuelles aux propriétés fonctionnelles de la protéine.



**Figure 7.** Electrophorégrammes d'ADN génomique de 5 échantillons issus de la population 1 de *L. stylirostris*.

**M :** Marqueur 1kb (promega).



**Figure 8.** Electrophorégrammes des produits d'amplification (525pb) correspondant au gène codant la stylicine1 à partir de 4 échantillons de la population 1 de *L. stylirostris*

**M :** Marqueur 100 Pb (promega).

```

1                                     74
a GTAAGTTAAGCTGCAGCAGAGACCGCTCTTTTTTATTTGTTATTTTGAAGTTCAGTGTGTAATAAATCGAAGC
b GTAAGTTAAGCTGCAGCAGAGACCGCTCTTTTTTATTTGTTATTTTGAAGTTCAGTGTGTAATAAATCGAAGC

75                                     128
a AAGTCTGGTTATTCCTACTGGAGGAAAAGTAGATTGTCGTTATAGTACTATGCTGATGGCAATAATGATGCTCT
b AAGTCTGGTTATTCCTACTGGAGGAAAAGTAGATTGTCGTTATAGTACTATGCTGATGGCAATAATGATGCTCT

129                                     193
a AAATGATAATGACATGGTTATTTCTTTTCTATTTTTCATTTTGGCTTGCTTGCTTGTGTTCCAG
b AAATGATAATGACATGGTTATTTCTTTTCTATTTTTCATTTTGGCTTGCTTGCTTGTGTTCCAG

```

**Figure 9.** Séquences des deux variants de l'intron du gène codant la stylicine1 identifiés chez *L. stylirostris*. Le changement de base est surligné en rouge.

### *a) Du gène codant la stylicine1*

La diversité génétique du gène codant la stylicine1 des individus issus de quatre populations de *L. stylirostris* d'élevages et sauvages a été analysée (Tableau 1).

Les résultats des analyses sur la qualité des ADN extraits montrent que les 96 ADN génomiques provenant des populations 1, 2, 3 et 4 (24 ADN par population) sont de bonne qualité car les valeurs des rapports  $A_{260}/A_{280}$  sont comprises entre 1.8 et 2 et ne sont pas dégradés (Figure 7). L'amplification du gène codant la stylicine1 révèle sur gel d'agarose une bande de 525 paires de bases chez tous les individus (Figure 8). Ces résultats suggèrent que la totalité du gène codant la stylicine1 (intron + exons) a été amplifiée chez ces individus.

En raison des homologies de séquences des extrémités 3' et 5' des gènes codant les stylicines 1 et 2, par utilisation des amorces R1F et R1R, nous avons probablement amplifié les deux gènes. Pour obtenir les séquences des allèles correspondant uniquement au gène codant la stylicine1, nous avons utilisé deux nouvelles amorces I1F et I1R dessinées dans l'intron et spécifiques de ce gène (Tableau 2).

#### *Polymorphisme intronique*

Précisons que dans cette étude, nous parlerons d'haplotypes et non de génotypes car nous ignorons le nombre de loci ou de copies du gène codant la stylicine1 dans le génome de *L. stylirostris*.

L'analyse des séquences de l'intron, sur l'ensemble des populations étudiées, a conduit à la détermination de deux allèles a et b. Les séquences de ces deux allèles sont présentées dans la figure 9. Des deux haplotypes, (aa) et (ab), mis en évidence, l'haplotype (aa) est le plus fréquent, l'haplotype (ab) n'ayant été détecté que sur un individu issu de la population sauvage. Cet intron n'est pas polymorphe car il présente moins de 5% de diversité.

#### *Polymorphisme de l'exon 1*

L'analyse des séquences de l'exon 1 sur les quatre populations étudiées a conduit à la détermination de 5 profils caractéristiques dénommés respectivement haplotypes aa, bb, cc, ab et bc. La séquence des trois allèles a, b et c est présentée dans la figure 10. Les allèles b et c présentent des substitutions qui ne provoquent pas de changement en acide aminé.

1 76

a ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGTCTTACTGGTTGCGATCTTGACACGTCACAAGGATCTTCCTTTT

b ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTC TGTCTTTGTCTTACTGGTTGCGATCTTGACACGTCACAAGGATCTTCCTTTT

c ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGTCTTA TTGGTTGCGATCTTGACACGTCACAAGGATCTTCCTTTT

**Figure 10.** Séquences des trois allèles de l'exon 1 du gène codant la stylicine1 identifiées chez *L. stylirostris*. Les changements de bases sont surlignés en rouge.

1 82

\*\*\*\*

a CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

b CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAA ----CGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

c CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

d CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

e CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

f CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

g CACCTCCCAGAGGGCCTCCGGGTGCGGACCCCATGCGTACAACAACCGTGCCCTAAGTGCCCATATGATGATTACAAGTG

83 164

\* \*

a TCCGACGTGTGATAAATCCCGGAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTATTTTAGCTGCGAA

b TCCGACGTGTGATAAATCCCGGAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTATTTTAGCTGCGAA

c TCCGACGTGTGATAAATCCCG GAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTATTTTAGCTGCGAA

d TCCGACGTGTGATAAATCCCGGAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGA TGCGGCTATTTTAGCTGCGAA

e TCCGACGTGTGATAAATCCCGGAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTA TTTTAGCTGCGAA

f TCCGACGTGTGATAAATCC GAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTA TTTTAGCTGCGAA

g TCCGACGTGTGATAAATCCCG GAGTGTGAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGAATGCGGCTA TTTTAGCTGCGAA

165 238

a TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

b TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

c TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

d TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

e TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

f TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

g TGTCCGAAGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATCGCCGAGTTGATAAAAAAGGGAGGTTATAAAGGA

**Figure 11.** Séquences des sept allèles de l'exon2 du gène codant la stylicine1 identifiées chez *L. stylirostris*.

Les changements de bases sont surlignés en rouge.  
 Les délétions sont surlignées en bleu.  
 \*mutations non synonymes

	1	50
Stylicine1	MKTYSRVSVFVLLVAILHTSQGSSFSPPRGPPGWPPCVQQPCPKCPYDD	
Stylicine1B	MKTYSRVSVFVLLVAILHTSQGSSFSPPRGPPGWPPCVQQPCPKCPYDD	
Stylicine1C	MKTYSRVSVFVLLVAILHTSQGSSFSPPRGPPGWPPCVQQPCPKCPYDD	
Stylicine1D	MKTYSRVSVFVLLVAILHTSQGSSFSPPRGPPGWPPCVQ <span style="color: red;">RALSAHMMIT</span>	
	51	104
Stylicine1	YKPTCDKFPKCEEPHISIGCECGYFSCECPKPVCEPCESPIAELIKKGGYK	
Stylicine1B	YKPTCDKFP <span style="color: red;">K</span> CEEPHISIGCECGYFSCECPKPVCEPCESPIAELIKKGGYK	
Stylicine1C	YKPTCDKFP <span style="color: red;">K</span> CEEPHISIGCECGYFSCECPKPVCEPCESPIAELIKKGGYK	
Stylicine1D	<span style="color: red;">SVRRVINSRSVRSAPILV</span> .	

**Figure 12.** Alignement de la séquence de la stylicine1 avec les séquences des trois variants identifiées chez *L. stylirostris*.

Les acides aminés différents sont surlignés en rouge.

Les allèles b et c sont détectés à des fréquences faibles, globalement moins de 5% et uniquement dans la population prélevée dans le milieu naturel. L'intron 1 n'est donc pas polymorphe. De plus ces allèles ne diffèrent de la séquence de référence que par des changements de bases ne modifiant pas les acides aminés correspondant. La séquence peptidique codée par ces allèles correspond à la stylicine1.

### *Polymorphisme de l'exon 2*

L'analyse des séquences de l'ensemble des quatre populations a conduit à l'identification de sept allèles a, b, c, d, e, f et g qui sont présentées dans la figure 11 et qui codent quatre séquences peptidiques différents (Figure 12).

L'allèle a correspond au gène de référence et code la stylicine1. L'allèle c diffère par un changement de la base G en A en position 105 substituant l'acide glutamique en lysine (stylicine1B). L'allèle g diffère par un changement de la base G en A en position 105 substituant l'acide glutamique en lysine (comme pour l'allèle c) et, par une mutation silencieuse de la base T en C en position 153. Les allèles d et e diffèrent par des changements de bases qui ne modifient pas les acides aminés correspondants. L'allèle f diffère par des changements de deux bases C en T en position 103 et G en A en position 105, mutant les acides aminés proline et acide glutamique en leucine et lysine (stylicine1C). L'allèle b diffère de la séquence de référence par la présence d'une délétion des 4 bases nucléiques en position 45, 46, 47 et 48. Ce qui se traduit par un décalage dans le cadre de lecture qui engendre des modifications importantes dans la séquence peptidique correspondante. Les conséquences sont une modification de 28 acides aminés et, une perte de 36 autres à l'extrémité carboxy-terminale du peptide (stylicine1D).

Au moins l'un des allèles qui codent l'un des variants 1B, 1C ou 1D de la stylicine1, est présent dans le génome de 14% des individus de la population sauvage et 50% des individus de la population d'élevage de nouvelle Calédonie (Tableau 6). Ces trois variants 1B, 1C, 1D montrent des variations significatives avec la stylicine1: différences de charge électrique pour les variants 1B et 1C, différences de taille, de charge et de structure pour le variant 1D (Tableau 5). Ces différences pourraient entraîner des changements significatifs des propriétés biologiques de ces peptides par rapport à la stylicine1.

**Tableau 5.** Paramètres biochimiques et physicochimiques de la forme mature de la stylicine1 et de trois de ses variants identifiés chez *L. stylirostris*.

	stylicine1	stylicine1B	stylicine1C	stylicine1D
Nombre d'acides aminés	82	82	82	<b>46</b>
Poids moléculaire (en Daltons)	8933	8932	8948	<b>4992</b>
Point isoélectrique (pI)	5.00	<b>5.72</b>	<b>5.72</b>	<b>9.61</b>

**Tableau 6.** Distribution des fréquences des différents allèles identifiés au niveau de l'exon 2 du gène codant la stylicine1 dans différentes population de *L. stylirostris*.

Allèles	Population sauvage		Population d'élevage	
	Mexique	N. Calédonie	Tahiti 1	Tahiti 2
<b>a</b>	<b>0.31</b>	<b>0.50</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>
<b>b</b>	<b>0.04</b>			
<b>c</b>	<b>0.08</b>	<b>0.44</b>		
<b>d</b>	<b>0.52</b>			
<b>e</b>	<b>0.02</b>			
<b>f</b>	<b>0.02</b>			
<b>g</b>		<b>0.06</b>		

L'effectif de chaque population est de 24 individus.

Les allèles codant l'un des variants de la stylicine1 sont surlignés en jaune.

**Tableau 7.** Distribution des fréquences des différents haplotypes identifiés au niveau de l'exon 2 du gène codant la stylicine1 dans différentes populations de *L. stylirostris*.

Haplotype	Population sauvage	Population d'élevage		
	Mexique	N. Calédonie	Tahiti 1	Tahiti 2
aa	0.291	0.375	1,00	1,00
<b>bb</b>	0.042			
<b>cc</b>		0.375		
<b>dd</b>	0.375			
<b>ac</b>		0.125		
<b>ad</b>	0.042			
<b>ag</b>		0.125		
<b>cd</b>	0.166			
<b>de</b>	0.042			
<b>df</b>	0.042			

L'effectif de chaque population est de 24 individus.

Les haplotypes qui présentent au moins un allèle codant l'un des variants de la stylicine1 sont surlignés en jaune.

**Tableau 8.** Taux d'hétérozygotie, écart aux proportions de Hardy-Weinberg et tests de déficit en hétérozygotes.

	Sauvage	N. Calédonie	Tahiti1	Tahiti2
N	24	24	24	24
Hobs	0.29	0.25	0.00	0.00
H n.b	0.63	0.56	0.00	0.00
Fis	<b>0.54*</b>	<b>0.56*</b>	ND	ND
Fis(p)	0.22-0.80	0.27-0.84	ND	ND

N : Effectif échantillonné.

Hobs : hétérozygotie observée

H n.b. estimation non biaisée de l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg

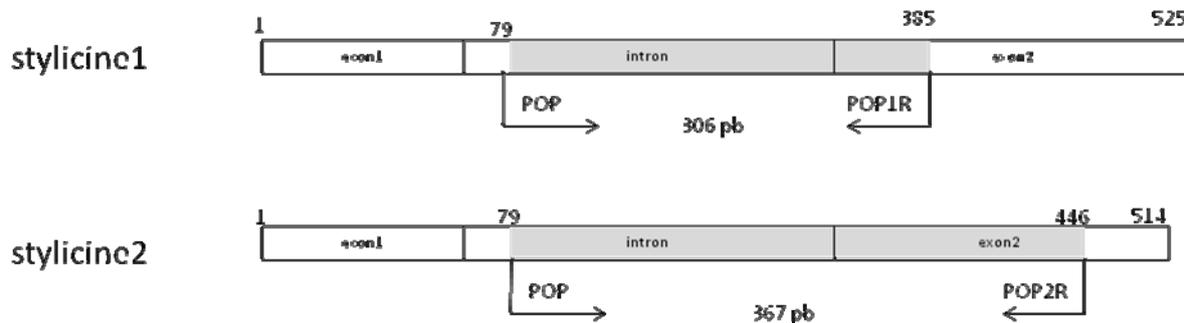
Fis : valeur de Fis

Fis(p) : Fourchette de valeur de Fis après 1000 permutations

\*Valeurs de Fis significatives ( $P < 0.05$ )

**Tableau 9.** Séquences des amorces utilisées pour rechercher les gènes codant la stylicine1 et la stylicine2 dans le génome de différentes populations de *L. stylirostris*.

Amorces	Séquences (5'-3')	Gènes	Taille du fragment amplifié
POP1R	ATC-ACA-CGT-CGG-ACA-CTT-GTA	stylicine1	306 pb
POP	AAG-TTA-AGC-TGC-AGC-AGA-GAC		
POP2R	CAA-GCA-GCT-GTG-GTA-GAA-AGG	stylicine2	367pb



**Figure 13.** Représentations schématiques de la position des amorces utilisées pour l'amplification des fragments spécifiques des gènes codant les stylicines 1 et 2.

L'analyse des fréquences de ces allèles, nous a conduit à la détermination de neuf profils correspondant aux haplotypes (aa), (bb), (cc), (dd), (ac), (ag), (cd), (de) et (df) (Tableau 7).

Dans la population de *L. stylirostris* sauvage, sept haplotypes ont été détectés. Les haplotypes (aa), (dd) et (cd) sont les plus fréquents et représentent respectivement 29,1%, 37,5% et 16,6% des haplotypes. Les haplotypes (ad), (bb), (de) et (df) sont détectés à des fréquences faibles, inférieures à 5%. La fréquence des allèles qui codent la stylicine1 est de 85,4%.

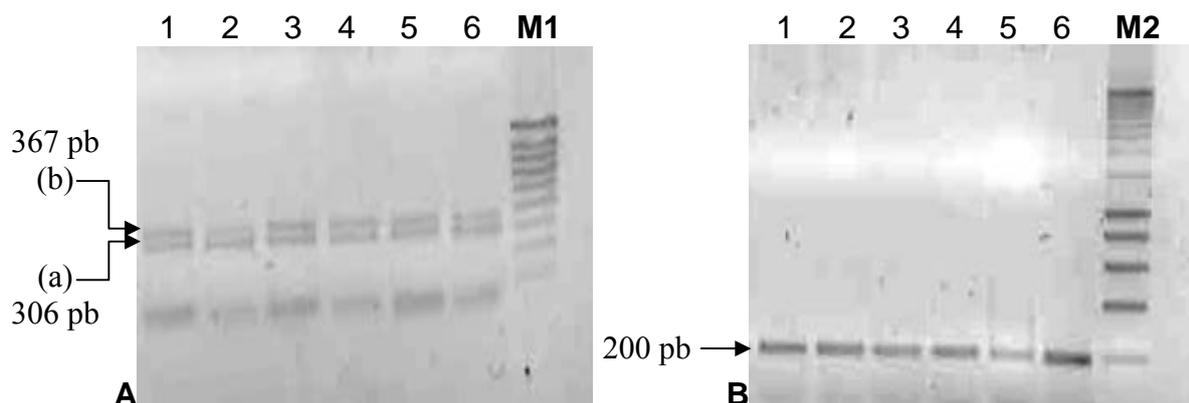
Dans la population de *L. stylirostris* d'élevage en nouvelle Calédonie, nous avons mis en évidence quatre haplotypes (aa), (cc), (ac) et (ag). L'haplotype (aa) est présent à une fréquence de 37,5%. L'haplotype (cc) est présent à une fréquence de 37,5%. Les deux derniers (ac) et (ag) sont présents chacun à une fréquence de 12,5%. La fréquence des allèles qui codent la stylicine1 est de 50 %.

Dans les deux populations de *L. stylirostris* d'élevages de Tahiti, nous n'avons mis en évidence qu'un seul allèle, l'allèle a, qui codent la stylicine1. La fréquence des allèles qui codent la stylicine1 est de 100%.

L'analyse comparative des populations, révèle une variabilité plus réduite dans les populations d'élevages de nouvelle Calédonie et de Tahiti (1 à 3 allèles au lieu de 6 dans la population sauvage). Les valeurs des hétérozygoties de l'exon2 sont présentées dans le tableau 8. Le déficit en hétérozygotes (Fis) est significatif dans toutes les populations, même pour la population sauvage ( $P < 0.05$ ).

#### ***b) Du gène codant la stylicine2***

Bien que nous n'ayons pas étudié le polymorphisme de séquence du gène codant la stylicine2, nous avons voulu savoir si ce gène était également présent, comme pour la stylicine1, dans le génome de tous les individus de *L. stylirostris* et ce quelle que soit leur origine (Tableau 1). Pour cela, nous avons réalisé une amplification PCR en multiplexage, des fragments spécifiques de 306 et 367 paires de bases codant la stylicine1 et la stylicine2. Nous avons utilisé une amorce sens dessinée dans une région 100% homologue des introns et deux amorces anti-sens choisies dans une région spécifique de l'exon 2 de la stylicine1 (Pop1R) ou de la stylicine2 (Pop2R) (Tableau 9 ; Figure 13).



**Figure 14.** Electrophorégrammes des produits d’amplification obtenus à partir d’ADN de 6 échantillons de la population 1 de *L. stylirostris*:

**A** : Fragments des stylicines : (a) stylicine1 ; (b) stylicine2

**B** : Fragment du facteur d’élongation EF (contrôle positif)

**M1** : Marqueur 100 bp (Promega)

**M2** : Marqueur 1kb (Promega).



**Figure 15.** Expression relative par QPCR des ARNm codant les stylicines 1 (sty1) et 2 (sty2) dans les hémocytes de crevettes (n=15) avant infection par *V. penaeicida* au temps T=0.

**a.** ligné non sélectionnée (NS).

**b.** ligné sélectionnée (S) ayant survécu au syndrome 93.

Les résultats obtenus, montrent une amplification de deux fragments d'ADN de 306 et 367 paires de bases (Figure 14A) chez tous les individus de toutes les populations. Conformément à notre attente, le contrôle positif, un fragment du facteur d'élongation de 200 paires de bases a également été amplifié chez tous ces individus (Figure 14B).

Ces résultats montrent, que les gènes codant la stylicine2 sont probablement présents dans le génome de tous les individus de *L. stylirostris*, qu'ils soient d'origine naturelle ou issus d'un élevage.

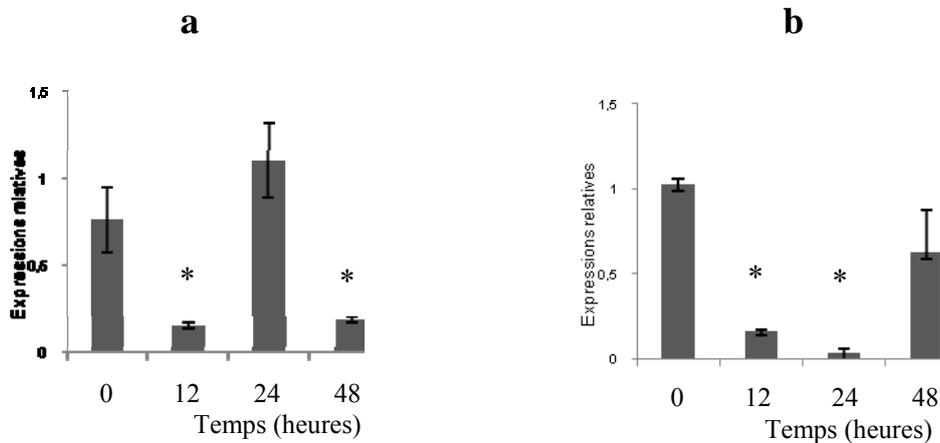
#### **4. Expression des ARNm codant les stylicines 1 et 2**

Nous avons voulu savoir si l'expression des ARNm codant les stylicines 1 et 2 était modulée dans les hémocytes de crevettes après une infection par *V. penaeicidae*. Pour cela, nous avons analysé l'expression des ARNm codant ces deux peptides dans les hémocytes circulants de deux lignées de crevettes juvéniles de *L. stylirostris*. Une sélectionnée sur sa capacité à survivre au "Syndrome 93" (S) et, une non sélectionnée (NS) n'ayant pas subi les effets de ce syndrome.

