

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Physiologie et Biologie des organismes-Populations-Interactions

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Identification de peptides antibactériens d'origine marine :
Amélioration de la qualité et de la survie du naissain d'huître.**

**Présentée et soutenue par
Baptiste HOUYVET**

Thèse soutenue publiquement le 13 avril 2018 devant le jury composé de

Mme Céline LANDON	Chargé de recherche (HDR) au CNRS, Orléans	Rapporteur
Mr Alain DUFOUR	Professeur des Universités, Université de Bretagne-Sud	Rapporteur
Mr Vianney PICHEREAU	Professeur des Universités, Université de Bretagne-Occidentale	Examineur
Mr Joël HENRY	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
Mme Céline ZATYLNy-GAUDIN	Maître de conférences (HDR) à l'université de Caen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par Céline ZATYLNy-GAUDIN, laboratoire UMR BOREA

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Physiologie et Biologie des organismes-Populations-Interactions

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Identification de peptides antibactériens d'origine marine :
Amélioration de la qualité et de la survie du naissain d'huître.**

**Présentée et soutenue par
Baptiste HOUYVET**

Thèse soutenue publiquement le 13 avril 2018 devant le jury composé de

Mme Céline LANDON	Chargé de recherche (HDR) au CNRS, Orléans	Rapporteur
Mr Alain DUFOUR	Professeur des Universités, Université de Bretagne-Sud	Rapporteur
Mr Vianney PICHEREAU	Professeur des Universités, Université de Bretagne-Occidentale	Examineur
Mr Joël HENRY	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
Mme Céline ZATYLNKY-GAUDIN	Maître de conférences (HDR) à l'université de Caen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par Céline ZATYLNKY-GAUDIN, laboratoire UMR BOREA

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le docteur Céline Zatylny-Gaudin, pour m'avoir tant enseigné. Je voudrais la remercier d'avoir cru en moi et de m'avoir appris la chose la plus essentielle, savoir se poser la bonne question. Je serai éternellement reconnaissant pour le soutien que j'ai eu tout au long de cette thèse, dans les pires moments comme les meilleurs. Je la remercie pour toute l'expérience qu'elle a volontiers partagée et enfin de m'avoir créé un avenir et de m'y avoir préparé.

Je voudrais remercier Madame Céline Landon, chargée de recherche au centre de biophysique moléculaire CNRS à Orléans, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en étant rapporteur de cette thèse.

Monsieur Alain Dufour, Professeur des Universités de Bretagne-Sud a accepté d'être rapporteur de cette thèse, je l'en remercie vivement.

Je remercie Monsieur Vianney Pichereau, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également le professeur Joël Henry avec qui j'ai fait mes premiers pas dans ce monde de la recherche. C'est à ses côtés que j'ai pris goût pour cet univers, grâce à sa bonne humeur et son éternel optimisme. Je le remercie également pour nos nombreuses discussions tant sur les fameux peptides qui entretiennent autant d'interrogations que sur les secrets de la permaculture.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Blandine Diss, pour m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'intégrer la SAT'MAR. Je me souviens de cet entretien qui remonte à plus de 5 ans maintenant, il aura été finalement décisif.

Je tiens à remercier mon encadrante de la SAT'MAR, Emilie Vetois directrice de l'écloserie de Gatteville pour tout le soutien qu'elle m'a apporté et la confiance qu'elle m'a vite accordée. L'énergie qu'elle a investie dans nos différents projets de recherche a été une source de motivation supplémentaire. Enfin, je la remercie pour tous ses encouragements, particulièrement dans les moments difficiles.

Je remercie également le Directeur Générale de la SAT'MAR, Bertrand Du Mesnilot, qui s'est d'abord volontiers intéressé à mes travaux puis s'est très vite investi pour me proposer un avenir au sein de l'entreprise.

Je souhaite adresser mes remerciements à la direction de l'UMR BOREA localisée à Caen pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens à remercier Yolande Bouchon-Navaro et Claude Bouchon de l'Université des Antilles, pour m'avoir permis de travailler sur ce modèle au combien fascinant qu'est le poisson-lion.

Je souhaite remercier Benoît Bernay ainsi que Julien Pontin, les deux étant à présent indissociables pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée. Les nombreuses analyses à la plateforme PROTEOGEN n'auraient pas été possibles sans eux. Je les remercie également pour les agréables moments passés au café en leur compagnie et pour leur soutien.

Que Sandra Sritharan, qui a largement participé au bon déroulement de ces travaux trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance. Sa gentillesse et sa bienveillance pour les étudiants sont exemplaires. Gracias.

Je voudrais remercier Myriam Tayou et Catherine Eudes pour leur bonne humeur, les bons moments que nous avons passés ensemble et enfin pour toutes « les épines du pied » qu'elles nous retirent au quotidien.

Je remercie Bertrand Leroy de la structure ALGOBANK pour ses précieux conseils et enseignements au sujet des microalgues.

Je tiens à remercier Marie-Pierre Dubos pour sa disponibilité, sa bonne volonté et le soutien qu'elle apporte aux étudiants.

Je remercie également Christophe Roger, pour son aide technique et sa bonne humeur communicative.

Je souhaite également remercier Fabienne Marais pour son soutien technique ainsi que Beatrice Adeline pour son savoir-faire en histologie.

Par ailleurs, je remercie l'ensemble du corps enseignant du laboratoire avec qui j'ai pu interagir, en particulier pour avoir partagé ses connaissances.