Avant de procéder à l'analyse de l'expression des ARNm codant ces peptides, nous avons vérifié l'efficacité de la réaction d'amplification. Brièvement, 2,5 µL de chaque réaction de transcription réverse provenant des 15 individus/temps, ont été mélangés puis dilués au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64<sup>ème</sup> avant d'être amplifiés. Les résultats de l'amplification montrent, que la concentration en ARNm des échantillons est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence et, que l'efficacité des réactions de qPCR est conforme aux valeurs admises, c'est-à-dire comprise entre 1,8 et 2. Avant et après l'infection, nous avons également analysé l'expression de l'ARNm codant la protéine Elongation Factor dans les hémocytes. Dans ce cas, on peut noter que ce transcrit n'est pas modulé par l'infection microbienne, il peut donc être utilisé comme référentiel pour calculer les expressions relatives des ARNm codant les stylicines 1 et 2 de notre expérimentation.

##### **a) Expression de l'ARNm codant la stylicine1**

Quelle que soit la lignée considérée NS ou S, l'ARNm codant la stylicine1 est exprimé dans les hémocytes des crevettes juvéniles avec des niveaux d'expressions similaires à celui de l'ARNm de l'Elongation Factor avant l'infection (valeurs des rapports de 0.8 et de 1) (Figure 15).

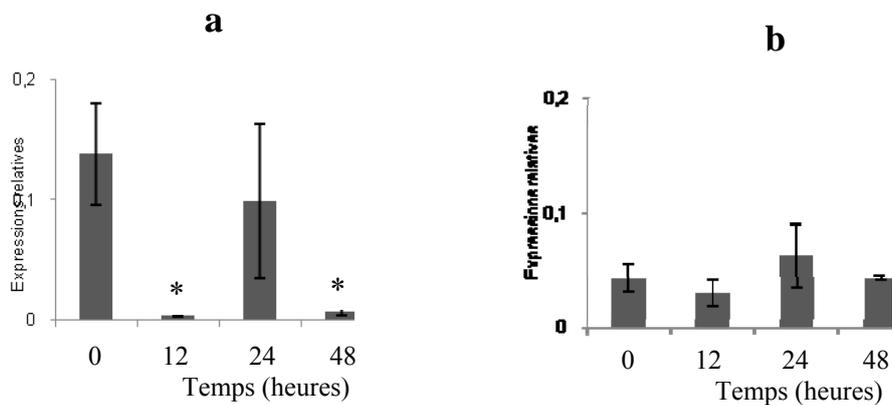


**Figure 16.** Expression relative (QPCR) de l'ARNm codant la stylicine1 dans les hémocytes de crevettes (n=15) après infection par *V. penaeicida* au temps 0, 12, 24 et 48 heures.

**a.** ligné non sélectionnée (NS).

**b.** ligné sélectionnée (S) ayant survécu au syndrome 93.

\* Expression significativement différente,  $P < 0.05$



**Figure 17.** Expression relative par QPCR de l'ARNm codant la stylicine2 dans les hémocytes de crevettes (n=15) après infection par *V. penaeicida* au temps 0, 12, 24 et 48 heures.

**a.** ligné non sélectionnée (NS).

**b.** ligné sélectionnée (S) ayant survécu au syndrome 93

\* Expression significativement différente,  $P < 0.05$

Après l'infection, nous observons que dans les hémocytes circulants issus de la lignée NS, la quantité d'ARNm codant la *stylicine1* baisse fortement 12 heures après l'infection (environ 80%, P value < 5%). Ensuite, elle augmente pour atteindre le niveau des conditions initiales à 24h00 et baisse à nouveau fortement à 48 heures (P value < 5%) (Figure 16).

Dans les hémocytes circulants issus de la lignée S, la quantité d'ARNm codant la *stylicine1* baisse significativement 12 heures après l'infection comme dans les hémocytes issus de la population NS. Cette chute se poursuit à 24 heures, contrairement aux résultats obtenus avec la population NS, puis augmente à 48h00 pour retrouver un niveau d'expression équivalent de celui observé dans les conditions initiales au temps t=0 (Figure 16).

Les profils d'expressions observés avec la lignée NS, seraient le résultat de l'expression d'ARNm codant la *stylicine1* provenant d'individus capables de survivre au "syndrome 93" et d'individus incapables d'y survivre. L'expression du transcrite codant la *stylicine1* observée à 24 heures est probablement due aux individus incapables de survivre à l'infection à *V. penicillidae*. En effet pour la lignée S, nous avons mis en évidence que l'expression de l'ARNm codant la *stylicine1* continue de baisser au delà de 12 heures et ce jusqu'à 24 heures.

### ***b) Expression de l'ARNm codant la stylicine2***

Avant l'infection, les résultats obtenus montrent que, quelle que soit la lignée considérée NS ou S, l'ARNm codant la *stylicine2* est exprimé dans les hémocytes de crevettes juvéniles avec des niveaux d'expressions 5 à 20 fois inférieurs à celui de l'ARNm du contrôle Elongation Factor (valeurs des expressions relatives comprises entre 0.05 et 0.2) (Figure 15).

Après l'infection, nous observons que dans les hémocytes circulants des individus de la lignée NS, la quantité d'ARNm codant la *stylicine2* (comme pour la *stylicine1*), baisse significativement 12h00 après l'infection. Puis elle augmente, pour atteindre le niveau des conditions initiales à 24h00 et baisse à nouveau significativement à 48h00 (Figure 18). Dans les hémocytes circulants des individus issus de la lignée S, la quantité d'ARNm codant la *stylicine2* reste constante et n'est pas modulée (Figure 17).



## 5. Mise en évidence des stylicines chez d'autres espèces de crevettes pénéides.

Dans cette partie, nous avons essayé de mettre en évidence, chez d'autres espèces de crevettes pénéides, l'existence de tels gènes qui codent des peptides de cette famille. Deux approches expérimentales ont été envisagées : d'abord une amplification par PCR de ces gènes, puis une recherche des séquences présentant de fortes homologies avec ceux ci dans les banques de données.

### a) Par amplification PCR

Les ADN génomiques issus de trois espèces de crevettes pénéides *P. merguensis*, *P. japonicus* et *P. monodon*, ont été extraits et leurs qualités vérifiées par le calcul du rapport  $A_{260}/A_{280}$ . L'utilisation d'amorces homologues du gène codant la stylicine1 de *L. stylirostris*, n'a malheureusement pas permis pour ces trois espèces, l'amplification de fragments présentant des homologies de séquences avec le gène codant la stylicine1 et ce quelle que soit la température d'hybridation des amorces utilisée.

### b) Par homologie de séquences

Plusieurs séquences nucléotidiques provenant de crevettes pénéides ont été identifiées. Ces séquences présentent de fortes homologies avec les séquences de stylicine1 (**EU177435** et **CV758538**) et de stylicine2 (**EU177437**). Il s'agit des séquences Pm-1 (**DW042940** et **DW678039**) provenant de la crevette *P. Monodon*. Les séquences partielles Lv-1 (**BE188497** et **BE188495**) et Lv-2 (**CK591498**, **CV468241** et **CK591492**) issues de la crevette *L. vannamei*

Après traduction, nous avons mis en évidence trois séquences peptidiques. Il s'agit de deux séquences partielles de *L. vannamei* et d'une séquence de *P. Monodon* (Figure 19). Ces séquences nucléotidiques ont été comparées aux séquences des stylicines 1 et 2 (numéro d'enregistrement GenBank **EU177435** et **EU177437**). Ces séquences présentent entre 61% et 76% d'homologies avec la stylicine1 et entre 70% et 93% d'homologies avec la stylicine2.

Si on les compare aux séquences de la base de données GeneBank, aucune ne présente d'homologie significative avec des séquences peptides antimicrobiens connus et déjà caractérisés.

### 3. Discussion

Ces travaux relatifs à la caractérisation des stylicines chez *L. stylirostris* ont montré que chaque stylicine était codée par un gène spécifique. Ces gènes présentent une structure similaire bipartite à savoir, une distribution des acides aminés dans deux exons. Les séquences du peptide signal sont codées par l'exon 1, celles des peptides matures sont codées par l'exon 2. Contrairement à la partie contenant les régions riches en proline et cystéine qui sont variables, la séquence codant le peptide signal est conservée. Une telle conservation des séquences codant un peptide signal a déjà été décrite pour des gènes codants des peptides antimicrobiens comme la dermaseptine B de grenouille (Vouille *et al*, 1997) et les pénéidines de la crevette *L. vanammei* (O'Leary et Gross, 2006). On a pu également noter que les extrémités 3' de ces gènes étaient également fortement conservées, ce qui nous permet de supposer que ces gènes pourraient résulter d'une duplication / translocation de l'un d'eux, et être de ce fait des gènes paralogues. Une des principales conséquences se traduisant par des propriétés biologiques différentes des deux peptides codés.

L'étude du polymorphisme du gène codant la stylicine, a permis de mettre en évidence un fort déficit en hétérozygotes dans toutes les populations de *L. stylirostris* étudiées. Les valeurs de l'hétérozygotie observée (Hobs), inférieures à celles de l'hétérozygotie attendue (Hn.b), que nous avons obtenues, ont été rapportées dans une étude antérieure réalisée en 2003 par Goyard (Goyard *et al*, 2003) à partir de marqueurs microsatellites (marqueurs neutres).

Plusieurs raisons pourraient expliquer ce résultat. (i) Un problème technique dû à la présence d'allèles nuls (indétectables) avec par conséquence l'identification de faux homozygotes. (ii) Des raisons biologiques, comme : (a) un **effet Wahlund\*** dont la conséquence est une surestimation du nombre d'hétérozygotes attendus dû à la présence de populations distinctes en mélange, (b) la dérive génétique, (c) la sélection d'allèles spécifiques.

La présence d'allèles nuls ne semble pas être une explication satisfaisante. En effet, nous avons mis en évidence que les extrémités 5' et 3' des gènes codant les stylicines sont fortement conservés.

Si l'effet Wahlund peut expliquer le déficit en hétérozygotes de la population sauvage, il ne peut pas expliquer celui observé en élevage car les populations sont homogènes.

\***l'effet Wahlund** est un déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg qui traduit la subdivision de la population étudiée en plusieurs populations qui n'échangent pas ou peu de gamètes.

Les effets de la dérive génétique semblent peu probables. Celle-ci s'observe surtout sur les marqueurs neutres, qui ne confèrent ni avantage ni désavantage sélectif.

Le déficit en hétérozygotes observé pour les populations d'élevage est probablement lié à l'échantillonnage composé de crevettes de la même classe d'âge, susceptibles d'appartenir à un nombre de fratries réduites et consanguines (Bierne *et al*, 2000 ; Goyard *et al*, 2003). Cependant, cela n'explique pas le déficit observé de notre population sauvage.

Dans notre étude, la sélection peut être fortement suspectée et ce pour plusieurs raisons : (1) Contrairement aux microsatellites ou aux introns, notre marqueur (l'exon 2 de la stylicine1) n'est pas neutre et correspond à une séquence codante. (2) Nous avons mis en évidence l'existence de plusieurs séquences codant des variants de la stylicine1 susceptibles d'avoir des propriétés biologiques différentes. (3) Le fait qu'un allèle se soit fixé dans les populations de Tahiti, indique vraisemblablement qu'il est capital pour la survie de celles-ci. (4) La différence élevée du nombre moyen d'allèles par locus entre la population sauvage et les populations d'élevages indique une perte de diversité génétique dans des populations d'élevages et une probable sélection d'allèles. Le goulot d'étranglement génétique, dû à la perte de la quasi-totalité de la production de *L. stylirostris* de Tahiti survenue après une infection par le virus IHHN (Lighthner, 1996) vers la fin des années 1980 est en partie responsable de cette perte de diversité. L'élevage de ces individus n'ayant été relancé que dix ans plus tard (Le Moullac *et al*, 2003), à partir d'une lignée AQUACOP SPR43, capable de résister à ce virus (Weppe *et al*, 1992). Le gène codant la stylicine1 subirait des pressions de sélection par les pathogènes du milieu naturel car les crevettes sont en contacts avec des virus, des champignons et des bactéries comme *V. penaeicidae* responsable du syndrome 93.

L'analyse de l'expression relative des transcrits codants la stylicine1 et la stylicine2 au cours d'une infection bactérienne est à notre connaissance la première étude sur l'expression de deux gènes d'une même famille de peptides.

Les deux transcrits, codant les stylicines 1 et 2, sont exprimés constitutivement dans les hémocytes d'animaux témoins, mais ne présentent pas le même niveau d'expression. L'expression du transcrit codant la stylicine1 est 5 à 10 fois supérieure à l'expression du transcrit codant la stylicine2. Des travaux antérieurs effectués sur les pénéidines 2 et 4 de *P. vanammei*, indiquent que ces deux peptides, qui s'expriment à des niveaux différents dans les hémocytes, sont différemment régulés (O'Leary et Gross, 2006). Dans notre étude l'expression des transcrits codant les stylicines 1 et 2 pourrait avoir un mode de régulation similaire à celui des pénéidines.

Chez des individus sélectionnés pour leur capacité à survivre au "syndrome 93", *V. penaeicida* n'induit pas l'expression des transcrits codant les stylicines. Seul le transcrit codant la stylicine1 voit son expression diminuer pendant les 24 premières heures après l'infection. Ce résultat s'apparente à l'expression des transcrits codants les pénéidines chez *L. vannamei* à la suite d'une infection à *V. penaeicida*. Cette baisse d'expression des transcrits codant les pénéidines (observée également au cours des 24 premières heures après l'infection) étant reliée au recrutement des hémocytes qui produisent ces peptides sur le site de l'infection (Munoz *et al*, 2004). Dans notre modèle, les hémocytes qui produisent la stylicine1, pourraient être soumis au même sort. En comparant l'importance des stylicines 1 et 2, dans la réponse à l'infection on peut supposer que la stylicine1 uniquement serait impliquée dans la réaction de défense des crevettes.

Dans un mélange composé d'individus capables et incapables de survivre au "syndrome 93", *V. penaeicida* induit, 24 heures après l'infection, l'expression des transcrits codants les stylicines 1 et 2 (Figures 16a et 17b). Cette expression ne peut être due qu'aux individus incapables de survivre au "syndrome 93". Comme nous l'avons vu précédemment (Figures 16b et 17b) l'expression des transcrits n'est pas induite par les individus qui résistent au "syndrome 93". Les profils d'expressions observés pourraient correspondre à une réponse immunitaire plus générale de ces crevettes incapables de répondre correctement à l'infection. Ainsi les transcrits exprimés par ces individus coderaient des formes non fonctionnelles de stylicines (variants). D'ailleurs de tels variants de la stylicine1 peuvent se rencontrer dans des populations naturelles et d'élevages de crevettes de Nouvelle Calédonie. A titre d'exemple nous avons décrit plusieurs gènes qui codent la stylicine1B (Figure 12, p 49), dans une population de Nouvelle Calédonie postérieure à notre lignée expérimentale. Ce variant diffère principalement de la stylicine1, par une modification de charge électrique qui peut entraîner des changements dans l'activité biologique du peptide. Ce phénomène a été noté, sur des fragments peptidiques synthétiques dérivés de la défensine (MGD1) de la moule *Mytilus galloprovincialis*, où les auteurs montrent qu'il existe une corrélation entre l'activité antimicrobienne et la charge électrique des peptides (Romestand *et al*, 2003).

Les stylicines sont formées d'une région amino-terminale riche en résidus proline et d'une région carboxy-terminale riche en résidus cystéine. Ce type d'organisation a déjà été décrit chez des peptides antimicrobiens cationiques, les pénéidines (Gueguen *et al*, 2006). Bien que les stylicines soient des peptides anioniques, elles pourraient présenter, comme les pénéidines, des propriétés antimicrobiennes.

Les stylicines présentent des motifs de fixation d'ions métalliques connus des métallothionéines (Mts). Les MTs sont des protéines capables de s'associer à différents ions comme : le cuivre, le cadmium, le calcium, le magnésium ou le zinc. Comme pour les Mts, les stylicines pourraient se lier à ces ions métalliques et ainsi être impliquées dans divers processus métaboliques comme : l'absorption, le stockage, la détoxification, le transport, l'excrétion et l'hémostase (Kägi et Kojima, 1987). Comme nous l'avons déjà signalé précédemment, ces deux peptides présentant 81% d'homologie, on peut supposer qu'ils possèdent des activités biologiques différentes. En effet, chez *D. melanogaster*, deux MTs, présentant des séquences très proches, Mtn (40 aa) et Mto (43aa), ont montré des propriétés biologiques différentes: la première est impliquée dans la détoxification tandis que la seconde joue un rôle dans l'hémostase (Debec *et al*, 1985 ; Mokdad *et al*, 1987 ; Silar *et al*, 1990).

En ce qui concerne la recherche de gènes codant la stylicine1 chez d'autres espèces de crevettes péneïdes par une approche d'amplification PCR. On peut noter que l'extrémité 5' du gène identifié chez *P. monodon* présente peu d'homologie avec l'extrémité 5' du gène codant la stylicine1. Ce résultat pourrait expliquer la non amplification par PCR du gène de *P. monodon* par l'utilisation des amorces du gène codant la stylicine1 de *L. stylirostris*. L'utilisation d'amorces dégénérées correspondant aux séquences identifiées de *L. vannamei*, *P. monodon* et *L. stylirostris*, pourrait permettre d'amplifier des gènes de cette famille chez d'autres espèces de crevette péneïdes.

Des résultats présentés dans cette partie, il apparaît que les gènes qui codent les stylicines de *L. stylirostris*, sont les premiers membres d'une nouvelle famille de gènes présents chez plusieurs espèces de crevettes péneïdes. Des deux molécules qualifiées de stylicines 1 et 2, la première est pressentie pour être un bon candidat, impliquée dans la réponse immunitaire de la crevette *L. stylirostris* suite à une infection à *V. penaeicida*. Pour conforter cette hypothèse, une étude des propriétés biologiques des deux molécules nous est apparue nécessaire et nous a conduit à la production de ces peptides en système recombinant. La méthodologie et les principaux résultats correspondants à cette étape sont présentés dans le chapitre III.

## **CHAPITRE III**

### **PROPRIETES BIOLOGIQUES DES rSTYLICINES**

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats relatifs à la caractérisation des peptides recombinants correspondant aux gènes, identifiés chez la crevette bleue du pacifique *L. stylirostris* qui codent pour les deux stylicines 1 et 2. Nous aborderons tout d'abord le clonage, l'expression et la purification des rstylicines et, dans une deuxième étape, nous envisagerons la caractérisation de ces molécules par l'étude de leurs propriétés biologiques.

**Tableau 1.** Séquences des amorces utilisées pour le clonage des gènes codant les stylicines. Le codon souligné dans l’amorce sens correspond à un résidu méthionine incorporé en position N-terminale du peptide. Cette stratégie permet la coupure au bromure de cyanogène. Les bases en gras correspondent aux deux sites de restriction incorporés dans la séquence pour le clonage dans le pET-28b (+).