Je remercie les membres de la « Sepia Team » : Valérie Cornet, qui a volontiers partagé son savoir-faire, ses compétences et qui a su me mettre sur la bonne voie. A côté, Alexandre Leduc dit « Pépé » pour tous ses enseignements dans la vie comme dans les sciences de la vie.

Et enfin, Maxime Endress alias « Pops » pour sa bonne compagnie. Ensemble, ces années demeurent d'autant plus inoubliables.

Je voudrais également remercier Théo Lancelot et Anna Mercado Villavicencio pour avoir participé aux travaux de ma thèse, je suis reconnaissant pour leur motivation et leur investissement.

Un grand merci à l'ensemble des étudiants qui ont animé le quotidien de ces 3 années de thèse. Les moments de rire ensemble ont été de précieux bols d'air. Par cohortes : Marie Robert, Stéphanie Lemesle, Alexis Seguin, Aurore Raoux, Aurore Sauvey, Julie Schwartz, Maëva Chérif Feïldel, Daniel Koua N'zi, Vanhuysse Charles, Lorane Le Franc, Floriane Maillard et Louis Benoist.

Je remercie également l'ensemble des membres de la SATMAR qui ont participé de près ou de loin à ces travaux : Yolande, Elodie, Michelle, Sabine, Fiona, MC, Alicia, Prune, Sophie, Pierre, Michel, Guillaume, Thibault, Yves et Philippe.

Enfin, ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mes parents qui m'ont aidé et soutenu. Leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers de ce que je suis et de ce que je fais. Je ne saurais leur exprimer ma reconnaissance. Je remercie également Maïté et Gérard pour leur soutien. Pour finir, je remercie le docteur Laura Gribouval pour m'avoir enseigné à positiver et pour le soutien qu'elle m'apporte.

Table des matières

A. Contexte de la thèse	1
B. L'objectif de la thèse	2
Introduction générale	5
A. Présentation de l'huître creuse, <i>Magallana gigas</i>	7
1. Généralités	7
1.1. Classification	7
1.2. Quelques généralités & Cycle de vie de l'huître	8
2. Pathogènes de l'huître et alternatives	12
2.1. Les virus	12
2.2. Les Vibrios	12
2.3. Système immunitaire de l'huître	13
2.4. Quels sont les alternatives permettant de lutter face aux infections en aquaculture et notamment en éclosion ?	17
B. Les peptides Antimicrobiens	20
1. Historique et présentation générale	20
1.1. Les Bases de données dédiées aux peptides antimicrobiens	21
1.2. Qu'est-ce qu'un Peptide Antimicrobien ?	24
Les peptides antimicrobiens à hélice- α	26
Les peptides antimicrobiens riches en cystéines	28
Les peptides antimicrobiens riches en certains acides aminés	32
Les peptides antimicrobiens plus atypiques	33
1.3. Les différents modes d'actions des peptides antimicrobiens	34
le modèle « des pores en douves de tonneaux »	35
Le modèle « des pores toroïdaux »	36
Le modèle « en tapis »	36
1.4. Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens	38
Chapitre I : Identification de PAMs chez le poisson-lion, <i>Pterois volitans</i>	43
A. Introduction	45
1. Présentation du modèle <i>Pterois volitans</i>	45
1.1. Classification	46
1.2. Mode de vie	49
1.3. Cycle de vie	50
1.4. Le poisson-lion : une espèce invasive	52
1.5. Connaissance immunité et les maladies associées	52
2. Système immunitaire des poissons téléostéens	53
2.1. La peau des poissons	56
3. Objectifs	60

B. Les PAMs riches en cystéines chez les poissons	61
1. Etat de l'art	61
2. Les PAMs riches en cystéines identifiés chez le poisson venimeux, <i>Pterois volitans</i> .	66
3. Conclusion: PAMs riches en cystéines	77
C. Les PAMs spécifiques des poissons : Les piscidines	79
1. État de l'art	79
2. Identification d'un peptide antimicrobien, une « moronecidine-like » chez le poisson venimeux <i>Pterois volitans</i> : étude fonctionnelle et structurale de la pterocidine- α .	85
3. Identification de deux nouveaux précurseurs apparentés aux piscidines chez le poisson-lion, <i>Pterois volitans</i> : les pterocidines B et C	93
3.1. Introduction	94
3.2. Matériels et méthodes	95
2.2.1 Matériel biologique	95
2.2.2 Analyse in silico du transcriptome de <i>Pterois volitans</i>	95
2.2.3 Recherche des formes matures des pterocidines β et γ .	96
2.2.4 Sélection et synthèse des peptides à partir des pterocidines B et C	96
2.2.5 Tests antibactériens	97
2.2.6 Tests hémolitiques	97
2.2.7 Etude structurale par dichroïsme circulaire	98
3.3. Résultats et discussion	98
3.4. Conclusion	102
4. Discussion pterocidines	103
D. Discussion	106
Chapitre II : Identification de PAMs chez la seiche, <i>Sepia officinalis</i>	109
A. Introduction	111
1. Présentation du modèle <i>Sepia officinalis</i>	111
1.1. Classification	111
1.2. Caractéristiques et mode de vie	112
1.3. Cycle de vie de la seiche : une espèce migratrice et semelpare	117
2. Les Céphalopodes face aux infections	121
2.1. Etat de l'art sur les maladies décrites chez les céphalopodes	121
2.2. Le système immunitaire chez les céphalopodes	122
2.3. La peau chez les céphalopodes	124
3. Les Objectifs	125
B. Recherche de peptides antimicrobiens au niveau de la peau	126
1. Introduction	126
2. Matériel et méthodes	127
2.1. Matériel biologique	127
2.2. Extraction peptidique	127