Amorces	Séquences (5’-3’)	Gènes	Taille des fragments amplifiés
pET28styS	GTCTTGCACACGGGATCC <u>AT</u> GTCTTCCTTTTCACC	Stylicines	277 pb
pET28styR	GTGGCTTCGTTCTCGAGCTCTTATCCTTTATAACC		

## A. Matériels et méthodes

### 1. Production des stylicines recombinantes

#### a) Clonage des gènes et expression des peptides recombinants

Nous avons dessiné deux amorces spécifiques (Tableau 1) qui permettent d'amplifier les gènes codant les stylicines 1 et 2 et de les insérer entre deux sites de restrictions du vecteur pET-28b (+). L'amorce pET28styS (sens) comporte un site de restriction BamH1 suivi d'un codon ATG codant une méthionine en amont du gène. L'amorce pET28styR (anti sens) comporte un site de restriction Sac1 après le codon stop. La PCR est effectuée sur 50 µL de milieu réactionnel, additionné des ADNc obtenus de la transcription reverse d'ARN messagers d'extraits hématocytaires individuels de *L. stylirostris* (cf. Matériels et Méthodes, chapitre II), 100 pmol des amorces Pet28styS et Pet28styR, 0.2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, le tampon *Taq* ADN polymérase, 5U de *Taq* ADN polymérase (Appligène). L'amplification est réalisée sur 35 cycles (1 min à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min à 72°C). Les produits d'amplification ont ensuite été clonés dans le plasmide TopoTA selon le protocole défini par « invitrogen ». Les plasmides sont purifiés sur colonne (QIAquick Nucleotide Removal Kit 50, QIAGEN) et séquencés. Les plasmides qui contiennent les séquences correspondantes aux gènes codant la stylicine1 (**EU177435**) et la stylicine2 (**EU177437**) ont été digérés par les enzymes de restriction BamH1 et Sac1 (20.000 U/mL, *BioLabs*). Les produits de digestion obtenus sont ensuite ligaturés avec le plasmide d'expression pET28b<sup>+</sup> (Novagen) et transformés en *E. coli* DH5α (Wiley & Sons, 2003 ; pp 1.8.1). Les plasmides recombinants ont été par la suite transformés en cellules d'expression *E. coli* BL21(DE3) *Rosetta* (cellules possédant le gène codant la T7 RNA polymérase inductible à l'IPTG). Les cellules sont cultivées à 37°C, en aérobie, sous agitation continue (200 rpm), dans un milieu Luria-Bertani (10 g de bactotryptone, 5 g yeast et 10 g de NaCl) complété de 50 µg/mL de kanamycine (Kan). Lorsque la densité optique (DO) à 600 nm atteint 0.8 unité, l'expression des protéines de fusion His-tag-stylicine1 et His-tag-stylicine2 (fusion entre 6 histidines en Nter et le peptide), est induite par l'addition de 0.5 mM d'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). La culture est ensuite maintenue pendant 12 heures. Les bactéries sont collectées par centrifugation à 6000 rpm /30 min. Après pesée, le culot est congelé à -20°C une nuit. Les cellules sont ensuite lysées par sonication de 2 min à une amplitude 40 à l'aide d'un sonicateur "Vibra cell Sonifier 450" (Branson Ultrasons, Annemasse, France) dans une solution de guanidine-HCl 6M, Tris-HCl 100 mM, pH 8.1 (3 mL/g de cellules fraîches). Le

lysate est clarifié par une centrifugation (centrifugeuse Sorvall S600) de 30 min à 10000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant la protéine de fusion est conservée à 4°C avant purification.

### ***b) Purification, clivage et renaturation des peptides recombinants***

Chaque protéine de fusion (His-tag-stylicine1 et His-tag-stylicine2) a été purifiée par chromatographie d'affinité en incubant le surnageant de lysat cellulaire avec la résine Nickel nitriloTriacetic Acid (Novagen) ratio : 25/1 dans le tampon 6 M Guanidine HCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0) pendant 4 heures à 4°C, sous agitation douce. La résine est ensuite lavée avec 10 volumes de tampon guanidine-HCl 6M, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0. La protéine de fusion est décrochée de la résine par 2 volumes de tampon 6M guanidine HCl, 1M imidazole, 20mMTris-HCl (pH 6.4) et déposée sur une colonne de gel filtration Superdex 200 (Pharmacia) équilibrée avec 5% d'acide acétique, puis éluée à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant la protéine de fusion sont mélangées puis lyophilisées. La protéine de fusion est clivée au niveau de ses résidus méthionine après sa dissolution dans une solution d'acide formique 80%, contenant 10 mg/mL de Bromure de Cyanogène (CNBr) suivie d'une incubation de 8h00 à l'obscurité à 25°C. Le clivage est stoppé par addition de 10 volumes d'eau distillée suivi d'une lyophilisation. Le lyophilisat est dissout dans 6 mL (+2 mL de lavage) de tampon de renaturation contenant 0.1 M de NaHCO<sub>3</sub>, (pH 8.1), 3mM de glutathion réduit et 0.3 mM de glutathion oxydé, 2M urée, l'ensemble dans du N,N-diméthylformamide à 25%. Le mélange est incubé 48h00 à température ambiante (Wu *et al*, 2003). Le peptide est ensuite dialysé contre 5% d'acide acétique pendant 4h00, lyophilisé et dissout dans 2 mL d'acide acétique 5%. Le peptide est déposé sur une colonne de gel filtration Superdex 200 (Pharmacia) équilibrée avec 5% d'acide acétique, puis élué à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant la protéine de fusion sont mélangées puis lyophilisées. Les différentes fractions ont été analysées par électrophorèses sur gel Tris-tricine et sur gel SDS-PAGE "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis" en utilisant la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les mélanges V/V, de tampon phosphate (0.1M citrate-phosphate, 5% SDS, 0.9% 2-mercaptoéthanol, 20% glycérol, pH 6.8) et des différents échantillons sont déposés sur le gel après chauffage à 100°C pendant 10min.

### *c) Analyse de la structure secondaire*

Pour déterminer le nombre de résidus cystéine qui pourraient être impliqués dans la formation de ponts disulfures au niveau intramoléculaire et intermoléculaire, une analyse de spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS "Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry" a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse Bruker ULTRAFLEX.

## **2. Détection des stylicines**

### *a) Préparation de sondes anticorps polyclonales anti-rstylicines*

Les sondes anticorps dirigées contre les stylicines recombinantes sont produites par immunisation de souris Balb/C. Dans une première étape, 1mg de chaque peptide et couplé à 1mg d'ovalbumine (Sigma) après activation avec l'EDC : "1 éthyl 3diméthylamino proponyl carbodiimide" (Pierce). Par la suite, 50µg du produit de couplage est injecté par voie sous-cutanée à des souris (de 4 semaines) à J0 avec l'adjuvant complet de Freund et à J15, J30 avec l'adjuvant incomplet de Freund. En fonction du degré de réponse immunitaire des souris, 500 µL de cellules tumorales (lymphome murin) à  $5.10^6$  cellules/mL (dilution en RPMI 1640 Gibco) sont injectées à J32 par voie intra péritonéale. En général 10 à 15 jours après l'injection des cellules, le liquide d'ascite produit est prélevé et clarifié par centrifugation (800g, 15min à 4°C). Les Immunoglobulines (IgG) de chaque sérum sont purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine G Sépharose (Gradifrac Pharmacia). La réactivité et la spécificité des IgG purifiées sont alors testées par ELISA indirect contre les 2 peptides recombinants.

### *b) Localisation des stylicines*

L'hémolymphe a été prélevée dans le sinus ventral de crevettes *L. stylirostris* de 20g (origine: Polynésie Française) et immédiatement additionnée d'un volume égal d'anticoagulant (Solution d'Alsever modifiée : 27mM de citrate de sodium, 336mM NaCl, 115mM de glucose, 9mM EDTA, pH 7). Les hémocytes sont obtenus dans le culot après centrifugation de l'hémolymphe à 800g pendant 15min à 4°C, remis en suspension et fixés dans une solution de paraformaldéhyde. Les hémocytes sont ensuite appliqués, sous la forme d'un spot par cytocentrifugation (900rpm, 10min), sur des lames L-Polylysine. Une étape de

saturation par du PBS/ Régilait à 5%, fait suite à une phase de perméabilisation membranaire de 10 min par une solution de Triton X-100 à 0.1%. Les lames, après 3 lavages, sont incubées une nuit à 4°C avec les IgG anti-rstylicines (2.3 µg/mL dilution en PBS/Régilait 0.5%). En parallèle des contrôles négatifs ont été réalisés par substitution des anticorps d'intérêts par des IgG irrelevantes de souris (contrôle) ou par le mélange obtenu après pré-incubation des IgG(s) de souris anti-rstylicines (3 µg/mL) avec de la rstylicine1 (10 µg/mL) (contrôle 2). Après trois lavages en PBS, une seconde incubation d'1 heure à température ambiante est effectuée avec un anticorps anti-IgG<sup>FITC</sup> de souris (0.5 µg/mL en PBS/Régilait 0.5%). Les lames sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, montées entre lame et lamelle dans une solution de Moviol et observées par microscopie confocale (Leica TCS 4D).

### **3. Propriétés biologiques**

#### *a) Tests antiprolifératifs*

##### *Tests antibactériens*

La capacité des rstylicines à inhiber la croissance des microorganismes est déterminée par la mesure des deux paramètres que sont la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et la CMB (Concentration Minimale bactéricide). La CMI correspond à la plus petite concentration de peptide capable d'inhiber la croissance de 90% des germes de l'inoculum initial. La CMB correspond à la plus petite concentration de peptide capable de tuer 99,99% des germes de l'inoculum initial.

Ces mesures ont été réalisées sur plusieurs bactéries parmi lesquelles : 4 souches Gram positif : *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 ; *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 ; *Bacillus subtilis* et *Aerococcus viridans* collection IBMC Strasbourg et 7 souches Gram négatif : *Escherichia coli* 363 ATCC 11775 ; *Salmonella typhimurium*, collection IBMC de Strasbourg ; *Vibrio penaeicida* AM 101 ; *V. splendidus* LGP32 et *V. nigripulchritudo* STn1 collection IFREMER ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* collection LIBRAGEN Toulouse.

Pour déterminer la CMI des bactéries, nous avons utilisé la technique de Hancock légèrement modifiée (Hancock *et al*, 1997). Les bactéries conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  sont repiquées et incubées sous agitation (150 rpm) dans le milieu LB, à  $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ . Les pré-cultures sont ensuite ensemencées sur des boîtes de LB Agar afin de procéder à l'isolement des colonies. Après 24 à 48 heures d'incubation, une seconde pré-culture est effectuée par repiquage d'une colonie dans 4 mL de LB, suivie d'une incubation dans les mêmes conditions pendant 16h. Ces cultures sont ensuite diluées au 1/50 et 1/100 dans du LB et remises à incuber pendant 2h. Cette étape est importante car les bactéries utilisées dans nos tests doivent être en phase exponentielle de croissance. Pour cela, la DO (à 600 nm) est contrôlée jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur comprise entre 0.1 et 0.2. La dilution correspondante retenue est alors diluée au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PB (Poor Broth), pour les bactéries cultivées dans du LB ou dans les milieux EPS ou dans le milieu de Zobell. Les tests antimicrobiens ont été effectués sur des microplaques stériles de 96 puits. A 10  $\mu\text{L}$  des dilutions progressives des peptides sont additionnés 100  $\mu\text{L}$  de chaque suspension bactérienne. Un contrôle négatif est réalisé en substituant les 10  $\mu\text{L}$  de peptides par de l'eau MilliQ stérile. Une fois ensemencées, les plaques sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24h et sous agitation.

Pour déterminer la CMB, 10  $\mu\text{L}$  du contenu des puits tests (mélange de bactéries et du peptide) sont prélevés de la microplaque ayant servi à déterminer la CMI. Ces puits correspondent à ceux où la CMI a été notée, ainsi que les deux précédents (dont les concentrations finales en peptides sont plus élevées). Ces 10  $\mu\text{L}$  sont additionnés par 90  $\mu\text{L}$  d'eau MilliQ stérile, et déposés sur des boîtes de Pétri contenant soit : LB/Agar, ou EPS/Agar, ou Zobell/Agar (selon la souche bactérienne analysée), ce mélange est étalé à l'aide de billes de verre stériles. Les boîtes de Pétri sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. La lecture est réalisée le lendemain. L'absence de colonies permet de conclure que le peptide est bactéricide à la concentration peptidique donnée, dans le cas contraire, il est qualifié de bactériostatique.

### *Tests antifongiques*

Ces mesures ont été réalisées sur plusieurs souches de champignons filamenteux et de levures parmi lesquels : *Fusarium oxysporum* collection INRA St Christol-lez-Alès, *Botrytis cinerae* et *Penicillium spp.* Collection IUT Département de Génie Biologique Montpellier, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa* et *Candida albicans* collection LIBRAGEN Toulouse.

Pour déterminer la CMI des champignons et les levures, nous avons utilisé la technique de Fehlbau (Fehlbau et al, 1994). Dans ce cas, les dilutions des micro-organismes ne sont pas nécessaires. Il suffit de prélever 10 µL de spores de chaque espèce étudiée que l'on ajoute à 8 µL de tétracycline (12.5 mg/mL) et à 10 mL de 1/2 PDB (Potatoes Dextrose Broth). Les peptides ont été testés à des concentrations finales comprises entre 1 et 100 µM. Les tests antifongiques ont été réalisés sur des microplaques stériles de 96 puits. Une fois ensemencées, elles sont incubées à 25°C à l'obscurité, sous atmosphère humide pendant 48h. La lecture de la CMI est identique à celle effectuée pour les tests antibactériens.

#### *Test anti-tumoral*

La technique utilisée pour mesurer les activités anti-tumorales des rstylicines repose sur le même principe que pour la détermination des CMI. Les tests sont réalisés en triplets dans des plaques stériles 96 puits (IWAKI). A des dilutions successives de chaque peptide (progression géométrique 1/2) sous un volume de 100 µL sont additionnées 100 µL d'une suspension cellulaire (myélome murin P3-X63-Ag8) à raison de  $25 \cdot 10^3$  cellules/mL. Des témoins positifs, représentant 100% de prolifération cellulaire, constitués par 100 µL de milieu additionnés de 100 µL de la suspension cellulaire sont également réalisés. Les plaques sont placées dans un incubateur à CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide à 37°C pendant 7 jours. Au terme de l'expérience un dénombrement des cellules viables (technique d'exclusion au bleu trypan) est effectué sous microscope à l'aide de la cellule hématimétrique de Thoma. Les résultats obtenus sont donnés en % du nombre de cellules viables.

#### *b) Tests de « Binding »*

##### *A la paroi des bactéries Gram(-)*

Pour mettre en évidence la capacité des peptides rstylicines de se lier à la paroi de la bactérie *V. penaeicidae*, nous avons mis au point un test de fluorescence dont le protocole est le suivant: les bactéries *Vibrio penaeicida* AM101 ont été lavées deux fois pour éliminer le milieu de culture (1000rpm, 30min à température ambiante). Les cellules sont mises en suspension dans 1 mL de PBS ( $1 \cdot 10^7$  cellules/mL) contenant l'un des peptides recombinants à la concentration de 10 µg/mL. Un contrôle négatif est réalisé par substitution du peptide par du PBS. Ce mélange est incubé pendant 2 heures à 4°C. Après 3 lavages avec du PBS, les cellules sont incubées avec les IgG anti-rstylicines (10 µg/mL dilution en PBS/Régilait 0.5%)

pendant 1h00 à 37°C. Après trois nouveaux lavages au PBS une seconde incubation avec un anticorps anti-IgG<sup>FITC</sup> de souris (0.5 µg/mL en PBS/Régilait 0.5%) est réalisée pendant 1 heure à 37°C. Les cellules après avoir été lavées trois fois avec du PBS, sont placées entre lame et lamelle avec de la glycérine tamponnée et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

#### Au LPS des bactéries Gram(-)

Pour la mise en évidence d'une liaison des rstylicines aux LPS présents dans les parois des bactéries Gram(-), nous avons mis au point un test ELISA en utilisant les IgG anti rstylicines préparées précédemment. Des plaques ELISA NUNC Maxisorp à fond plat (96 puits) sont "coatées" par 50 µL de LPS à la concentration de 5 µg/mL (dilution en tampon 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20mM EDTA, Ph 9.6) pendant 3 heures à 50°C. Les LPS testés proviennent de deux souches bactériennes : *Escherichia coli* 0127/B8 (Sigma) et *Vibrio penaeicida* AM 101 (extraction réalisée au laboratoire selon la technique décrite par Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959). Les plaques sont ensuite lavées 3 fois en tampon PBS et bloquées avec 5% de BSA (W/V) pendant 1 heure à 37°C. Après deux lavages, on incube les LPS avec différentes concentrations de rstylicines (de 0 à 16.8µM) pendant 1heure à température ambiante (en triplets). Des contrôles négatifs sont réalisés en substituant les peptides par le tampon de dilution (PBS/BSA 0.1%). Les plaques sont lavées comme précédemment et incubées avec 50 µL d'IgG anti-rstylicine à la concentration de 10 µg/mL pendant 2 heures à 37°C. Après 3 lavages on ajoute l'anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (Pierce-Interchim) à la dilution de 1/5000 soit 0.2 µg/mL et on incube la plaque 1 heure à 37°C. Après 3 nouveaux lavages, la fixation des anticorps est révélée par addition d'orthophényl-ène diamine en solution dans le tampon 0.1M acide citrique, 0.1M acétate de sodium, pH 5.4 contenant 0.33% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est stoppée par ajout de 50 µL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N et la densité optique mesurée à 490nm à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan Ex Labsystems. La constante apparente de dissociation K<sub>d</sub> et le maximum de liaison A<sub>max</sub> ont été calculés avec Kaleidagraph de Windows par utilisation de la formule :  $A = A_{max}[L]/(K_d + [L])$  ou A est l'absorbance à 490 nm et [L] la concentration du ligand.

### ***c) Agglutination des bactéries Gram(-)***

La capacité des rstylicines à favoriser l'agglutination des bactéries *V. penaeicida* a été mise en évidence par le test suivant : 20  $\mu\text{L}$  d'une suspension fraîche de *V. penaeicida* à  $1.10^8$  cellules/mL a été additionnée à 10  $\mu\text{L}$  de solution de PBS contenant 160 $\mu\text{M}$  de peptide. Le mélange a été incubé pendant 1heure à 37°C et l'agglutination observée à l'aide d'un microscope optique. Les contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant les peptides, par un peptide irrelevant à la même concentration que les rstylicines ou par le diluant du peptide, ici le PBS.

### **d) Test de perméabilisation des membranes microbiennes**

La capacité de perméabilisation des membranes des micro-organismes par les stylicines recombinantes a été déterminée par la mesure de la fluorescence en utilisant le réactif SYTOX<sup>®</sup> green (invitrogen). Le principe de ce test est de mesurer la fluorescence émise par cette substance lorsqu'il se lie aux acides nucléiques. En effet, ce produit ne peut pénétrer dans le cytoplasme des cellules et se lier à l'ADN, que si la membrane plasmatique se trouve dégradée. Ce test de perméabilisation des membranes par les stylicines recombinantes a été réalisé sur le champignon filamenteux *F. oxysporum*. Une pré incubation permettant la croissance du champignon a été réalisée dans des microplaques stériles 96 puits à fond noir. Dans chaque puits 10  $\mu\text{L}$  de spores de *F. oxysporum* (dilution au 1/1000<sup>ème</sup>) sont additionnées à 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture 1/2 PDB (Potatoes Dextrose Broth) complémenté de Tétracycline (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les plaques sont incubées à 25°C, à l'obscurité et sous atmosphère humide pendant 72h. On effectue par la suite, une seconde incubation avec 10  $\mu\text{L}$  de SYTOX<sup>®</sup> green (5 $\mu\text{M}$ ) et 10  $\mu\text{L}$  de rstylicines à des concentrations finales comprises entre 0.2 et 6.4  $\mu\text{M}$  ou de PBS (contrôle négatif). Les plaques sont ensuite placées dans un spectrophotomètre automatique (TECAN infinite M 200). La fluorescence émise à 538 nm suite à une excitation à 488 nm, est mesurée toutes les 15 min pendant 180 minutes. Les résultats obtenus sont donnés en absorbance et, sont proportionnels à la quantité d'ADN marqué et donc de SYTOX<sup>®</sup> green ayant traversé la membrane du champignon.

### *e) Exploration de l'hémostase*

Pour la mise en évidence d'une activité anticoagulante des rstylicines, nous avons étudié les effets de ces substances sur les deux voies (exogène et endogène) de la coagulation plasmatique humaine: le Temps de Céphaline Kaolin TCK (voie endogène), le Temps de Quick TQ (voie exogène) ainsi que, la phase finale de l'hémostase représentée par le temps de Thrombine TT. Dans tous les cas, les tests sont de tests chronométriques qui consistent à mesurer le temps d'apparition du caillot en présence de rstylicines comparativement à un contrôle négatif ou les rstylicines sont remplacées par du PBS.

#### *Temps de Céphaline Kaolin (TCK)*

Dans un tube après introduction de 100  $\mu\text{L}$  de plasma (citraté), on dépose 10  $\mu\text{L}$  de peptides (dilués en PBS) et 100  $\mu\text{L}$  du mélange céphaline/kaolin. L'ensemble est pré-incubé à 37°C. Au temps 2 min (T0), on ajoute 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (0.025 M), le chronomètre est déclenché. A l'apparition du caillot de fibrine on stoppe le chrono et le temps est noté.