2.3. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)	129
2.4. Test Antibactérien	129
2.5. Réduction, alkylation et digestion trypsique	130
2.6. Séparation en Nano-LC (Liquid-Chromatography)	130
2.7. Analyse en spectrométrie de masse	131
2.8. Traitement Bio-informatique	131
3. Résultats	132
4. Discussion	135
C. Recherche de PAMs chez Sepia officinalis : étude in silico	137
1. Introduction	137
2. Méthode	138
3. Résultats	140
3.1. « Design » de Peptides antimicrobiens chez Sepia officinalis	141
3.2. Résultats des peptides WK ₂₀ , KY ₁₅ , GK ₁₆	153
D. Discussion	154

Chapitre III : Transfert des PAMs en aquaculture et plus particulièrement en éclosionerie

A. Introduction	159
1. L'aquaculture	159
2. Les problèmes liés l'aquaculture	160
2.1. Les antibiotiques	162
2.2. Le potentiel des peptides antimicrobiens en Aquaculture	164
3. Objectifs	165
B. Etude du peptide K4 en milieu marin	166
C. Vers un transfert de PAMs en éclosionerie	186
1. Introduction	186
1.1. La SATMAR	186
1.2. Le site d'accueil de la SATMAR	187
1.3. Le parcours Zootechnique	187
1.4. Transfert de PAMs en éclosionerie	189
2. Approche méthodologique	190
2.1. Peptides candidats	190
2.2. Innocuité des peptides candidats sur du naissain d'huîtres	191
2.3. Innocuité des peptides candidats sur des microalgues utilisées en éclosionerie d'huîtres	191
2.4. Innocuité des peptides candidats sur des larves d'huître	192
3. Résultats	192
4. Discussion	199
D. Conclusion	200

<i>Discussion générale</i>	205
<i>Perspectives</i>	213
<i>Bibliographie</i>	217
<i>Annexes</i>	247

Abréviations

AA : Acide aminé
ABC : ATP Binding Cassette
ACN : Acétonitrile
ACTH : Adrenocorticotropic Hormone
ADN : Acide désoxyribonucléique
AFA : Antifoaming agent
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPs : Antimicrobial Peptides
AMTI : Aquaculture Multi-Trophique Intégrée
APD : Antimicrobial Peptide Database
ARN : Acide Ribonucléique
ATCUN : Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding
BCR : Récepteurs des lymphocytes B
BHI : Brain Heart Infusion
BLAST : Basic Alignment Search Tool
BPI : Bactericidal Permeability-Increasing protein
CAMP : Collection of AntiMicrobial Peptide
CD : Dichroïsme Circulaire
CHCA : Acide-cyano-4-Hydroxy CinnAmique
CIP : Collection de l'Institut Pasteur
CMB : Concentration Minimal Bactéricide
CMC : Concentration Micellaire Critique
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
Col : Columbia
CRD : Cystein Rich Domain
CREC : Centre de Recherches en Environnement Côtier
CRISP : Cysteine Rich Secreted Protein
DAMPD : Dragon Antimicrobial Peptide Database
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
DO : Densité Optique
DRAMP : Data Repository of AntiMicrobial Peptides
DTT : Dithiothréitol
EPPI : Eau Pour Préparation Injectable
ESI : Electrospray Ionization
EU : European Union
FAO : Food and Agriculture Organization
FDA : Food and Drug Administration
FPKM : Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped
GNV : Gill Necrosis Virus
GSP : Glandes Salivaires Postérieures
HSP : Heat Shock Proteins
IRD : Institut de Recherche Pour le Développement
LBP : Lipopolysaccharide Binding Proteins
LEAP : Liver Expressed Antimicrobial Peptide
LPS : Lipopolysaccharides
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
MB : Marine Broth
MEC : Matrice Extracellulaire

Milieu LB : Milieu Luria-Bertani
MW : Molecular Weight
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NEI : NeuroEndocrine-Immune
OsHV1 : Ostreide herpes virus type 1
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAMs : Peptide AntiMicrobiens
PBS : Phosphate Buffered Saline
PDB : Protein Data Bank
PM : Poids Moléculaire
PRD : Prolin Rich Domain
PRRS : Pattern Recognition Receptors
PTSB : Poor Trypticasein Soy Broth
RAG : Recombination Activating Gene
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
RP- HPLC : Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
RSN : Espèce Réactive de l'Azote (N)
SAPLIP : SAPosin-Like Protein
SCP : Small Cardiac Peptide
SMART : Simple Molecular Architecture Research Tool
SPB : Saline Poor Broth
SPE : Solid Phase Extraction
SRA : Archivage de Séquences de Reads
TCR : Récepteurs des lymphocytes T
TFA : Acide Trifluoroacétique
TFE : Trifluoroethanol
TLR : Toll Like Receptor
TSB : Trypticasein Soy Broth
TSB : Trypticasein Soy Broth
UA : Unité d'Absorbance
UV : Ultra-Violet
YADAMP : Yet Another database of AntiMicrobial Peptide