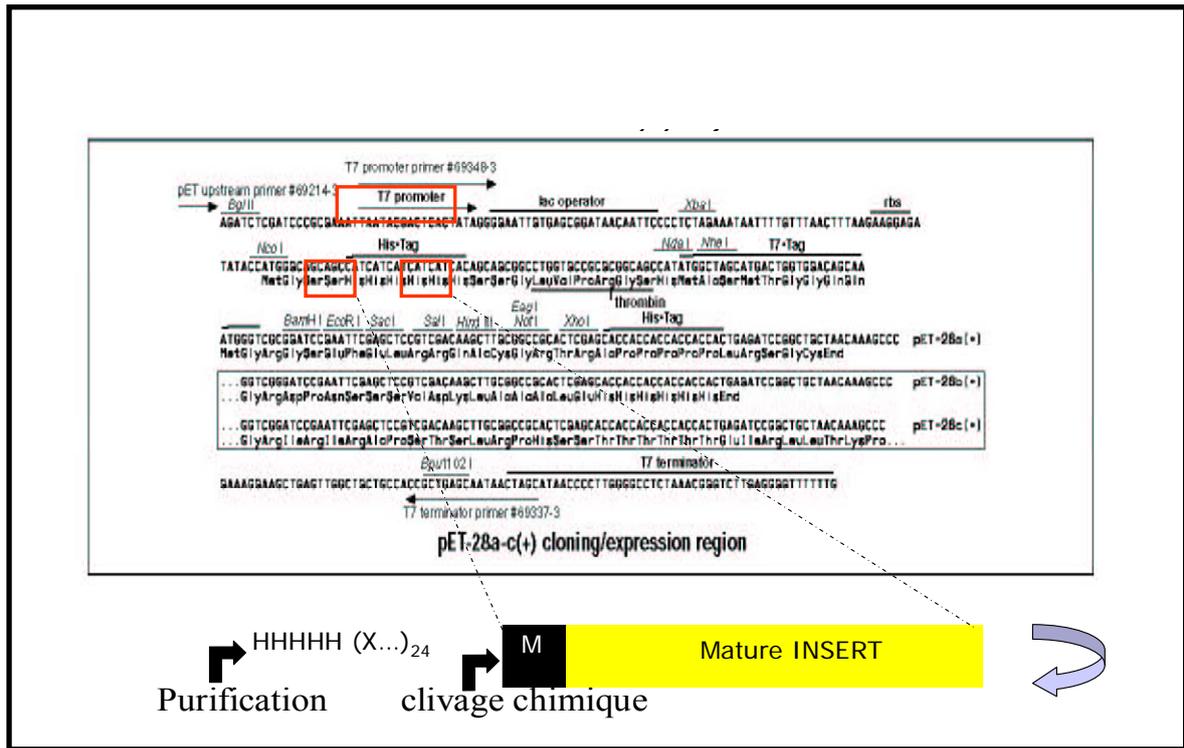
#### *Temps de Quick (TQ)*

Le mélange, composé de 100  $\mu\text{L}$  de plasma citraté, 10  $\mu\text{L}$  de peptides (dilution en PBS) et 200  $\mu\text{L}$  de thromboplastine tissulaire, est pré-incubé à 37°C. Au temps 4 min (T0), ajoutez 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (0.025 M). On procède comme précédemment, à l'apparition du caillot de fibrine le chrono est stoppé.

#### *Temps de thrombine (TT)*

Il s'agit en fait du temps de coagulation à 37°C, d'un plasma citraté, en présence d'un excès de thrombine. Sur du plasma dilué\* (100  $\mu\text{L}$ ) on additionne 10  $\mu\text{L}$  de rstylicines et 100 $\mu\text{l}$  de Thrombine. Les modalités expérimentales sont les mêmes que précédemment.

- La dilution du plasma au 1/2 et au 1/10<sup>ème</sup> est nécessaire pour la désensibilisation du test et sa réalisation.



**Figure 1.** Représentation schématique de la stratégie de clonage utilisée pour le clonage des défenses par Ouelette et Shirafuji (2003).

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMQGRGSMSSFSPPRPPGWGPPCVQQPCPKCPYDDYK  
PTCDKFPKCEECPHISIGCECGYFSCECPKPVCEPCESPIAELIKKGGYKG

**Figure 2.** Séquence protéique de la protéine de fusion correspondant à la rstylicine1 issue de la traduction de la séquence nucléotidique obtenue après séquençage du plasmide pET28b (+) recombinant.

**En grisé :** séquence de la rstylicine1.

**En gras :** His-tag (purification) et Met (clivage chimique)

## **B. Résultats**

### **1. Production des stylicines recombinantes en système *E. coli***

Compte tenu des difficultés d'obtenir de l'hémolymphe de crevettes *L. stylirostris* et d'avoir à notre disposition les stylicines 1 et 2 natives, nous avons décidé de produire ces molécules chez *E. coli* et d'étudier les propriétés biologiques de ces formes recombinantes des deux peptides.

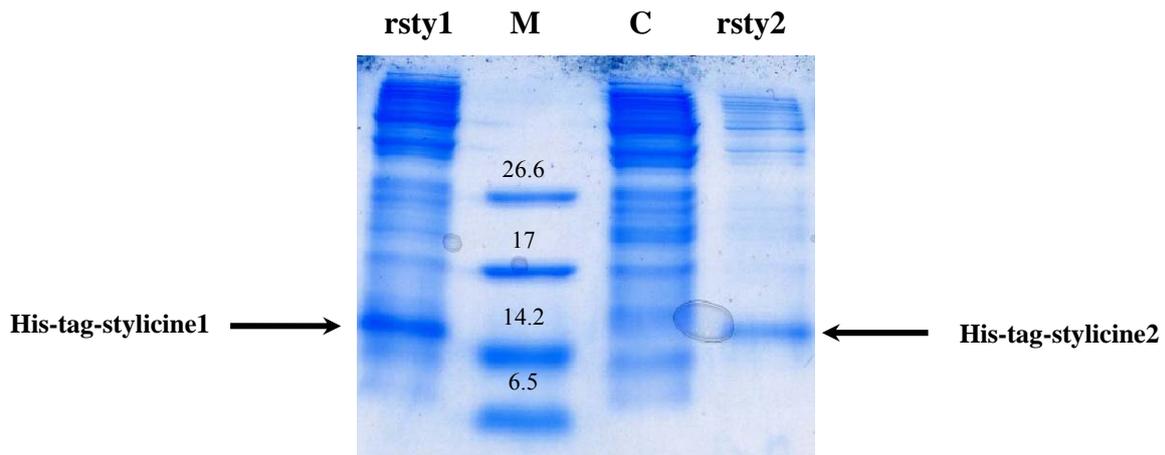
#### ***a) Stratégie de clonage***

La stratégie de clonage utilisée pour produire les stylicines1 et 2 recombinantes s'inspire de celle développée par Ouelette (Ouelette et Shirafuji, 2003) pour l'étude des défensines (Figure 1). Brièvement, pour chaque peptide la séquence signal a été remplacée par une extrémité poly-histidine (His-tag) du vecteur pET-28b (+) afin de faciliter la purification. La protéine de fusion obtenue après clonage dans le plasmide pET-28b (+), contient une extrémité poly-histidine en N-terminal (purification), un espaceur d'environ 20 acides aminés, une méthionine (nécessaire au clivage) et le peptide en partie C-terminale (Figure 2).

#### ***b) Expression en système hétérologue *E. coli****

Les protéines de fusion His-tag-stylicine1 (Figure 3) et His-tag-stylicine2 ont été exprimées dans les cellules d'expression *E. coli* BL21(DE3) *Rosetta* via le plasmide pET-28b (+) après une induction par l'IPTG (Figure 3).

Des essais d'optimisation de ces expressions ont été réalisés. Ils ont consisté à faire varier les concentrations d'IPTG de 0.1 à 1.0 mM et, les temps d'induction entre 3 et 16 heures. Les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de différences significatives du niveau d'expression des protéines de fusion. Toutes les inductions ont donc été réalisées arbitrairement par addition de 0.5mM d'IPTG sur une culture en phase exponentielle de croissance (DO = 0.8 U) pendant 3 heures.



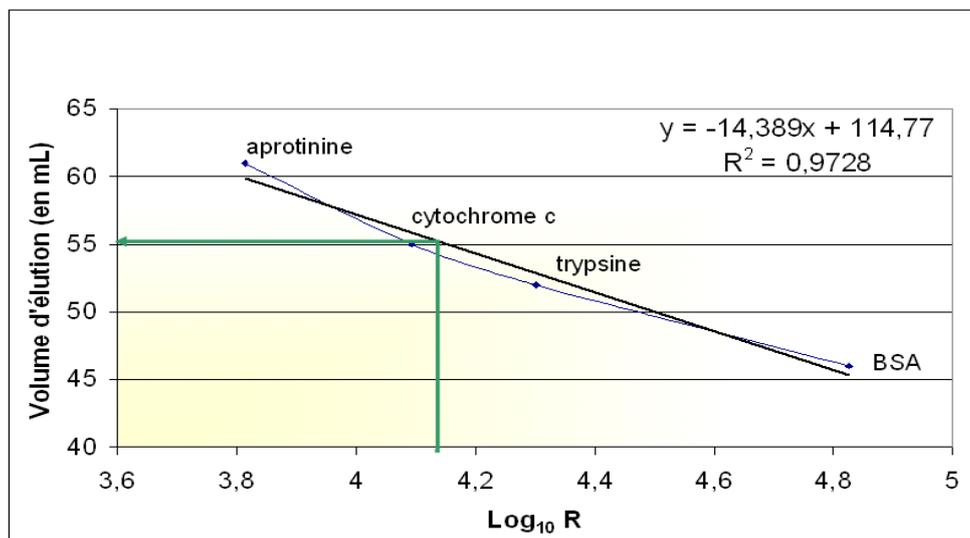
**Figure 3.** Electrophorégrammes sur gel Tris-tricine des protéines intracellulaires d'*E. coli* (DE3) *Rosetta* après induction de l'expression avec 0.5mM d'IPTG pendant 3heures.

**rsty1** : clone ayant inséré le plasmide Pet28b(+) recombinant correspondant à la stylicine1

**rsty2** : clone ayant inséré le plasmide Pet28b(+) recombinant correspondant à la stylicine2

**C** : contrôle non induit

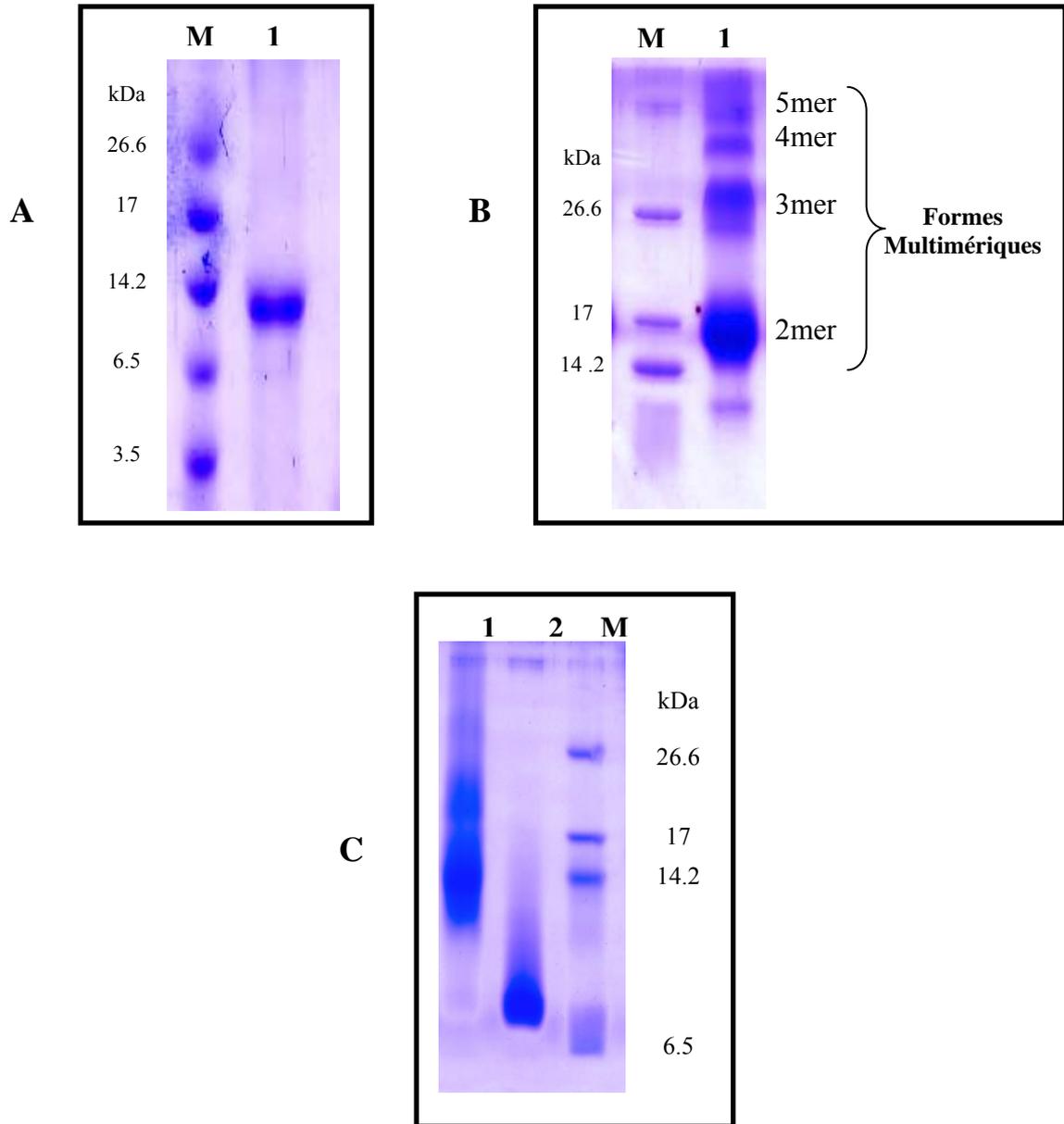
**M** : Marqueurs de taille (kDa)



**Figure 4.** Courbe d'étalonnage de la chromatographie sur gel-filtration Superdex 200.

Les marqueurs utilisés sont : la BSA ("Bovine Serum Albumine" : 67 kDa), la Trypsine (20 kDa), le cytochrome C (12,4 kDa) et l'Aprotinine (6,5 kDa) dilués en acide acétique 5%. Le débit de sortie de colonne est de 1 mL/min et la vitesse d'enregistrement est fixée à 2 mm/min





**Figure 7.** Electrophorégrammes sur gel Tris-tricine des différentes formes de stylicines recombinantes purifiées.

- A<sub>1</sub>** : Monomère de la rstylicine1
- B<sub>1</sub>** : Multimères de la rstylicine1
- C<sub>1</sub>** : Multimère de la rstylicine2
- C<sub>2</sub>** : Monomère de la rstylicine2
- M** : Marqueurs de taille (kDa)

### ***c) Purification***

Les deux stylicines recombinantes ont été purifiées de la même manière par un processus en cinq étapes distinctes.

La première étape a consisté à purifier les protéines de fusion His-tag-stylicines par chromatographie d'affinité. L'extrémité polyhistidine des His-tag-stylicines se lie à la résine TALON® "Metal Affinity Resins" par affinité avec l'ion métallique  $\text{Co}^{2+}$ . Après plusieurs lavages le peptide est décroché en abaissant le pH du milieu.

Dans la deuxième étape, les protéines de fusion ont été séparées en fonction de leur taille, par chromatographie de gel filtration Superdex 200. Cette chromatographie permet de séparer des protéines de tailles comprises entre 5 000 à 100 000 Daltons (Figure 4).

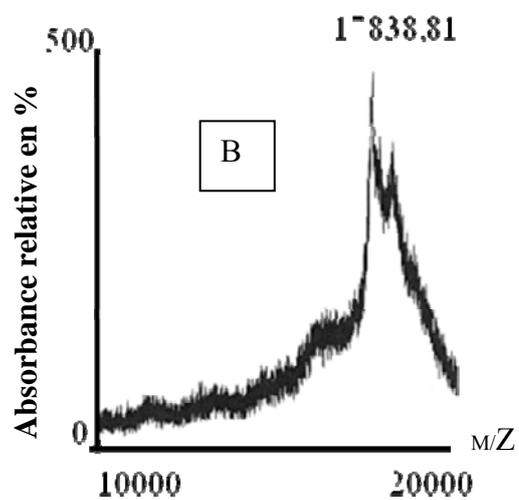
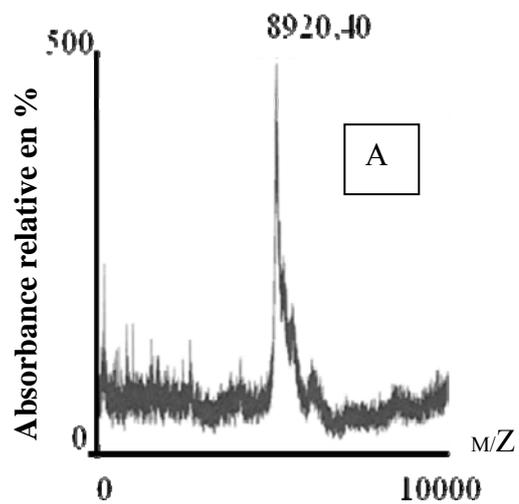
La troisième étape a consisté à couper les protéines de fusion His-tag-stylicine1 et His-tag-stylicine2 au niveau des résidus Met par le bromure de cyanogène comme le montre le schéma de la figure 5.

Une renaturation des peptides recombinants par la méthode de Wu (Wu *et al*, 2003), représente la quatrième étape

Enfin, dans une cinquième étape, les différentes formes de rstylicines ont été séparées (en fonction de leur taille) par gel filtration Superdex 100 (Figure 6).

### ***d) Structure bidimensionnelle***

L'analyse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) des rstylicine1 et rstylicine2 purifiées après renaturation, montre que les deux stylicines recombinantes purifiées existent sous plusieurs formes, avec toutefois deux formes prédominantes, une forme monomérique et une forme dimérique (Figure 7).



**Figure 8.** Analyses spectrales (MALDITOF-MS) obtenues pour les deux formes de la rstylicine1.

- A** : Monomère
- B** : Homodimère

L'analyse en spectrophotométrie (MALDI-TOF-MS) de la masse molaire de la forme monomérique de la rstylicine1 a été mesurée à 8920.40 Daltons (Figure 8A). Si l'on compare cette masse par rapport à la masse théorique de la rstylicine1 8932.20 Daltons, on constate une perte de masse de 11, 80 Daltons. Cette différence pourrait correspondre à la perte de 12 hydrogènes provenant de 12 des treize résidus cystéines du fait de leur implication dans la formation de six ponts disulfures.

La masse molaire de la forme dimérique de la rstylicine1 a été mesurée à 17838 Daltons (Figure 8B). Sachant que la masse théorique de 2 monomères de la rstylicine est de 17864.40 Daltons, on constate alors une perte de masse de 25.6 Daltons. Cette perte de masse pourrait correspondre à la perte 24 hydrogènes provenant de 24 résidus cystéines impliquées dans la formation de douze ponts disulfures intramoléculaires et 2 résidus cystéines impliquées dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire.

## **2. Localisation des stylicines**

### ***a) Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre les rstylicines.***

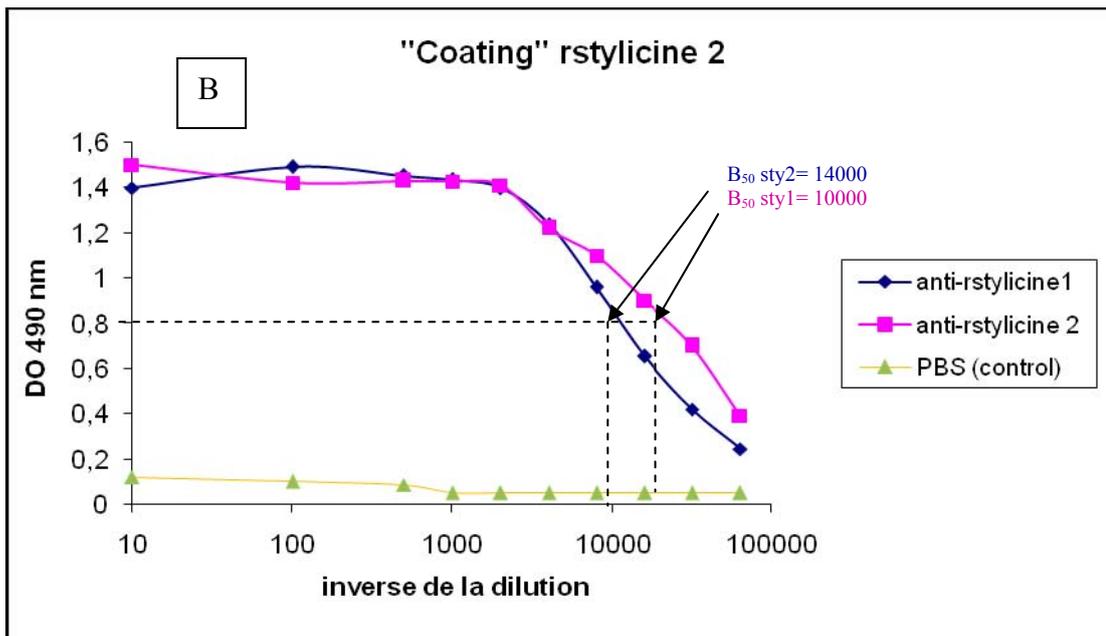
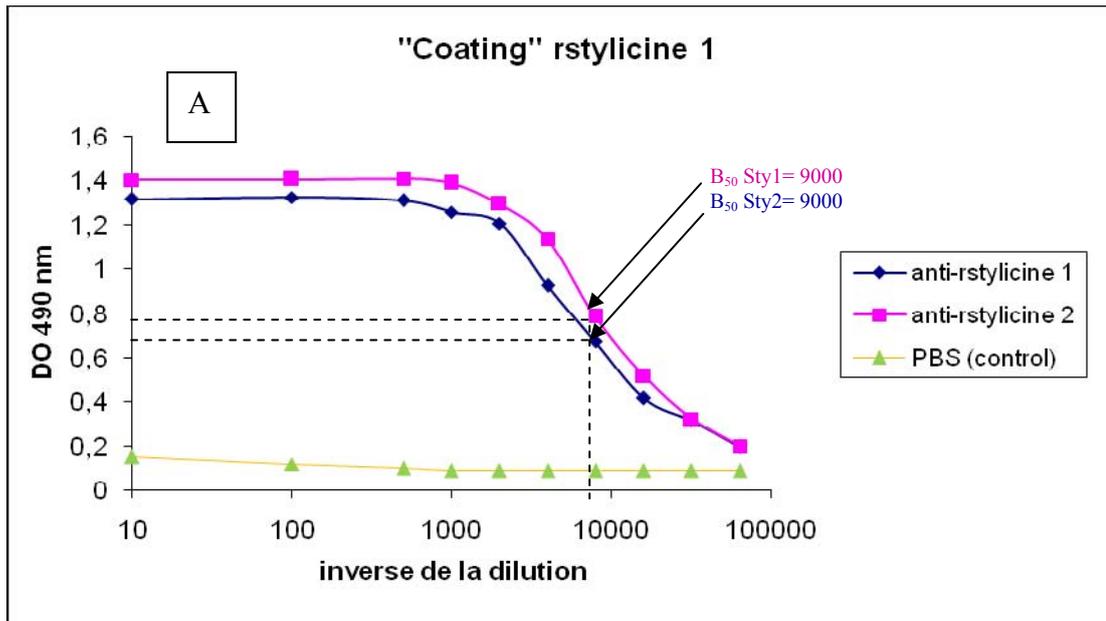
#### *Production des anticorps*

Des sondes anticorps polyclonales dirigées contre les rstylicines 1 et 2 ont été produites par immunisation de souris Balb C. Deux sondes polyclonales (une pour chaque immunogène) ont été retenues :

- contre la rstylicine1 : anti-rstylicine1.
- contre la rstylicine2 : anti-rstylicine2.

#### *Réactivité et spécificité des anticorps*

La réactivité et la spécificité des deux sondes anticorps à été testée par ELISA (indirect). Que les plaques soient "coatées" par la rstylicine1 ou 2, les deux types d'immunoglobulines produites contre la rstylicine1 ou contre la rstylicine2 donnent



**Figure 9.** Réactions homologues et hétérologues des deux types d'anticorps produits.

**A :** "Coating" avec la rstylicine1.

**B :** "Coating" avec la rstylicine2.

$B_{50} \text{ sty1}$  : B50% de la stylicine1

$B_{50} \text{ sty2}$  : B50% de la stylicine2

par ELISA (indirect) des valeurs des B50% sensiblement identiques à savoir des valeurs comprises entre 9000 pour la rstylicine1 et 10000 à 14000 pour la rstylicine2 (Figures 9A et 9B). Ce résultat confirme l'existence d'une réaction croisée des deux types d'immunoglobulines et donc une spécificité large des 2 anticorps contre les 2 rstylicines. Cette conclusion n'est pas surprenante et semble logique, étant donné l'existence d'une homologie de l'ordre de 81% entre les deux peptides.

Sur la base de ces résultats, nous utiliserons pour la suite de ce travail les anticorps anti-rstylicine1 que nous renommons anticorps anti-rstylicines (ou IgG anti-rstylicines).

### ***b) Localisation des rstylicines dans les hémocytes***

Les tests d'immunofluorescence effectués sur des préparations d'hémocytes fixées de crevettes avec des anticorps anti-rstylicines, mettent en évidence que toutes les populations d'hémocytes sont identifiées par cet anticorps. Aussi bien, les cellules hyalines que les cellules granuleuses présentent des signaux de fluorescence intense, localisés dans des petits granules (également au niveau des hyalinocytes) présents dans le cytoplasme de ces hémocytes (Figures 10A). Aucune fluorescence n'a été observée sur les lames contenant des hémocytes incubés avec l'anticorps irrelevant IgG2a de souris (anti-IgM de *D. labrax*) (Figure 10B) ou l'anticorps anti-rstylicines pré-incubé avec le peptide rstylicine1 (Figure 10C).

## **3. Activités biologiques sur les bactéries.**

### ***a) Activités antibactériennes***

Sur 4 souches de bactéries Gram (+) et 7 souches de bactéries Gram (-), nous avons déterminé la CMI des formes monomérique et dimérique de la rstylicine1 et du mélange des différentes formes de la rstylicine2.

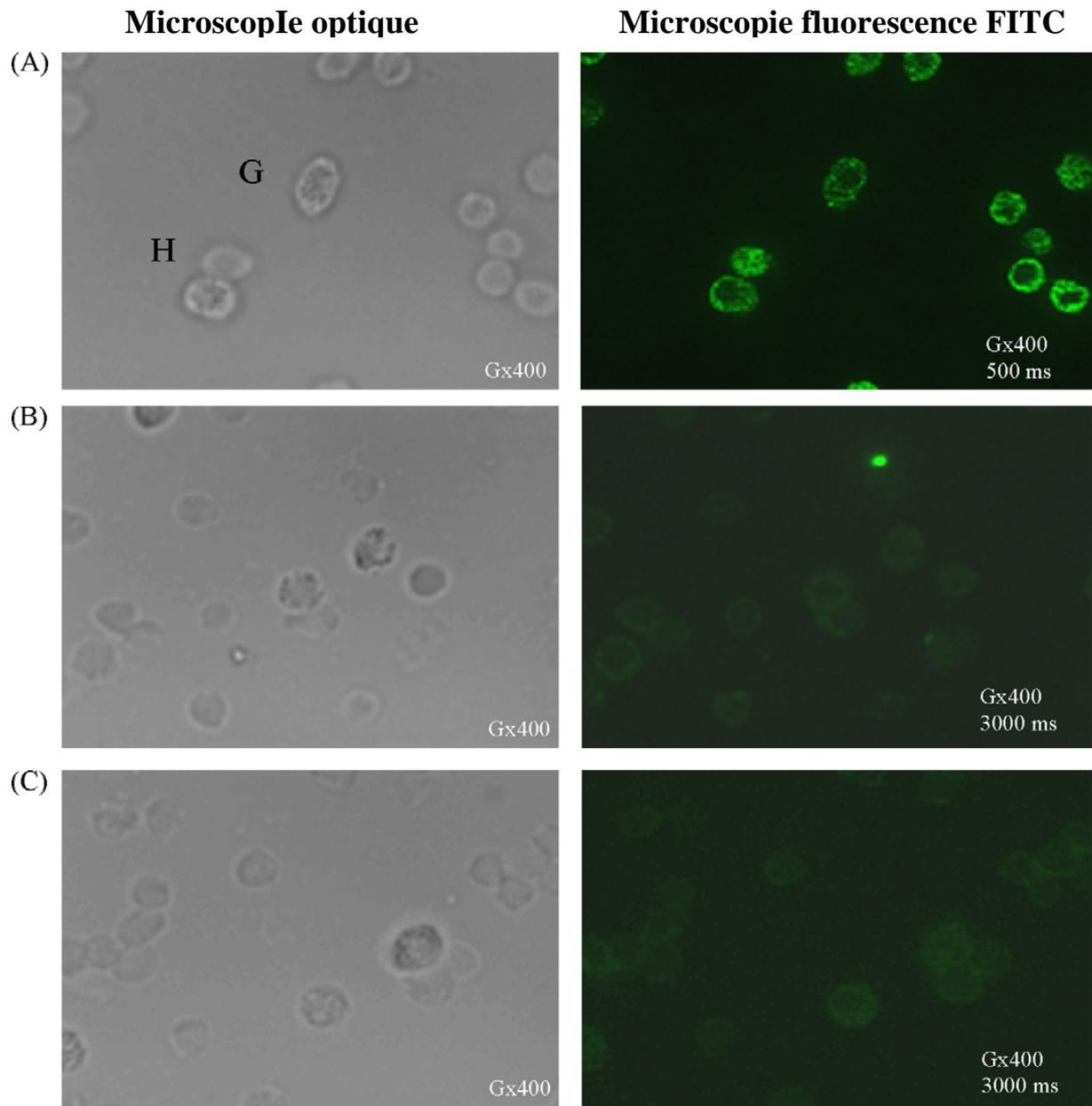
Le monomère de la rstylicine1 a montré une activité antimicrobienne faible uniquement vis à vis des trois espèces de Vibrios. Les valeurs de CMI sont comprises entre 40 $\mu$ M et 80 $\mu$ M (Tableau 2). Aucune activité n'a été mise en évidence pour les autres espèces bactériennes Gram-négatif ainsi que, sur les bactéries Gram (+) malgré des concentrations en peptides plus élevées de l'ordre de 160 $\mu$ M.

**Tableau 2.** Activités antibactériennes des rstylicines 1 et 2. Les activités sont représentées par les valeurs des concentrations minimales inhibitrices en  $\mu\text{M}$  (CMI).

		CMI ( $\mu\text{M}$ )			
		rstylicine1		rstylicine2	
		Monomère	Dimère	Mélange monomère, dimère	
Bactéries Gram(+)	{	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	>160	>160	>160
		<i>Staphylococcus aureus</i>	>160	>160	>160
		<i>Bacillus subtilis</i>	>160	>160	>160
		<i>Aerococcus viridans</i>	>160	>160	>160
Bactéries Gram(-)	{	<i>Enterococcus faecalis</i>	>160	>160	>160
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>160	>160	>160
		<i>Escherichia coli</i> 363	>160	>160	>160
		<i>Salmonella typhimurium</i>	>160	>160	>160
		<b><i>Vibrio splendidus</i> LGP32</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	>160
		<b><i>Vibrio penaeicida</i>*</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	>160
<b><i>Vibrio nigripulchritudo</i>*</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	>160		

Les microorganismes sensibles sont présentés en gras.

\*Les pathogènes naturels de la crevette *L. stylirostris*.



**Figure 10.** Immunolocalisation des stylicines dans les hémocytes de *L. stylirostris*.

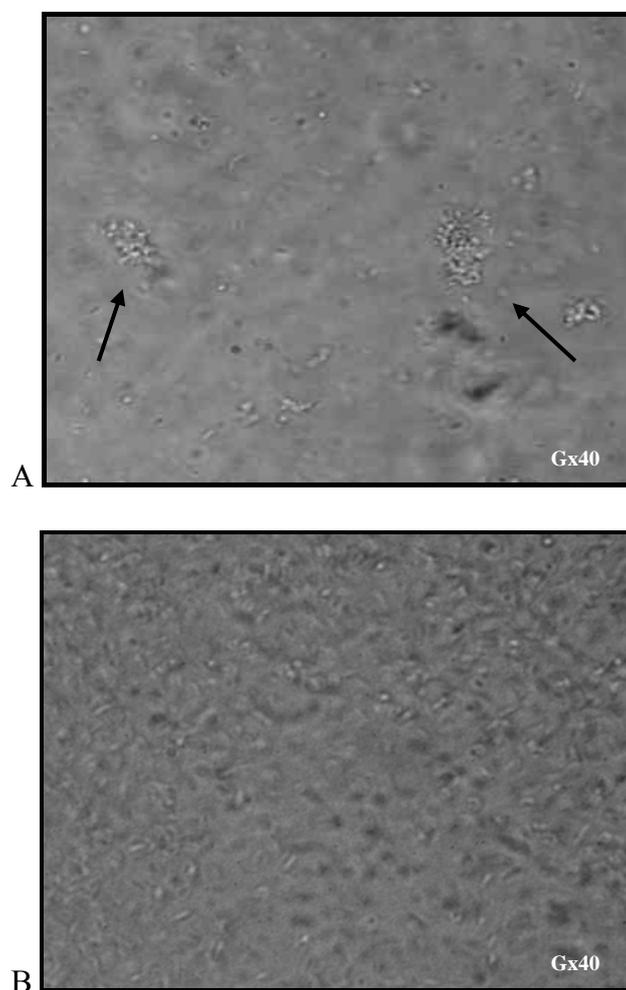
**A** : hémocytes + anti-rstylicines

**B** : hémocytes + anticorps irrelevant, IgG2a anti-IgM de *D. labrax*.

**C** : hémocytes + anti-rstylicines pré-incubés avec les anti rstylicines.

Hémocyte granuleux (**G**)

Hémocyte hyalin (**H**)



**Figure 11.** Observation au microscope photonique de l'agglutination de *V. penaeicida*, AM101 par le peptide rstylicine1.

**A** : En présence de 160 $\mu$ M de rstylicine1.

**B** : Sans rstylicine1 (négative control).

La forme dimérique de la rstylicine1 présente des activités antimicrobiennes similaires à son monomère, un effet bactériostatique à partir de 20  $\mu\text{M}$  sur les trois espèces de *Vibrio* testés à été noté.

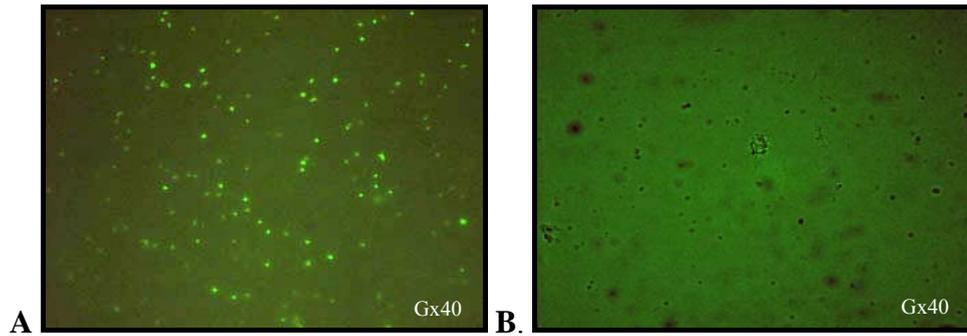
Par comparaison à la rstylicine1, malgré des concentrations élevées en peptide de l'ordre de 160  $\mu\text{M}$ , aucune activité antibactérienne de la rstylicine2 (monomère ou forme multimérique) n'a été mise en évidence sur les 11 souches bactériennes testées (Tableau 2).

### ***b) Effets bactériostatiques.***

Pour déterminer la nature de l'inhibition de croissance observée sur *V. penaeicidae* par la rstylicine1, nous avons réalisé un test CMB (cf. Matériel et méthodes) et étalés sur des boîtes Agarose/Zobell, le contenu des 3 puits correspondant aux concentrations en peptides 40, 80 et 160 $\mu\text{M}$  obtenus lors de la réalisation des CMI. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on observe une prolifération bactérienne de plus en plus faible jusqu'à la concentration de 160 $\mu\text{M}$ . Ce résultat indique qu'aux concentrations testées, la rstylicine1 n'exerce pas d'effet bactéricide sur *V. penaeicida* mais bien un effet bactériostatique.

### ***c) Agglutination***

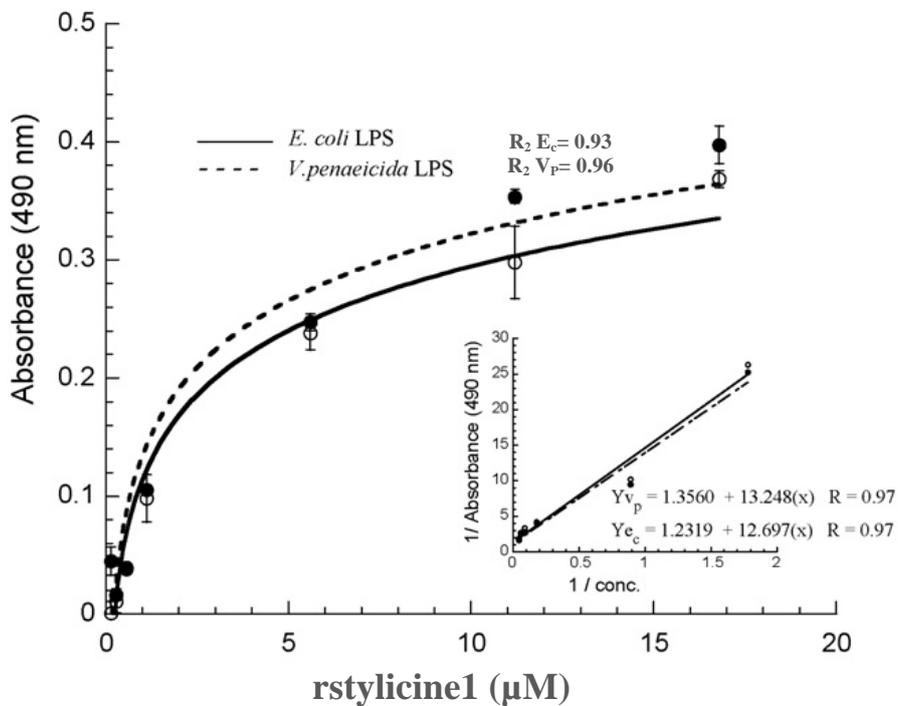
Afin de déterminer si l'effet bactériostatique de la rstylicine1 sur les bactéries du genre *Vibrio* pouvait être du à une agglutination de ces dernières, nous avons incubé *V. penaeicida* LGP32, avec le peptide à la concentration de 160  $\mu\text{M}$  (4 fois la CMI). A titre de contrôle, des bactéries ont été incubées pendant 1h00 sans peptide. L'observation des bactéries au microscope optique montre une agglutination de *V. penaeicida* en présence de rstylicine1 (Figure 11). Ce résultat confirme cette propriété originale particulière de la rstylicine1.



**Figure 12.** Immunofluorescence de *V. penaeicida* AM101 lié à la rstylicine1 par utilisation des anti-rstylicines

**A:** *V. penaeicida* + rstylicine1 + anti-rstylicines.

**B:** *V. penaeicida* + anti-rstylicines (contrôle négatif).



**Figure 13.** Représentations graphiques des courbes de fixations de la rstylicine1 aux LPS d'*E. coli* et de *V. penaeicida*. Chaque point expérimental est la moyenne de trois mesures individuelles. Dans le second graphe, les droites sont les résultats des calculs effectués pour un site de fixation ( $R^2 = 0.97$ ).