A. Contexte de la thèse

L'huître est une espèce marine très appréciée pour ses qualités gustatives et nutritionnelles (Orban et al. 2004; Dagorn et al. 2016). Elle représente une ressource économique considérable en France et notamment en Normandie. La culture de cette espèce est très ancienne. Des archives font part de son élevage un siècle avant JC (Millin et al. 1813). Un romain nommé Sergius Orata serait à l'origine des premiers élevages d'huîtres sur les bords du Lac Lucrin en Baie de Naples. En France, l'ostréiculture a fait son apparition au XIX^{ème} siècle afin de faire face à une pression de pêche importante menaçant l'huître plate *Ostrea edulis*. Le naturaliste DE Bon, expérimenta les premiers parcs d'élevage, ceux-ci se sont multipliés par la suite, permettant par la même occasion la reconversion d'anciens pêcheurs en ostréiculteurs. Au début du XX^{ème} siècle, le déclin de l'huître plate fut marqué par une épizootie qui décima la quasi-totalité du cheptel. Sa culture fut alors remplacée par celle de l'huître creuse *Crassostrea angulata*. Cette dernière impactée par une nouvelle épizootie en 1971 laissa place à l'huître creuse *Crassostrea gigas*, originaire du Japon, qui reste l'huître la plus produite à ce jour en France.

La culture de l'huître comprend plusieurs étapes nécessitant l'approvisionnement en naissain. Ce dernier est assuré soit par un captage naturel soit par les écloseries. Le captage se fait à l'aide de collecteurs dans les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon, ces régions réunissant toutes les conditions favorables à la reproduction naturelle de l'huître. Pour permettre un approvisionnement dans les régions plus au Nord, des écloseries se sont développées. Il s'agit de structures permettant de maîtriser le cycle de vie de l'huître, de la reproduction jusqu'à l'obtention d'huîtres juvéniles. Cet approvisionnement en naissain par les écloseries est en plein essor. En maîtrisant les différents facteurs abiotiques nécessaires à la culture de l'huître, les écloseries peuvent gérer la disponibilité de naissain sur une période plus étalée le long de l'année. Elles peuvent également proposer du naissain individualisé et donc éviter l'étape de détroquage qui consiste à séparer les individus collés les uns aux autres. Enfin, les écloseries peuvent fournir, sur demande, des lots de tailles homogènes.

Les premiers stades de l'élevage de l'huître creuse *Magallana gigas* (correspondant à la nouvelle dénomination de *Crassostrea gigas* (Salvi and Mariottini 2016) en milieu contrôlé constituent à la fois une étape majeure dans le processus de production de

naissain en éclosion industrielle et un élément déterminant pour l'avenir de l'ostréiculture.

Depuis plusieurs années, des épisodes de mortalités sont observés sur les parcs ostréicoles, liées à la présence de l'herpès virus OsHV-1 et de bactéries du genre *Vibrio* (Labreuche et al. 2010; Peeler et al. 2012; Vezzulli et al. 2014; Renault et al. 2014).

En éclosion et tout particulièrement dans l'éclosion de la SATMAR à Gatteville dont les conditions d'élevage sont certifiées sans OsHV-1, les mortalités sont associées à des vibrioses. S'il n'est pas envisageable ni souhaitable de procéder à un élevage en conditions axéniques, le statut sanitaire en termes de *Vibrio* versus microflore totale est toutefois un paramètre important en éclosion, surtout si la microflore de l'huître participe aux mécanismes de défenses de l'huître (Defer et al. 2013).

Face à ces problématiques, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies de recherche visant à diminuer le ratio des *Vibrios* par rapport à la microflore totale dans les structures d'élevage. Il est vrai que de nombreux travaux ont été réalisés chez l'huître et son système immunitaire, sur le virus OsHV-1 et sur les vibrios afin de comprendre ces mortalités (Bachère et al. 2004; Schmitt et al. 2010, 2012; Labreuche et al. 2010; Vezzulli et al. 2014; Green et al. 2014; Renault et al. 2014). Toutefois, aucun travail n'a porté sur la recherche de solutions face aux *Vibrios* et notamment en éclosion dans des conditions d'élevage contrôlées et sur des stades de développement de l'huître dits sensibles (stades larvaires et naissain).

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'identifier des molécules bioactives d'origine marine de nature peptidique afin de diminuer le ratio de *Vibrionacea* par rapport à la microflore totale au sein des structures d'élevages de la SATMAR.

B. L'objectif de la thèse

Les travaux de cette thèse portent sur l'identification de molécules capables d'abaisser la charge bactérienne associée aux 1ers stades d'élevages chez l'huître creuse, *Magallana gigas* en conditions contrôlées, l'objectif étant l'optimisation de la qualité et de la survie du naissain. Pour cela, nous nous sommes focalisés principalement sur la recherche de peptides antibactériens à partir des organismes marins. L'origine marine des peptides est un élément clé dans notre stratégie qui vise à appliquer ces molécules en conditions salines. L'objectif final étant de trouver une alternative efficace dans la lutte contre les infections bactériennes et respectueuse de l'environnement. Ces travaux de thèse ont été

réalisés principalement au laboratoire de l'UMR BOREA « Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques » situé à Caen sous la direction du Docteur Céline Zatylny-Gaudin (HDR). Des expériences *in situ* dans l'écloserie de la SATMAR « Société ATLantique de MARiculture » ont complété cette étude. Elles ont été supervisées par Emilie Vetois, la directrice de l'écloserie.

L'introduction générale présente dans un premier temps l'un de nos modèles d'étude, l'huître creuse, *Magallana gigas*. Puis, nous présentons de manière non exhaustive les peptides antimicrobiens en se focalisant principalement sur les peptides d'origine marine.

Le premier chapitre s'intéresse à l'identification de peptides antibactériens chez un second modèle d'étude le poisson-lion, *Pterois volitans*. Ce modèle vertébré Téléostéens est une espèce invasive en mer des Caraïbes ; il ne semble pas être sensible aux maladies. Par ailleurs, aucune donnée concernant son système immunitaire n'a auparavant été réalisée. Par des approches transcriptomique et peptidomique, nous avons identifié de nouveaux peptides antibactériens.