(-●-) : LPS de *E. coli*

(-○-) : LPS de *V. penaeicida*

#### ***d) Fixation au LPS de la paroi des bactéries Gram (-)***

La rstylicine1 est-elle capable de se fixer à la surface des bactéries Gram (-) par l'intermédiaire du LPS ? La réponse à cette question est donnée par les résultats des 2 tests suivants :

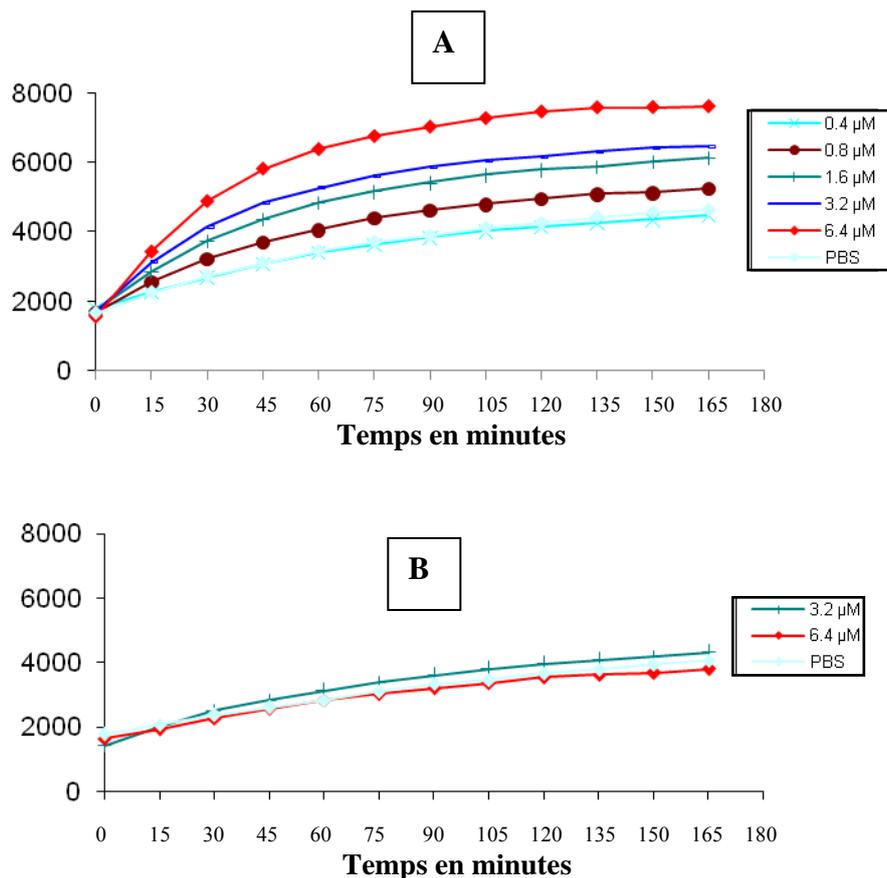
Dans un premier temps, comparativement à un contrôle négatif (bactéries sans peptide), des tests d'immunofluorescence réalisés sur des préparations de *V. penaeicidae* pré-incubées avec la rstylicine1 (cf. Matériels et méthodes), montrent que les bactéries apparaissent fluorescentes et sont recouvertes par les anticorps anti-rstylicines qui ont fixé le peptide. (Figures 12A et 12B).

Pour mieux préciser l'origine de la liaison peptide/bactérie, à savoir la présence du LPS dans la paroi des bactéries Gram(-), nous avons mis au point un test ELISA dans lequel les LPS de *V. penaeicidae* et d'*E. coli* (O127:B8) ont été déposés sur des microplaques. Les résultats obtenus montrent que le peptide rstylicine1 se fixe aux deux LPS (Figure 13). L'analyse statistique des résultats, régression non linéaire (modèle à un seul site de fixation), démontre que la rstylicine1 a une capacité de fixation élevée aux LPS de *V. penaeicida* et d'*E. coli* avec des constantes de dissociation (Kd) de 0.096 $\mu$ M et de 0.102 $\mu$ M, respectivement.

**Tableau 3.** Activités antifongiques des rstylicines 1 et 2. Valeurs des CMI en  $\mu\text{M}$ .

		CMI ( $\mu\text{M}$ )		
		rstylicine1		rstylicine2
		Monomère	Dimère	Mélange monomère, dimère
Champignons et levures	<i>Fusarium oxysporum</i> *	<b>2.5</b>	<b>1.25</b>	>100
	<i>Penicillium spp</i>	>100	>100	>100
	<i>Botrytis cinerae</i>	>100	>100	>100
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>100	>100	>100
	<i>Neurospora crassa</i>	>100	>100	>100
	<i>Candida albicans</i>	>100	>100	>100

\* Pathogène naturel de la crevette *L. stylirostris*.



**Figure 14.** Représentations graphiques en fonction du temps de l'internalisation du SYTOX<sup>®</sup> green dans les cellules de *F. oxysporum*

**A** : En présence de concentrations croissantes de rstylicine1.

**B** : En présence de concentrations croissantes de rstylicine2.

#### **4. Activités biologiques sur les champignons**

##### **a) *Activité antifongique***

Nous avons déterminé la CMI des formes monomérique et dimérique des deux stylicines recombinantes 1 et 2 sur 6 souches de levures et de champignons.

Le monomère de la rstylicine1 présente une activité antifongique exclusivement sur *F. oxysporum* à une concentration de 2.5  $\mu\text{M}$  (Tableau 3). Malgré des concentrations en peptides élevées de l'ordre de 100 $\mu\text{M}$ , aucune activité n'a pu être mise en évidence sur *Penicillium sp*, *B. cinerae*, *A. fumigatus*, *N. crassa*, ou *C. albicans*.

La forme dimérique de la rstylicine1 présente une activité antifongique sur *F. oxysporum* presque identique (1,25 $\mu\text{M}$ ) à celle de son monomère.

Bien que des concentrations en peptides élevées aient été testées (160 $\mu\text{M}$ ), les formes monomériques et multimériques de la rstylicine2, n'ont aucune activité sur les souches de champignons et de levures (Tableau 3).

##### **b) *Perméabilisation des membranes***

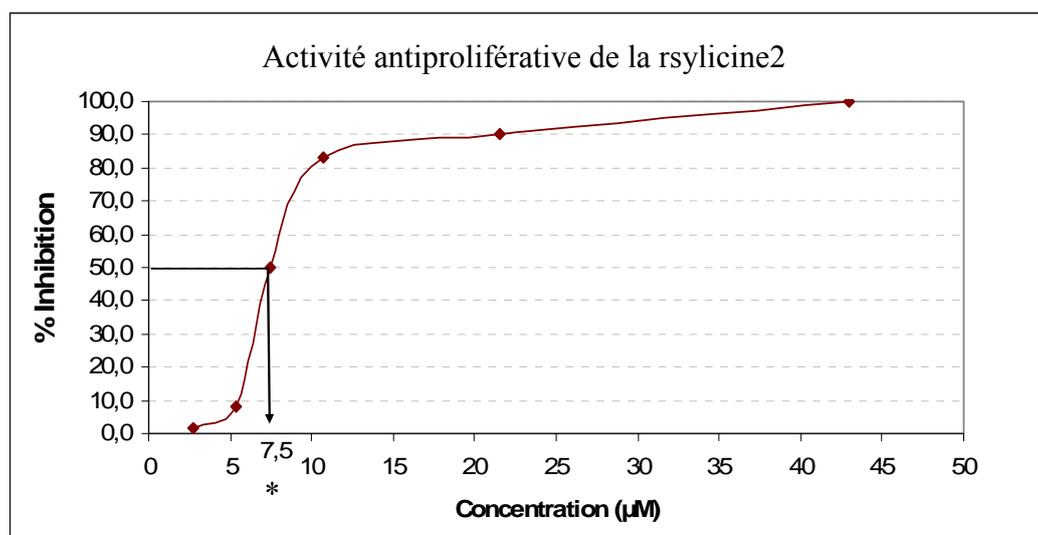
L'utilisation du SYTOX<sup>®</sup>green, pour la mise en évidence d'une perméabilisation membranaire par les peptides, atteste que comparativement à la rstylicine2, seule la rstylicine1 est à l'origine sur *F. oxysporum* d'une perméabilisation membranaire dose dépendante. (Figures 14A et 14B).

#### **5. Activités sur les cellules de myélome murin**

Après incubation des peptides (rstylicines 1 et 2) à différentes concentrations en présence des cellules tumorales de myélome murin l'activité antiproliférative des molécules a été étudiée par la détermination de la CI<sub>50</sub>.

**Tableau 4.** Tests d'inhibition de la prolifération cellulaire par les rstylicines 1 et 2 : valeurs des CI<sub>50</sub>.

	CI <sub>50</sub> (µM)	
	rstylicine1	rstylicine2
Cellules de myélome murin	20 µM	7.5 µM



**Figure 15.** Représentation graphique de l'inhibition de la prolifération des cellules du myélome murin par la rstylicine2.

\* : valeur de la CI50%

NA : Non actif

**Tableau 5.** Influence des rstylicines à différentes concentrations sur les tests d'hémostase.

	0	0.15 mg/mL		0.3 mg/mL		0.5 mg/mL	
	ref	rsty1	rsty2	rsty1	rsty2	rsty1	rsty2
Temps de coagulation en secondes							
TCK	51	55	51	<b>65</b>	> <b>210</b>	<b>95</b>	ND
TQ	14	17	ND	<b>41</b>	ND	<b>48</b>	ND
TT*	17	16	19	> <b>240</b>	> <b>240</b>	> <b>240</b>	ND

\* : Plasma dilué au 1/10<sup>ème</sup>

Ref : Référence

rsty1 : rstylicine1

rsty2 : rsylicine2

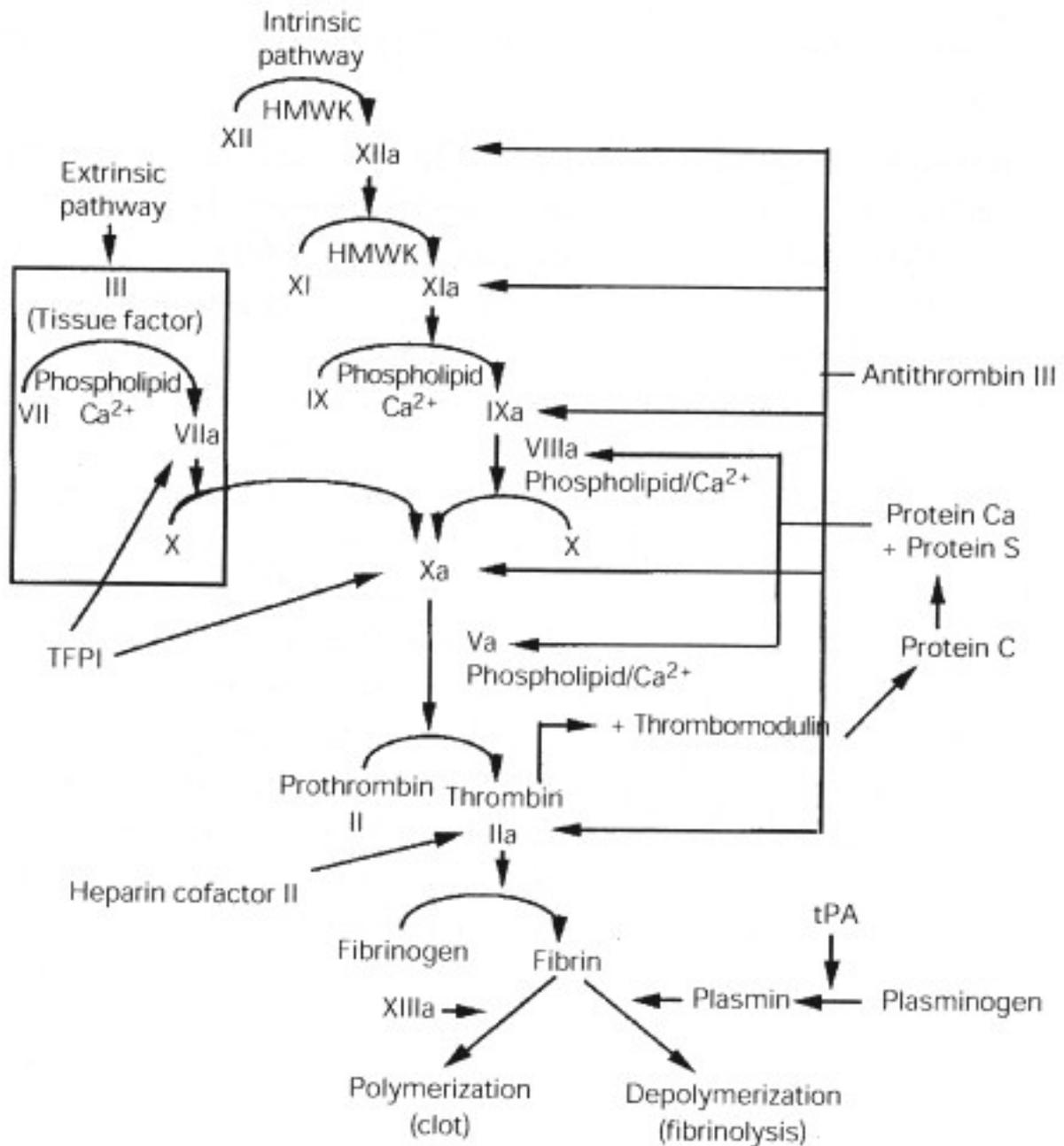
Les deux peptides semblent actifs avec une CI50% de 20 $\mu$ M pour la rstylicine1 et de 7.5 $\mu$ M pour la rstylicine2 (Tableau 4). L'activité de la rstylicine2 est beaucoup plus forte que celle de la rstylicine1 et à la concentration de 20 $\mu$ M, la rstylicine2 inhibe la prolifération cellulaire de l'ordre de 86% (Figure 15).

## 6. Activités Anticoagulantes

L'influence des deux peptides sur les deux voies (exogène et endogène) de la coagulation plasmatique a été testée sur du plasma humain citraté par la réalisation de 3 tests : le Temps de Céphaline Kaolin (TCK), le Temps de QUICK (TQ) et le temps de thrombine (TT). Il s'agit de tests chronométriques qui peuvent apporter de précieux renseignements sur l'action de certaines molécules chimiques sur un ou plusieurs facteurs plasmatiques impliqués dans l'hémostase.

Comparativement à un plasma témoin de référence, l'addition de quantités croissantes des peptides 1 et 2 permet de constater qu'à la concentration de 0.3 mg/mL on assiste à une augmentation significative des temps des 2 tests : TCK et TQ. Cette augmentation est plus importante à la concentration de 0.5 mg/mL (Tableau 5). L'augmentation du TCK et du TQ indique que les deux peptides agiraient sur la partie commune aux deux voies de la coagulation, c'est-à-dire sur les facteurs : X, V, II et I.

Pour la détermination du temps de thrombine TT, nous avons désensibilisé le test en diluant le plasma au 1/10<sup>ème</sup>, une coagulation à 17-19 secondes a été notée pour le plasma de référence, sans addition de peptide ou après une addition faible de 0.15 mg/mL. Aux concentrations de 0.3-0.5 mg/mL, nous n'avons pas observé de coagulation après 240 secondes (Tableau 5). Cet allongement important du temps de thrombine, TT > 240 s, apporte la preuve que les deux molécules n'interagissent pas avec le facteur XIII (la transglutaminase). En complément des deux tests précédents, il apporte la preuve que les deux molécules ont une activité sur la fibrino-formation (Figure 16).



**Figure 16 :** Les voies de la coagulation plasmatique (d'après Nader *et al*, 2001).

tPA : activateur tissulaire du plasminogène.

TFPI : facteur d'inhibition tissulaire des voies de coagulation.

## C. Discussion

A partir des séquences des transcrits qui codent pour les deux stylicines, identifiées dans le chapitre II, nous avons été amenés à produire ces deux peptides en système recombinant.

Nous avons choisi de produire les stylicines 1 et 2 en système bactérien (*E. coli*), bien que les systèmes d'expression en levures soient les plus couramment utilisés pour produire des peptides notamment les peptides antimicrobiens.

Ces systèmes ont pour inconvénient majeur l'incapacité de réaliser les modifications post-traductionnelles comme l'amidation carboxy-terminale (Rurke et al, 1997) et la cyclisation des glutamines amino-terminales (Przysiecki *et al*, 1992). Par contre, ils permettent de produire des molécules correctement repliées avec un bon rendement, comme la défensine et la drosomycine (Reichhart *et al*, 1992, Michaud *et al*, 1996). Ajoutons que ces systèmes peuvent également produire des formes O et N-glycosylées non fonctionnelles comme les formes O-glycosylés des pénéidines 2 et 3a produites en *Saccharomyces cerevisiae*, représentant environ 50% et 75% des formes de peptides produits (Destoumieux *et al*, 2000).

Les systèmes d'expression bactériens (*E. coli*) ont montré qu'ils étaient adaptés à la production de peptides linéaires comme les cécropines (Piers *et al*, 1993), ou d'un peptide cyclique comprenant peu de ponts disulfures (2) comme la polyphémusine (Pierce *et al*, 1997). Ils montrent également leurs limites, notamment au niveau de la conformation structurale de la molécule, au delà de 2 ponts disulfures, comme pour la défensine  $\alpha$  (Piers *et al*, 1993) et ce vraisemblablement en raison d'une mauvaise étape de renaturation après purification. Malgré ce points négatifs, en utilisant la combinaison de la stratégie de clonage développée par Ouelette et Shirafuji (Ouelette *et al*, 2000; Shirafuji *et al*, 2003) et la méthode de renaturation développée par Wu (Wu *et al*, 2003) pour l' $\alpha$ -défensine de *C. gigas*, nous avons obtenu des molécules qui semblent correctement structurées. Ces peptides se présentent sous plusieurs formes, dont les formes prédominantes sont essentiellement le monomère et le dimère. Les rendements de production sont faibles et ont été estimés à environ 0,2 mg/L de culture après purification.

Le monomère et le dimère de la rstylicine1 présentent les mêmes propriétés antimicrobiennes. Ces résultats sont comparables aux résultats obtenus avec un autre peptide

antimicrobien, la bacténécine (Lee *et al*, 2009). Les activités antimicrobiennes de la rstylicine1 pourraient être indépendantes de sa structure tridimensionnelle.

La rstylicine1 présente de faibles activités bactériostatiques sur les bactéries du genre *Vibrio* avec des CMI comprises entre 20 et 80  $\mu$ M. Les peptides antibactériens (en général cationiques) exercent leur action en se fixant par une liaison de type ionique sur la face externe des membranes des bactéries chargées négativement (Hancock, 2001). Notre peptide dans des conditions physiologiques étant de type anionique, on peut alors se poser la question de la nature de la fixation de cette molécule sur la membrane des bactéries du genre *Vibrio*. Avec une activité si faible dépourvue de bactéricidie, il semble peu probable que ce peptide soit capable d'agir directement sur les membranes des bactéries en les perforant.

L'explication de la nature de la liaison du peptide rstylicine1 avec la paroi bactérienne Gram (-) se trouve dans les résultats des tests de "binding" qui montrent, que le peptide semble se comporter comme une PRP "Pattern Recognition Protein" en interagissant avec le LPS de la paroi des bactéries Gram (-) et plus particulièrement avec le LPS de *V. penaeicidae*. La rstylicine1 se lie fortement aux LPS de *V. penaeicidae* et d'*E. coli* avec des constantes de dissociation (Kd) respectivement de  $0.96 \times 10^{-7}$  et de  $1.02 \times 10^{-7}$  M. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour d'autres molécules qualifiées de "binding protein" comme la polymyxine B, la CD14 humaine (Kirkland *et al*, 1993), le facteur C de la limule (Tan *et al*, 2000), la BPI de *C. gigas* (Gonzalez *et al*, 2007) ou le rALFPm3 de *P. monodon* (Somboonwiwat *et al*, 2008), avec des valeurs de Kd comprises entre  $3.3 \times 10^{-7}$  et  $2.3 \times 10^{-10}$  M. La région N-terminale riche en proline du peptide pourrait être impliquée dans cette capacité à se fixer au LPS, comme cela a été décrit chez d'autres peptides antimicrobiens (Gennaro *et al*, 2002; Munoz, 2002, Cuthbertson *et al*, 2004, Li *et al*, 2006). Son activité antibactérienne pourrait être également liée à sa capacité d'agréger des bactéries par la combinaison de la liaison au LPS et de la polymérisation. Cette hypothèse est cohérente, avec nos résultats expérimentaux, qui montrent que ce peptide a une activité bactériostatique à faible concentration et agglutine "in vitro" des bactéries à forte concentration, lorsque sa polymérisation devient possible. Quoi qu'il en soit, nos résultats suggèrent fortement que le LPS est bien l'une des principales molécules cible de la rstylicine1.