Le second chapitre porte sur la recherche de peptides antimicrobiens chez la seiche *Sepia officinalis*. L'approche classique associant la chromatographie liquide à haute performance et des tests antibactériens n'ayant pas permis d'identifier ces peptides, une approche *in silico* a été menée.

Le troisième chapitre a pour objectif de mettre au point les conditions de transfert en écloserie des peptides antibactériens non hémolytiques identifiés dans les chapitres précédents.

Pour finir, l'ensemble des résultats sera discuté dans la discussion générale qui abordera également les perspectives de ce travail.

Introduction générale

A. Présentation de l'huître creuse, *Magallana gigas*

1. Généralités

1.1. Classification

L'huître creuse *Magallana gigas* fait partie des Mollusques tout comme la seiche *Sepia officinalis*, présentée dans le second chapitre de cette thèse. Le phylum des Mollusques est l'un des plus larges et des plus diversifiés au sein du règne animal, avec plus de 50 000 espèces décrites dont plus de la moitié sont marines (Gosling 2003). Les Mollusques sont des métazoaires triploblastiques, protostomiens, lophotrochozoaires (Figure 1). Ils se caractérisent notamment par la disparition de la métamérisation et par la présence d'un corps mou protégé plus ou moins par une coquille. L'huître fait partie des bivalves, l'une

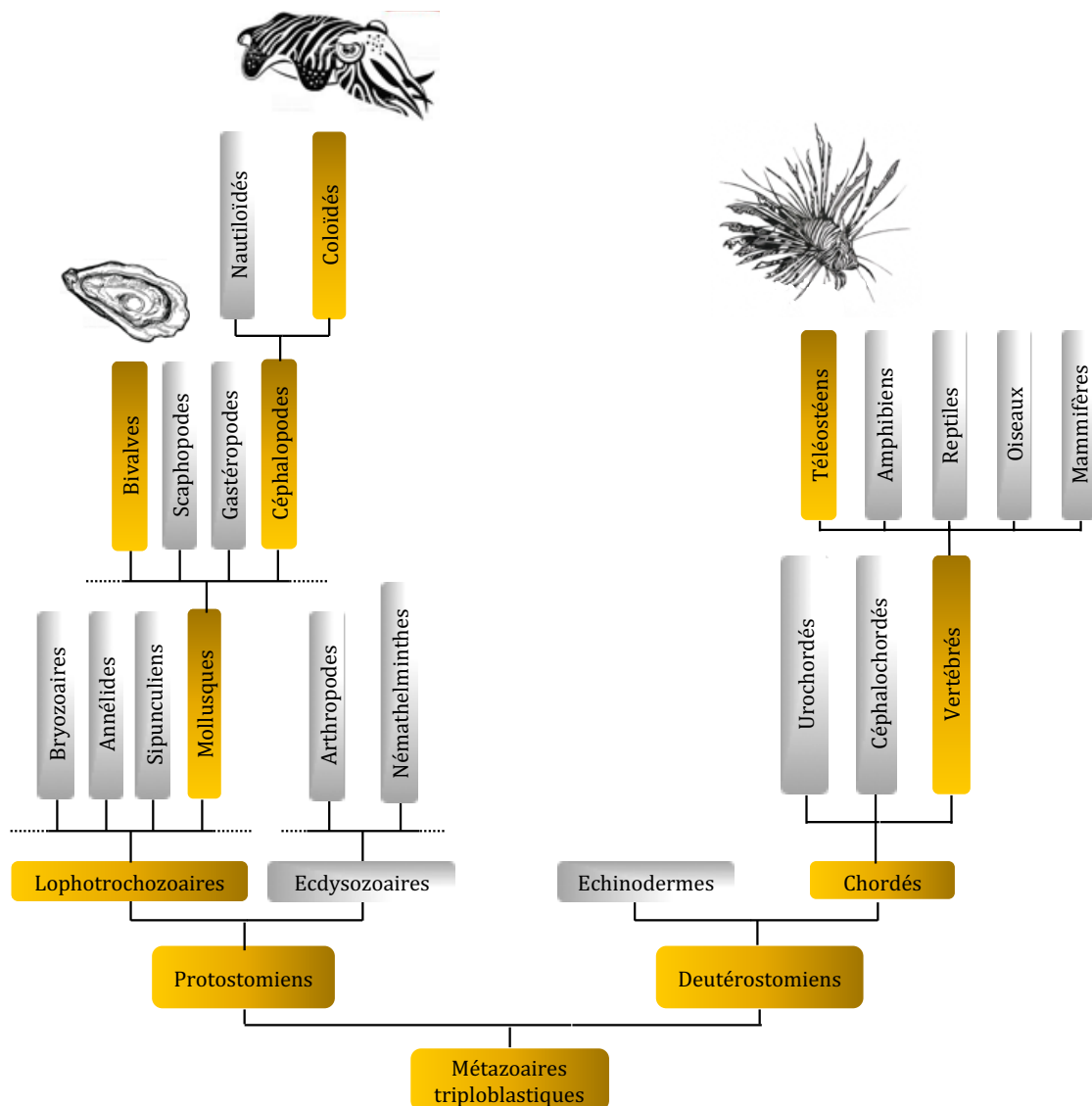


Figure 1 : Arbre phylogénétique replaçant les Bivalves par rapport aux Céphalopodes ainsi qu'aux Téléostéens, parmi les Métazoaires Triploblastiques.

des 6 classes contenues dans ce phylum. Les bivalves ont un corps aplati, protégé par une

coquille constituée de deux parties distinctes, les valves, qui peuvent être plus ou moins symétriques (Figure 2).