Si ce peptide est faiblement antibactérien, il est par contre beaucoup plus actif sur *F. oxysporum*, un champignon filamenteux pathogène pour la crevette, avec une valeur de CMI comprise entre 1,25  $\mu$ M et 2,5  $\mu$ M. Cette activité antifongique de la rstylicine1 est

probablement en relation avec sa capacité à perméabiliser les membranes de *F. oxysporum* à partir de 0.8  $\mu\text{M}$ . L'activité antifongique de ce peptide est comparable à celle du fragment C-Terminal de l'hémocyanine, un peptide anionique (pI théorique = 6.04) strictement antifongique dont la CMI est comprise entre 3  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  (Destoumieux-Garzon *et al*, 2001). Son activité est également comparable à des peptides antimicrobiens, cationiques et riches en résidus cystéine, comme la snakin1 chez la pomme de terre (Segura *et al*, 1999), la tachycitin chez la limule (Kawabata *et al*, 1996; Suetake *et al*, 2002), la pénéidine chez la crevette (Bachère *et al*, 2000) et la NaD1, une défensine produite par la fleur du tabac (Van der Weeden *et al*, 2008). L'activité antifongique de cette dernière étant liée essentiellement à sa structure puisque la rupture des ponts disulfures entraîne la perte totale de son activité antifongique sur *F. oxysporum* (Van der Weeden *et al*, 2008). Bien qu'il soit difficile de comparer la rstylicine1 avec tous les peptides précédents, la capacité de perméabilisation de notre peptide, comme pour la NaD1, est probablement en relation avec sa conformation spatiale beaucoup plus que sa charge électrique. La spécificité observée de la rstylicine1 pour *F. oxysporum*, ne semble pas être reliée à sa structure conformationnelle, mais plutôt à la reconnaissance du  $\beta$ -1,3-glucane présent dans la membrane de ce champignon.

Les rstylicines ont une activité sur la fibrino-formation du plasma humain (cf. tests d'hémostase). Elles interfèrent au niveau de l'insolubilisation de la fibrine et de ce fait dans la structuration du caillot produit à la fin de la cascade des réactions de coagulation. A notre connaissance, en dehors des héparines "like" décrites chez les crustacés, plus particulièrement chez la crevette peneides *P. brasiliensis* (Dietrich *et al*, 1999), c'est la première fois que l'on met en évidence chez des crustacés et plus particulièrement, des molécules protéiques (anioniques) capables d'agir directement sur la coagulation sanguine de vertébré. Une étude effectuée par Nader sur l'influence d'héparines "like" sur l'hémostase semblent montrer que les variations observées sont à relier avec la charge de celles-ci (Nader *et al*, 1989).

Enfin d'après les travaux de Lévesque (Lévesque *et al*, 2004) sur le traitement de la maladie thromboembolique veineuse, il existe chez les patients cancéreux une hypercoagulabilité en rapport avec la production par les cellules cancéreuses de substances entrant en interaction avec les plaquettes, le système de la coagulation et de la fibrinolyse. L'ensemble de ces anomalies peut expliquer qu'une tumeur de petite taille entraîne à distance des thromboses. On peu penser que cette activité anti-thrombique de la rstylicine1 aurait une application dans le domaine de la thérapie anticancéreuse.

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les stylicines sont des molécules anioniques, qui possèdent des caractéristiques structurales, communes à deux groupes de peptides antimicrobiens distincts. Elles sont formées d'une région linéaire riche en résidus aminés proline et, d'une région cyclique riche de 13 cystéines. A notre connaissance, il s'agit avec les pénéidines de la seconde famille de peptides antimicrobiens, associée à ce type de structure et identifiée chez les crevettes pénéides.

Quoi qu'il en soit, les données obtenues dans ce travail permettent de mettre en évidence diverses propriétés génétiques et biologiques de la stylicine1 (Figure S) et de la stylicine2, qui apparaissent comme appartenant à une famille de peptides multifonctionnels.

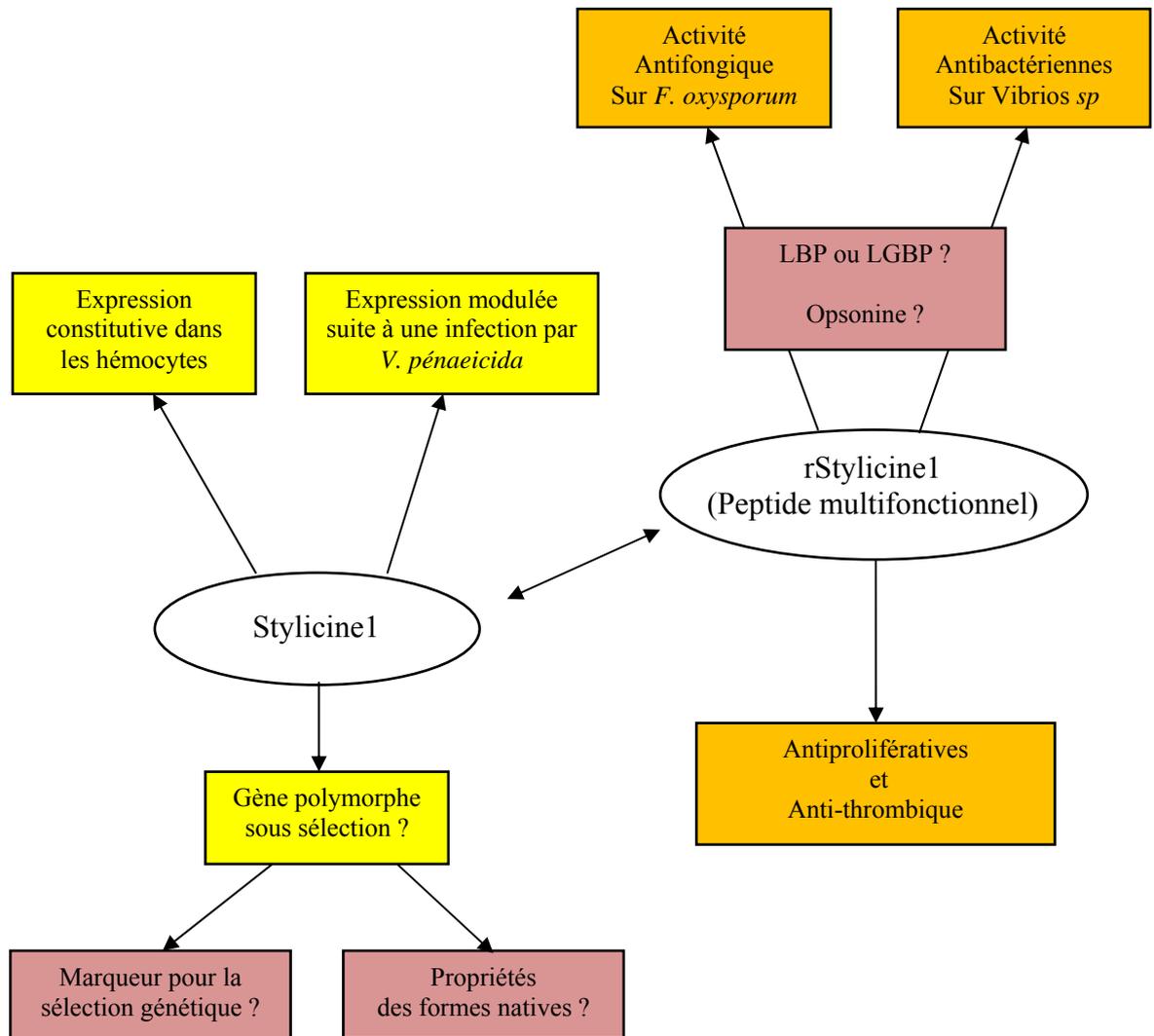
La rstylicine1 est à l'origine d'agglutination des bactéries *in vitro*. Ce peptide *in vivo* semble bien être impliqué dans la réponse immunitaire de la crevette. En effet, le LPS de la paroi des bactéries Gram (-) est bien l'une de ses principales cibles. Ce peptide, si il possède également des capacités d'adhésion aux cellules hémocytaires, apparait être une nouvelle molécule de reconnaissance de type LBP "Lipopolysaccharide Binding Protein". Des mesures d'indice phagocytaire *in vitro* apporteront probablement des réponses sur la fonction opsonisante de ce peptide et sur son implication possible dans la communication cellulaire.

La rstylicine1, comme la LGBP "Lipopolysaccharide/  $\beta$ -1-3-Glucan Binding Protein" identifiée chez *P. stylirostris* (Roux *et al*, 2002), pourrait se lier au  $\beta$ -1,3-glucane. Cette liaison serait le point de départ qui conduit à la perméabilisation de la membrane de *F. oxysporum*. Des tests de binding mettant en jeu la rstylicine1 avec le  $\beta$  1-3 glucan devraient nous éclairer sur ce point.

On peut se demander si les rstylicines 1 et 2, que nous avons produites en système recombinant, présentent une conformation spatiale correcte ? En effet des deux peptides, seule la rstylicine1 présente des activités restreintes sur des microorganismes pathogènes de la crevette : une activité antifongique sur *F. oxysporum* et une action antibactérienne essentiellement sur les bactéries Gram (-) du genre *Vibrio sp.* Comme cela a été démontré pour une  $\beta$ -défensine (peptide riche en résidus cystéine) *in vitro*, le repliement de la molécule est fonction des conditions d'oxydation réalisées et peu ne pas correspondre à celui de sa forme native (Wu *et al*, 2003). Pour la rstylicine1, bien qu'elle semble s'être repliée correctement

avec la formation de 6 ponts disulfures intramoléculaires, ont est en droit de se demander si les activités biologiques que l'on détecte sont similaires à celles de sa forme native. Pour la stylicine<sup>2</sup>, la question se pose, en effet aucune activité contre les micro-organismes n'a été mise en évidence. Sachant que la formation de la structure tertiaire en feuillets  $\beta$ , et la probable formation des ponts disulfures, est généralement acquise "in vivo" au contact des membranes (Powers et Hancock, 2003), une analyse des activités biologiques, ainsi que la détermination de la structure 3D (par cristallographie) des formes natives de ces peptides seraient nécessaires pour répondre à cette question.

L'ensemble des résultats de notre étude, confirment que la stylicine<sup>1</sup>, présente un intérêt dans le système de défense de la crevette *L. stylirostris*, par les activités antimicrobiennes dirigées contre plusieurs de ses pathogènes (bactéries du genre *Vibrio* et le champignon *F. oxysporum*). Si la quantification de cet effecteur constitue, une approche adaptée pour réaliser un suivi ou une évaluation de l'état sanitaire des animaux en élevages (de Lorgeril et al, 2006, Brevet N° 06 09724), sa qualité l'est probablement tout autant. Or dans le Chapitre II, nous avons montré que le gène codant la stylicine<sup>1</sup> était soumis à une forte pression de sélection. Cependant, certains individus issus de populations sauvages comme d'élevages, possèdent encore des gènes qui codent des variants de la stylicine<sup>1</sup>. Ces derniers qui diffèrent de la stylicine<sup>1</sup> par leurs propriétés physico-chimiques, le sont probablement par leurs activités biologiques. Par la réalisation d'une infection expérimentale type "syndrome 93", suivie d'une analyse individuelle des séquences des gènes codant la stylicine<sup>1</sup>, il serait possible de déterminer, si la survie des crevettes à l'infection est bien en relation avec la présence dans leur génome du gène codant la stylicine<sup>1</sup> et non un de ses variants. Dans le cas d'une réponse affirmative, une première sélection des individus du milieu naturel par génotypage, basée sur la capacité des crevettes à produire la stylicine<sup>1</sup>, serait alors à envisager.



**Figure S:** Schéma récapitulatif des diverses propriétés génétiques et biologiques de la stylicine1.

En jaune: Propriétés génétiques et biologiques de la stylicine1.

En orange: Propriétés biologiques de la forme recombinante de la stylicine1.

En mauve : Propriétés à explorer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., 2009. Penaeid shrimp immune system. *Thai. J. Vet. Med.* 39 (3), 205–215.
- Ai, H.S., Liao, J.X., Huang, X.D., Yin, Z.X., Weng, S.P., Zhao, Z.Y., Li, S.D., Yu, X.Q., He, J.G., 2008. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 33(1), 59-68.
- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., 2009. Penaeid Shrimp Immune System. *Thai. J. Vet. Med.* 39(3), 205-215.
- Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J.F., 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the blacktiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 48, 91-99.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* 45 (4), 1085–1093.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 33(2), 247-256.
- Ando, K., S. Natori., 1988. Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 103(4), 735-739.
- APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2000. Report of a Joint APEC/FAO/ NACA/SEMARNAP ad-hoc expert consultation on trans-boundary aquatic animal pathogen transfer and development of harmonized standards on aquaculture health management, 24–28 July 2000, Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture.* 191 (1–3), 71–88.
- 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*. *Immunological reviews* 198, 149-168.
- Barracco, MA., Duvic, B., Soderhäll, K., 1991. The beta-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastatus leniusculus*, when reacted with beta-1,3-glucan, induces sprading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell. Tissue. Res.* 266, 491-497.
- Bartlett, TC., Cuthbertson, BJ., Shepard, EF., Chapman, RW., Gross, PS., Warr, GW., 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4(3), 278-9.
- Bauchau, AG., 1980. Crustacean. In *Invertebrate Blood Cells*. N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley. New York, Academic Press, 385-420.

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Gé-nome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 1996-2001.
- Bierne, N., Bezuart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bedier, E., 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 184(3-4), 203-219.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8), 911–917.
- Bulet, P., C. Hetru, J. L. Dimarcq et D. Hoffmann., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329-344.
- Bulet, P., R. Stöcklin et L. Menin., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184.
- van de Braak, CBT., Botterblom, MHA., Liu, W., Liu, W., Taverne, N., van der Knaap, WPW., Rombout, JHWM., 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish. Shellfish. Immunol.* 12(3), 253-272.
- Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck et P. Tempst., 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8(8), 2387-2391.
- Cheng, W., Chiang, P.C., Lai, C.Y., Yeh, M.S., 2008. Expression of clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in gonads and its possible role as nutrient source for the embryo. *Dev. Comp. Immunol.* 32(12). 1422-1429.
- Cheng, W., Tsai, I.H., Huang, C.J., Chiang, P.C., Cheng, C.H., Yeh, M.S., 2008. Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Dev. Comp. Immunol.* 32 (3), 265-274.
- Chim, L., Lucien-Brun, H.; LeMoullac, G., 2002. Marine shrimp farming. Fisheries and Aquaculture: Towards Sustainable Aquatic Living Resources Management, in Knowledge for sustainable development. An insight into the Encyclopedia of Life Support Systems, UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, UK, Volumes II, 1059p.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legourmellec, M., Grimont, P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164, 297-309.
- Coutant, M. F., 1977. Contribution a l'étude cytologique et fonctionnelle des hémocytes et des organes hématopoïétiques chez l'oniscoïde *Porcellio dilatatus*, Brandt. *Thèse*, Université de Poitiers.
- Cuthbertson, B.J., Bullesbach, E.E., Fievet, J., Bachère, E., Gross, P.E., 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus*

- setiferus*) exhibits target specificity and an independent prolinerich-domain function. *J. Biochem.* 381, 79–86.
- Debec, A., Mokdad, R., Wegner, M., 1985. Metallothionein and resistance to cadmium poisoning in *Drosophila* cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 127 (1), 143-152.
- de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M.G., Gueguen, Y., Bachere, E., 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol. Genomics.* 21(2), 174-183.
- de Lorgeril, J., 2005. Expression de gènes immunitaires et capacité de survie de la crevette *Litopenaeus stylirostris* au pathogène *Vibrio penaeicida*. Thèses de l'université de Montpellier II.
- de Lorgeril, J., Bachère, E., Gueguen, Y., Piquemal, D., 2006. Use of antimicrobial peptides as markers for resistance to bacterial infections in penaeid shrimp. N° 06 09724, Brevet français et international, dépôt 2007.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., VanDorselaer, A., Rodriguez, J., Bachère, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272 (45), 28398–28406.
- Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P., Bachere, E., 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (8–9), 1260–1271.
- Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachere, E., 2001. Crustacean immunity—antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276 (50), 47070–47077.
- Dietrich, C.P., Paiva, J.F., Castro, R.A., Suely, F., Chavante, F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P.A.J., Mendes, A., Nader, H.B., 1999. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Sub.* 1428(2-3).273-283.
- Dimarcq, J.L., P. Bulet, C. Hetru., J. A. Hoffmann., 1998. Cystein-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47, 465-477.
- Doolittle, RF., Riley, M., 1990. The amino-terminal sequence of lobster fibrinogen reveals common ancestry with vitellogenins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167, 16-19.
- Epand, R.M., Vogel, H.J., 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 11-28.
- FAO, 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2007.

- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 1994. Insect immunity, septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* 269, 33159–33163.
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev. Comp. Immunol.* 31(3), 217-231.
- Fuller, G.M., Doolittle, R.F., 1971a. Studies of invertebrate fibrinogen. II. Transformation of lobster fibrinogen into fibrin. *Biochem.* 10, 1311-1315.
- Fuller, G. M., Doolittle, R.F., 1971b. Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. *Biochem.* 10, 1305-1311.
- Furey, W.F., Robbins, A.H., Clancy, L.L., Winge, D.R., Wang, B.C., Stout, C.D., 1987. Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Experientia. Suppl.* 52, 139-48.
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* 3: 710-720.
- Gargioni, R., Barracco, M.A., 1998. Hemocytes of the Palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus* and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. *J. Morphol.* 236, 209-221.
- Gennaro, R., Zanetti, M., Benincasa, M., Podda, E., Miani, M., 2002. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr. Pharm. Des.* 8 (9), 763–778.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006a. Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105-113.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Decker, S., Saulnier, D., le Roux, F., 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 570-580
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugniere, M., Roquet, F., Escoubas, J.M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Saune, L., Bulet, P., Bachere, 2007. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (45), 17759–17764.
- Goyard, E., Arnaud, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D., Wyban, J., P, Boudry, P., AQUACOP., 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquat. Living. Resour.* 16, 501-508.
- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M.P., Mougnot, I., de Lorgeril, J., Janech, M., Gross, P.S., Warr, G.W., Cuthbertson, B., Barracco, M.A., Bulet, P., Aumelas, A., Yang, Y.S., Bo, D., Xiang, J.H., Tassanakajon, A., Piquemal, D., Bachere, E., 2006. PenBase, the

- shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.* 30 (3), 283–288.
- Hall, M., Söderhäll, K., 1994. Crayfish alpha-macroglobulin as a substrate for transglutaminases. *Comp Biochem Physiol.* 108(1), 65-72.
- Hancock R.E., 1997. <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/MIC.htm>  
<http://www.interchg.ubc.ca/bobh/methods.htm>
- Hancock, R.E., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *THE LANCET Infectious Diseases*, 1: 156-164.
- Herbland, A., Harache, Y., coord., 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, 144p.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R., 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 8 (2), 189–191.
- Hose, J.E., Martin, G.G., 1989. Defense functions of granulocytes in the Ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *J. Invert. Pathol.* 53, 335-346.
- Hose, J. E., Martin, G.G., Gerard, A.S., 1990. A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.* 178, 33-45.
- Iwanaga, S., 2002. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr. Op. Immunol.* 14: 87-95.
- Iwanaga, S. et S. I. Kawabata., 1998. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Frontiers Bioscience.* 3: 973-984.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jitvaropas, R., Amparyup, P., Groos, P.S, Tassanakajon, A., 2009. Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 153 (3), 236-43.
- Johansson, M.W., Lind, M.I., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., Söderhäll, K. 1995. Peroxinectine a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 216, 1079-1087.
- Johansson, M.W., 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23(4-5), 303-315.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191, 45-52.
- Kägi, J.H.R., Kojima, Y., 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. In *Metallothionein II. Experientia. Suppl.* 52, 25-61.

- Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*. 191(1-3), 145-161.
- Kawabata, S., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, K.L., Saito, T., Cho, J.K., Nakajima, H., Takagi, T., Iwanaga, S., 1996. Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J. Biochem.* 120 (6), 1253–1260.
- Kawabata, S., T. Osaki et S. Iwanaga., 2003. Innate immunity in horseshoe crabs. *In Infectious disease: Innate Immunity*. R. A. Ezekowitz and J. A. Hoffmann. Totowa, NJ, Humana Press.
- Kirkland, T.N., Finley, F., Leturcq, D., Moriarty, A., Lee, J.D., Ulevith, R.J., Tobias, 1993. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J. Biol. Chem.* 268 (33), 24818–24823.
- Kobayashi, M., Johansson, MW., Söderhäll, K., 1990. The 76 kDa cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro*. *Cell. Tissue. Res.* 260, 13-18.
- Komastu, M., Ando, S., 1998. A very high density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliates*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 459-463.
- Kopacek, P., Hall, M., Söderhäll, K., 1993a. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 213(1), 591-597.
- Kopacek, P., Hall, M., Söderhäll, K., 1993b. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.* 17(5), 407-418.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lanz, H., Tzutzumi, V., Arechiga, H., 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 389-397.
- Lee, S., B. Lee., K. Söderhäll., 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 278(10), 7927-7933.
- Lee, SY., Söderhäll, K., 2001. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 12(5), 421-437.
- Lehrer, R. I., 2004. Primate defensins. *Nature Rev. Immunol.* 2, 727-732.
- Lemonnier, H., Herbland A., Salery, L., Soulard, B., 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow-out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. *Aquaculture*. 261, 1039-1047.
- Le Moullac, G., Goyard, E., Saulnier, D., Haffner, P., Thouard, E., Nedelec, G., Goguenheim, J., Rouxel, C., Aquacop, GC., 2003. Recent improvements in broodstock management and larviculture in marine species in Polynesia and New Caledonia: genetic and health approaches. *Aquaculture*. 227 (1-4), 89-106.

- Lee, J.Y., Yang, S.T., Kim, H.J., Lee, S.K., Jung, H.H., Shin, S.Y., Kim, J.I., 2009. Different modes of antibiotic action of homodimeric and monomeric bactenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide. *BMB Rep.* 42 (9), 586–592.
- Lévesque, B.C., Michel, P., Pfister, C., 2004. Traitement de la maladie thromboembolique veineuse chez les patients souffrant de cancers. *Rev. Med Interne.* 25, 906-14.
- Li, W.F., Ma, G.X., Zhou, X.X., 2006. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides* 27 (9), 2350–2359.
- Lightner, D.V., 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue scientifique et technique de l'Office international des epizooties.* 15 (2), 579-601.
- Lightner, D.V., 1998. *Vibrio* disease of penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 42-47.
- Lin, X.H., Söderhäll, K., Söderhäll, I., 2008. Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, importance in hemocyte homeostasis. *BMC Immunol.* 9, 58.
- Liu, C. H., ChunHung, L.; Winton, C.; Cheng, W.; JungPing, H.; JiannChu, C., Chen, J. C., 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 61, 169-174.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., Xu, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 30(7), 607-617.
- Mai, W.J., Hu, C.Q., 2009. cDNA cloning, expression and antibacterial activity of lysozyme C in the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Prog. Nat. Sci.* 19(7), 837-844.
- Maningas, MBB., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T., Aoki, T., 2008. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Mol. Immunol.* 45(5), 1269-1275.
- Marshall, S.H., Arenas, G., 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Elec. J. Biotechnol.* 6 (3), 271-284.
- Martin, G.G., Graves, L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* 185, 339-348.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 296, 298-300.
- Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Kono, T., Sakai, M., Itami, T., 2010. Molecular cloning and transcriptional analysis of a newly identified anti-lipopolysaccharide factor gene in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Let. App. Microbio.* 50(1), 112-119.

- Mermoud, I., Costa, R., Mari, J., Bonami, J.R., Hasson, K., Lightener D.V., 1998. Investigations of *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New caledonia, exploring a viral hypothesis. *Aquaculture*. 164, 311-322.
- Michaud, L., Felhbaum, P., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Reichhart, J.M., Bulet, P., (1996). Determination of the disulfite array of the first inducible antifungal peptide from insects : drosomycin from *Drosophila melanogaster*. *FEBS lett*, 395, 6-10.
- Mokdad, R., Debec, A., Wegner, M., 1987. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84 (9), 2658-2662.
- Munoz, M., Cedeno, R., Rodriguez, J., van der Knaap, WPW., Mialhe, E., Bachere, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191(1-3), 89-107.
- Munoz, M., 2002. Penaeidins, family of antimicrobial peptides from crustaceans : implication and function in the immune response of penaeid shrimps (Crustacea, decapoda). *UPMC Paris thesis*.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., 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.
- Munoz, M., F. Vandenbulke, D. Saulnier et E. Bachère (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* 269, 2678-2689.
- Nader, H.B. Dietrich, C.P., Lane, D.A., Lindahl, U., 1989. Heparin: Chemical and Biological Properties. *Clin. Appl. Eds.* 81-96.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., vonHeijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10 (1), 1–6.
- Ohki, M.; Nakamura, T., Morita, T., Iwanaga, S., (1980). A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe-crab (limulidae). *FEBS. Lett.* 120(2), 217-220.
- O’Leary, N.A., Groos, P.S., 2005. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. *Gene*. 371(1), 75-83.
- Osaki, T., Kawabata, S., (2004). Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61(11), 1257-1265.
- Ouellette, A.J., Lualdi, J.C., 1990. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small-intestine and cells of myeloid origin. *J. Biol. Chem.* 265(17), 9831-9837.
- Patat, S.A., Carnegie, R.B., Kingsbury, C., Gross, P.S., Chapman, R., Schey, K.L., 2004. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp, *Eur. J. Biochem.* 271, 4825–4833.

- Perazzolo, LM., Lorenzini, DM., Daffre, S., Barracco, MA., 2005. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142(3), 302-307.
- Pierce, J.C., Maloy; W.L.Salvador, L., Dungan, C.F., (1997). Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Mol. Mar. Biol. Tech.* 6(3), 248-259
- Piers, K.L., Brown, M.H., Hancock, R.E., (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene.* 134, 7-13.
- Ptaffl MW., (2001). A new mathematical model for relative quantification in rea-time RT-PCR. *Nucl.Acid.Res.* 29, 9.
- Powers. J.P.S., Hancock, R.E., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides.* 24(11), 1681-1691.
- Prapavorarat, A., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., 2010. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 34(6), 611-617.
- Przywiecki, C.T., Joyce, J.G., Keller, P.M., Markus, H.Z., Carty, C.E., Hagopian, A., Sardana, M.K., Dunwiddie, C.T., Ellis R.W., Miller, W.J., (1992). Characterization of recombinant antistatin secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expr. Purif.* 3(3), 185-195.
- Relf. JM., Chisholm, JR., Kemp, GD., Smith, V., 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.* 260, 350-357.
- Reichhart, J.M., Petit, I., Legrain, M., Dimarq, J.L., Keppi, E., Lecoq, J.P., Hoffmann, J.A., Achstere, T., (1992). Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly *phormia terraenovae*. *Inv. Rep. Dev.* 21(1), 15-24.
- Reynaud, Y., 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes péneïdes en Nouvelle-Calédonie. Thèse présentée à l'Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, Ecole doctorale Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, RW., Gross, PS., Browdy, CL., Warr, GW., 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: Convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J. virol.* 79(21), 13561-13571.
- Robalino, J., Bartlett, TC., Chapman, RW., Gross, PS., Browdy, CL., Warr, GW., 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: Inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Dev. Comp. Immunol.* 31(6), 539-547.

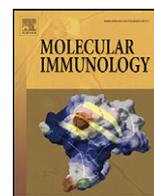
- Rolland J.L., Abdelouahab M., Dupont J., Lefevre F., Bachere E., Romestand, B., 2010. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Mol. Immunol.* 47 ( 6), 1269-77.
- Romestand, B., Molina, F., Richard, V., Roch, P., Granier, C., 2003. Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *Eur. J. Biochem.* 270, 2805-2813.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundoa, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Soderhall, K., 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 (7-8), 713-726.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* 76 (14), 7140-7149.
- Rourke, I.J., Johnsen, A.H., Din, N.N., Petersen, J.G.L., Rehfeld, J.F., (1997). Heterologous expression of human cholecystinin in *Saccharomyces cerevisiae* - Evidence for a lysine-specific endopeptidase in the yeast secretory pathway. *J. B. C.* 272 (15), 9720-9727.
- Sarathi, M., Simon, M.C., Venkatesan, C., Hameed, A.S.S., 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar. Biotechnol.* 10(3), 242-249.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., (1999). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture.* 191 (1-3), 133-144.
- Schnapp, D., G. D. Kemp., V. J. Smith., 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 240, 532-539.
- Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A., Garcia-Olmedo, F., 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12 (1), 16-23.
- Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H., Cornelissen, B.J.C., 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal. Genet. Biol.* 27 (2-3), 275-282.
- Shirafuji, Y., Tanabe, H., Satchell, D.P., Henschen-Edman, A., Wilson, C.L., Ouellette, A.J., (2003). Structural determinants of pro-cryptdin recognition and cleavage by matrix metalloproteinase-7. *J. Biol. Chem.* 278: 7910-7919.
- Silar, P., Theodore, L., Mokdad, R., 1990. Metallothionein Mto gene of *Drosophila-Melanogaster*: structure and regulation. *J. Mol. Biol.* 215 (2), 217-224.

- Smith, V.J., K. Söderhäll., 1983. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell. Tissue. Res.* 233, 295-303.
- Söderhäll, K., Smith, V.J., 1983. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 229-239.
- Söderhäll, K., häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of pro-phenol-oxide activating systems in crayfish hemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta.* 797, 99-104.
- Söderhäll, K., Wringen, A., Johansson, M.W., Bertheussen, K., 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell. Immunol.* 94, 326-332.
- Söderhäll, K., Smith, V.J., Johansson, M.W., 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated hemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. *Cell. Tissue. Res.* 245, 43-49.
- Söderhäll, K and Serenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Ann.Rev. Fish. Disease.* 3-23.
- Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2001. Immune reactions. *In Biology of freshwater crayfish*. D. M. Holdich, Blackwell Science. 11, 439-464.
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., Bachere, E., 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 29(10), 841-851.
- Somboonwiwat, K., Bachere, E., Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A., 2008. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Dev. Comp. Immunol.* 32 (10), 1170–1176.
- Song, Y., Cheng, W., Wang, C., 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 24-31.
- Sonnenberg, A., 1993. Integrins and their ligands. *Curr. Top. Microbio. Immunol.* 184, 7-35.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S., Söderhäll, K., 2002. A beta 1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 237-245.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26 (3), 237–245.
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich., H. G. Boman., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 292, 246-248.
- Supamattaya, K., Ruangsri, J., Itami, T., Chitiwan, V., Phromkunthong, W., Muroga, K., 2003. Morphology and immunological roles of hemocytes and fixed phagocytes in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish. Patho.* 38(2), 33-39.

- Suetake, T., Aizawa, T., Koganesawa, N., Osaki, T., Kobashigawa, Y., Demura, M., Kawabata, S., Kawano, K., Tsuda, S., Nitta, K., 2002. Production and characterization of recombinant tachycitin, the Cys-rich chitin-binding protein. *Protein. Eng.* 15(9), 763–769.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.B., McGladdery, S.E., 2001. *Aquaculture development, health and wealth.* 167-191.
- Sun, P.D., Boyington, J.C., 2001. Overview of Protein Folds in the Immune System, *Current Protocols in Immunology*. DOI:10.1002/0471142735
- Tan, N.S., Ho, B., Ding, J.L., 2000. High-affinity LPS binding domain(s) in recombinant factor C of a horseshoe crab neutralizes LPS-induced lethality. *FASEB. J.* 14, 859–870.
- Tanguy, A., Mura, C., Moraga, D., 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat. Toxic.* 55(1-2), 35-47.
- Tirasophon, W., Roshorn, Y., Panyim, S., 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 334(1), 102-107.
- Unestam, T., and Söderhäll, K., 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. *Nature.* 267, 45-46.
- Vazquez, L., Maldonado, G., Agundis, C., Perez, A., Cooper, EL., Zenteno, E., 1997. Participation of a sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. *J. Exp. Zool.* 279(3), 265-272.
- Vouille, V., Amiche, M., Nicolas, P., 1997. Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin - Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. *FEBS Lett.* 414(1), 27-32.
- Wang, R., Lee, SY., Cerenius, L., Söderhäll, K., 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268, 895-902.
- van der Weerden, N.L., Lay, F.T., Anderson, M.A., (2008). The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *J.B.C.* 283(21), 14445-14452.
- Weir, B. S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38, 1358-1370.
- Weppe, M., Bonami, J.R. AQUACOP, and Lightner, D.V., 1992. Demonstracion de las altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR43) resistente al virus IHHN. In: *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, CENAIM, Guyaquil, Ecuador.* 229–232.
- Wiley & Sons, Inc., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley, J & Sons, Inc.
- Wu Z., Hoover, D.M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J.J., Lubokowski, j., Lu, W., 2003. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 10, 1-6.

- Wu, Z.B., Powell, R., Lu, W.Y., 2003. Productive folding of human neutrophil alpha-defensins in vitro without the pro-peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (9), 2402–2403.
- Yeh, MS., Chen, YL., Tsai, IH., 1998. The hemolymph clottable protein from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 169-176.
- Yeh, MS., Kinoshita, K., Ashida, M., 1999. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266, 624-633.
- Yeh, M.S., Liu, C.H., Hung, C.W., Cheng, W., 2009. cDNA cloning, identification, tissue localisation, and transcription profile of a transglutaminase from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection by *Vibrio alginolyticus*. *Fish. Shellfish. Immunol.* 27 (6), 748-756.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389-395.
- Zhang, J., Li, F., Wang, Z., Xiang, J., 2007. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Biotechnol.* 127(4), 605-14.

## ANNEXE



## Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*

J.L. Rolland<sup>a,\*</sup>, M. Abdelouahab<sup>b</sup>, J. Dupont<sup>c</sup>, F. Lefevre<sup>c</sup>, E. Bachère<sup>a</sup>, B. Romestand<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Université Montpellier 2, Centre National de la Recherche Scientifique, IRD, UMR 5119 «Ecosystèmes Lagunaires», Place E. Bataillon, CC80, 34095 Montpellier cedex 5, France

<sup>b</sup> Université Catholique de Louvain, Unité de Microbiologie (MBLA), Croix du Sud 03, boîte 06, B1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

<sup>c</sup> LibraGen, 3 rue des Satellites, Bâtiment Canal Biotech I, 31400 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2009

Accepted 12 December 2009

Available online 12 January 2010

#### Keywords:

Ls-Stylicin1

Peptide

Shrimp

Antifungal

Agglutination

*Vibrio*

### ABSTRACT

The present study reports the characterization of Ls-Stylicin1, a novel antimicrobial peptide from the penaeid shrimp, *Litopenaeus stylirostris*. The predicted mature peptide of 82 residues is negatively charged (theoretical  $pI=5.0$ ) and characterized by a proline-rich N-terminal region and a C-terminal region containing 13 cysteine residues. The recombinant Ls-Stylicin1 has been isolated in both monomeric and dimeric forms. Both display strong antifungal activity against *Fusarium oxysporum* ( $1.25 \mu\text{M} < \text{MIC} < 2.5 \mu\text{M}$ ), a pathogenic fungus of shrimp, but lower antimicrobial activity against Gram (–) bacteria, *Vibrio* sp. ( $40 \mu\text{M} < \text{MIC} < 80 \mu\text{M}$ ). However, rLs-Stylicin1 is able to agglutinate *Vibrio penaeicidae* *in vitro* in agreement with its potent LPS-binding activity on immobilized LPS of *V. penaeicidae* (dissociation constant ( $K_d$ ) of  $9.6 \times 10^{-8}$  M). This molecule with no evident homology to other hitherto described antimicrobial peptides but identified herein several species of penaeid shrimp is thought to be the first member of a shrimp antimicrobial peptide family, which we termed stylicins.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Infectious diseases are one of the main limitations to the sustainable development of shrimp aquaculture worldwide. Over the past 20 years, progresses have been made in the understanding of shrimp immunity, through the characterization in particular of antimicrobials and other defense molecules (Aguirre-Guzman et al., 2009).

Several families of antimicrobial peptides have been isolated. Those include penaeidins, isolated the first time from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Destoumieux et al., 1997) and which primary structure is characterized by the presence of a N-terminal domain rich in proline residues and a C-terminal domain containing 6 cysteine residues (Destoumieux et al., 2000). Penaeidins display antifungal and antibacterial activity with a predominant activity against Gram-positive bacteria (Bachère et al., 2000) and agglutinating activity against *Vibrio* strains (Munoz, 2002). Cysteine-rich antimicrobial peptides from shrimp also include crustins, possessing 12 cysteine residues and a whey-acidic-protein domain (WAP) and exclusively active against Gram-positive bacteria (Bartlett et al., 2002; Zhang et al., 2007; Amparyup et al., 2008). Also antilipopolysaccharide factor (ALF)

such as recombinant form of ALFpm3 (Amparyup et al., 2008) exhibited a broad spectrum of activity against various strains of bacteria and fungi and was able to reduce WSSV propagation and prolong the survival of shrimps. Also lysozyme such as lysozyme C (Mai and Hu, 2009) from the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) demonstrated to be not only active against Gram-positive and Gram-negative bacteria but also against shrimp pathogens *Vibrio* sp.

Besides antimicrobial peptides, several effectors of shrimp immunity have been characterized that are involved in the recognition of microorganisms by binding molecules on the surface of invading bacteria. To date, those pattern recognition proteins (PRPs) (Medzhitov and Janeway, 2002) include C-type lectins as PmLec from *Penaeus monodon*, a lipopolysaccharide binding protein which has strong hemagglutinating and bacterial-agglutinating activity as well as opsonic effect (Luo et al., 2006).

In spite of such progresses, the mechanisms by which the shrimp can circumvent infections remain largely unknown. Thus, the capacity of the shrimp *L. stylirostris* to survive an infection with the highly pathogenic bacteria *Vibrio penaeicidae* has been investigated (De Lorgeril et al., 2005) by genomic approach. Thus, a relationship has been evidenced between the successful anti-infectious response of the shrimp and the abundance of transcripts for genes involved in immunity. Among them, genes encoding antimicrobials have been evidenced such as penaeidin 3 and lysozyme. Interestingly, a new transcript encoding a putative peptide rich in cysteines

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 47 09; fax: +33 4 67 14 46 22.

E-mail address: [jean.luc.rolland@ifremer.fr](mailto:jean.luc.rolland@ifremer.fr) (J.L. Rolland).

## RESUME

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été motivés par l'importance économique de l'élevage de la crevette bleue du pacifique *Litopenaeus stylirostris* dont les fortes mortalités sont principalement dues au développement de maladies bactériennes et virales.

Ils ont consisté en la caractérisation des deux premiers membres d'une famille originale de peptides multifonctionnels présents chez les crevettes péneïdes, les stylicines.

Ces peptides, nommés stylicines 1 et 2, sont des peptides anioniques ( $pI < 6.0$ ), formés d'une région amino-terminale riche en résidus de type proline et d'une région carboxy-terminale riche de treize résidus cystéines. Ces molécules sont synthétisées et stockées dans de petits granules présents dans le cytoplasme des hémocytes.

Pour mieux appréhender leurs rôles dans la réponse immunitaire des crevettes à une infection par des *Vibrio*, leurs formes recombinantes ont été produites dans *E. coli* BL21 (DE3) plysS, purifiées et caractérisées. Les deux rstylicines présentent des activités antiproliférative et anticoagulante. Seule la rstylicine1 présente des activités antimicrobiennes : antifongique sur *Fusarium oxysporum* (CMI $<2.5 \mu\text{M}$ ), et antibactérienne (bactériostatique) sur *Vibrio sp* (CMI $<80 \mu\text{M}$ ). Ce peptide est également capable de se lier aux LPS des bactéries à Gram (-) ( $K_d = 9.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) et d'agglutiner *V. penaeicida* "in vitro".

Enfin, l'existence de gènes codant des formes modifiées de la stylicine1, chez certaines crevettes, pourrait être en relation avec une diminution de la résistance des individus aux infections.

## SUMMARY

The work reported here was motivated by the economical importance of the pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* farming where high mortality rates are due to bacterial and viral diseases.

It consists in the characterisation of two original peptides, the first members of a new multifunctional family of peptides from penaeid shrimps, the stylicines.

Those two peptides, named stylicines 1 and 2, are negatively charged ( $pI < 6.0$ ), and characterised by a proline-rich N-terminal region and a C-terminal region containing 13 cysteine residues. Stylicines are synthesized by hemocytes where they are stored within small cytoplasmic granules.

To understand the role of these peptides in the immune response of shrimps to a vibrio infection, their recombinant forms were produced in *E. coli* BL21 (DE3) plysS, purified and characterised. The two rstylicines display biological anti-proliferative and blood clotting activities. Only rstylicine 1 displays antimicrobial activities: antifungal against *Fusarium oxysporum* (MIC $<2.5 \mu\text{M}$ ) and bacteriostatic against Gram (-) bacteria, *Vibrio sp.* (MIC $<80 \mu\text{M}$ ). Moreover this peptide displays an LPS-binding activity (dissociation constant ( $K_d$ ) of  $9.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) and agglutinate *Vibrio. penaeicida* "in vitro".

Finally, the presence of sequences coding for modified forms of stylicine 1 in some shrimp's genome may be in relation with their lower ability to survive infections.