1.2. Quelques généralités & Cycle de vie de l'huître



Figure 2 : L'huître creuse, *Magallana gigas*. La coquille externe se compose d'une épivalve (plate) et d'une hypovalve (creuse), il s'agit des valves qui se ferment hermétiquement pour que l'huître puisse supporter des temps d'exondation importants. De gauche à droite, les stries en arc témoignent de la croissance. Les arcs se rétrécissent au fur et à mesure que l'on regarde vers la charnière, dont la fonction est de permettre l'ouverture et la fermeture de l'huître. Pour finir, l'umbo vient compléter l'anatomie externe de l'huître, qui est la même pour les mâles et femelles puisqu'il n'y a pas de dimorphisme sexuel.

L'huître creuse *Magallana gigas* est exclusivement aquatique. Elle est capable toutefois de survivre à des exondations prolongées. C'est une espèce euryhaline et eurytherme présente dans les diverses mers et océans du globe Figure 3. L'huître connaît deux biotopes dans sa vie, le pelagos et le benthos. L'huître a un cycle de vie très influencé par les facteurs abiotiques. C'est d'ailleurs pour cette raison que le captage naturel n'est pas une pratique généralisée sur l'ensemble des côtes françaises. Les géniteurs matures sexuellement libèrent leurs gamètes directement dans le milieu environnant. La libération des gamètes mâles se fait de manière passive tandis que la femelle expulse les ovocytes, plus lourds et plus denses grâce à de grands battements larvaires permis par le muscle adducteur (Foighil and Taylor 2000). Chez cette espèce à stratégie « R » la libération des gamètes est régulée par des facteurs abiotiques ainsi que des facteurs de régulation de la ponte associés aux produits génitaux (Galtsoff 1938). La régulation permet la synchronisation des pontes qui est essentielle au succès reproductif de l'espèce. Bernay et collaborateurs (2006) ont mis en évidence l'effet myotrope d'un peptide

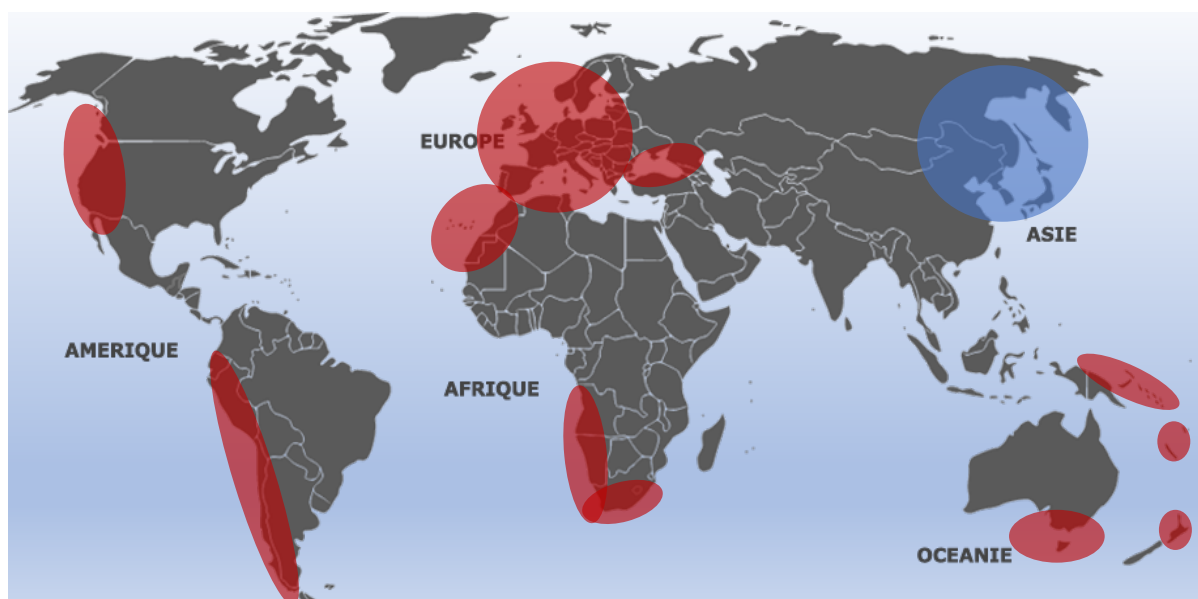


Figure 3 : Distribution géographique de l’huître japonaise, *Magallana gigas* à travers les différents océans et différentes mers. En bleu, les régions natives de l’huître creuse. En rouge, les régions d’introduction pour sa culture. Adapté de [Molnar et al., 2008](#).

ovarien sur le muscle adducteur des géniteurs matures. Ce peptide, de séquence PIESVD et issu de la vitellogénine de l’huître, participerait au déclenchement de la ponte ([Houyvet, 2014](#)). Depuis, L’ELH (Egg Laying Hormone) de l’huître *M. gigas* a été identifiée à partir du génome ([Stewart et al. 2014](#)) mais son activité biologique n’a pour le moment pas été étudiée.

La fécondation de l’ovocyte par le spermatozoïde aboutit à la formation de l’œuf, cela constitue le point de départ du cycle de vie de l’huître ([Figure 4](#)). L’œuf se segmente par succession de mitoses, les stades morula, blastula puis gastrula s’enchaînent. L’apparition de la larve trochophore met fin au développement embryonnaire d’une durée de 6 heures. Cette larve trochophore ciliée se déplace en tournant sur elle-même. Au bout de 24 heures, elle évolue en larve D (sa forme est celle de la lettre de D qui correspond à la future coquille). A ce stade, la larve nage avec un velum. Le développement larvaire se poursuit avec le stade de « larve véligère » ou larve à umbo, cela correspond à la future charnière. La Larve continue son développement. Une vingtaine de jours après la fécondation, apparaît un point noir sur la future coquille ([Figure 4](#)) correspondant à la larve œillet. Juste après le stade pédivéligère distingué par l’apparition du pied, la larve entre en métamorphose. L’acquisition du pied est essentiel, il permet à la larve de se déplacer sur

le substrat afin de choisir son lieu de fixation. Il est également à l'origine de la sécrétion d'un ciment nécessaire à l'ancrage de la future huître.

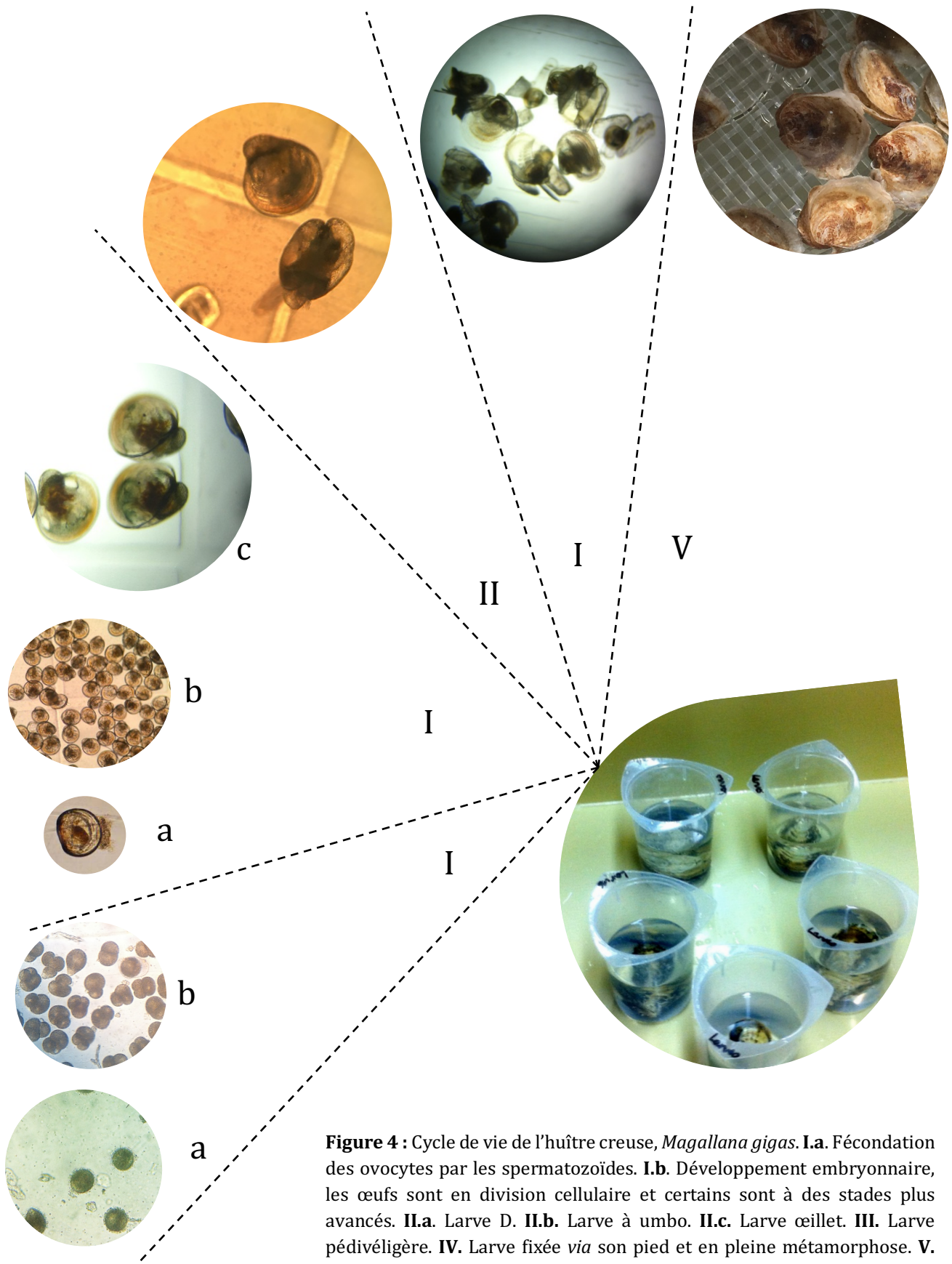


Figure 4 : Cycle de vie de l'huître creuse, *Magallana gigas*. **I.a.** Fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes. **I.b.** Développement embryonnaire, les œufs sont en division cellulaire et certains sont à des stades plus avancés. **II.a.** Larve D. **II.b.** Larve à umbo. **II.c.** Larve œillet. **III.** Larve pédiveligère. **IV.** Larve fixée via son pied et en pleine métamorphose. **V.** Naissain d'huître.

Une fois métamorphosée, la larve quitte son mode de vie planctonique pour une vie sédentaire. L'huître se nourrit en tant qu'organisme suspensivore par filtration. Elle consomme essentiellement du phytoplancton. Les branchies jouent un rôle essentiel non seulement dans la respiration mais également dans la nutrition. Elles assurent le tri des particules en suspension. Les taux de filtration d'une huître peuvent atteindre plusieurs litres d'eau de mer par heure, cela dépend surtout de la taille des particules et de leur concentration ([Gerdes 1983](#)). Une fois le tri effectué en fonction de la taille des particules, ce qui n'est pas conservé est rejeté sous forme de pseudo-fèces, le reste est assimilé *via* le tractus digestif ou évacué sous forme de fèces.

2. Pathogènes de l'huître et alternatives

Depuis les années 2000, le secteur de l'ostréiculture connaît une crise qui freine son économie. En effet des mortalités massives touchent l'ensemble des sites. Avec le mode de nutrition par filtration, les huîtres sont d'avantage exposées aux microorganismes et notamment aux agents infectieux. La flore bactérienne d'une huître est riche, suggérant que les agents responsables des infections sont des pathogènes opportunistes ([Thompson et al. 2006](#)). Toutefois même si des pathogènes sont associés aux mortalités, ces dernières restent multifactorielles. Elles dépendent également de facteurs abiotiques, de la qualité de l'eau impactée par l'anthropisation et l'eutrophisation et des pratiques ostréicoles peu raisonnables (densités trop importantes, multiples transferts entre zones d'élevage). Ces éléments constituent ensemble des conditions propices au développement des maladies.

2.1. Les virus

Certains virus sont reconnus comme étant associés aux mortalités de l'huître, le GNV (Gill Necrosis Virus) en est un exemple puisqu'il a été rendu responsable des épizooties qui ont entraîné la raréfaction de *Crassostrea angulata* sur les côtes françaises ([Comps 1988](#)). Plus récemment c'est le virus OsHV1 (Ostreïde herpès virus type 1) qui semble être la piste la plus privilégiée pour expliquer les mortalités massives sur l'ensemble des côtes et bassins français ([Renault et al. 2014](#)). Une étude très récente s'est intéressée au lien entre les canaux anioniques à voltage-dépendance (une protéine clé au niveau des mitochondries) et l'infection de *M. gigas* par le virus OsHV-1 ([Delisle et al. 2018](#)). Les auteurs proposent de suivre ces canaux afin de mesurer la sensibilité des huîtres face au virus en conditions réelles ([Delisle et al. 2018](#)). Par ailleurs, si un virus de type Herpès a pu être détecté au sein de larves d'écloseries françaises ([Nicolas et al. 1992](#)) dans l'écloserie de la SATMAR à Gatteville, l'élevage est contrôlé en routine et est certifié sans virus. En revanche la présence de bactéries du genre *Vibrio* a été associée aux mortalités rencontrées sur le site.

2.2. Les Vibrios

La famille des Vibrionnacea est constituée de bactéries aquatiques couvrant tous les biotopes, des eaux douces et saumâtres aux eaux marines profondes, ces bactéries sont retrouvées sur l'ensemble du globe. Les *Vibrios* sont retrouvés dans le tractus digestif ainsi qu'au niveau de la peau de nombreux organismes marins comme le saumon ([Yoshimizu & kimura 1976](#)), le crabe *Callinectes sapidus* ([Davis and Sizemore 1982](#)) ou

encore la crevette *Penaeus merguensis* ou *Litopenaeus vannamei* (Oxley et al. 2002; Vandenberghe et al. 1999) et l'huître (Olafsen et al. 1993). Certains microorganismes participent par ailleurs à la défense de leur hôte (Defer et al. 2013). D'autres sont clairement impliqués dans des symbioses comme *Vibrio fischeri* avec *Euprymna scolopes* au niveau de l'organe de lumière (McFall-Ngai and Ruby 1991) ou *Vibrio halioticoli* avec l'ormeau *Haliotis discus hannai* (Thompson et al. 2006).

Si des espèces de ce clade sont bénéfiques et importantes pour les espèces aquacoles, certaines d'entre elles sont cependant particulièrement pathogènes. C'est le cas par exemple de *Vibrio pectinica* pathogène de larves de coquilles saint-jacques, *Pecten maximus* (Lambert et al. 1998). Cette bactérie sécrète une toxine stable à la chaleur et aux protéases qui détruit les hémocytes (Lambert et al. 2001). *Vibrio tapetis* est l'agent responsable de l'anneau brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* (Park et al. 2006). L'adhésion de ce *Vibrio* à la lame périostracale entraîne la décalcification de la coquille et provoque le dépôt brun caractéristique. Une étude récente s'est intéressée pour la première fois à la caractérisation du biofilm formé lors de l'infection (Rodrigues et al. 2015). Les auteurs ont également montré que les températures supérieures à 21°C inhibent le développement de l'anneau brun tandis que des salinités inférieures à 2‰ le favorisent. Ils concluent que le biofilm serait peut-être plus utile au maintien de *V. tapetis* chez son hôte qu'au développement même de la maladie (Rodrigues et al. 2015). Chez les huîtres, différents pathogènes ont été répertoriés selon les stades ou l'âge. Ainsi *Vibrio tubiashii* est virulent sur les larves d'huîtres d'écloseries (Travers et al. 2014). Des métalloprotéases à zinc pourraient intervenir dans cette virulence (Mersni-Achour et al. 2014) ainsi que d'autres facteurs toxiques (Mersni-Achour et al. 2015). *Vibrio splendidus* a été signalé comme étant associé aux mortalités massives du naissain survenant en été (Lacoste et al. 2001). Et sur les adultes, *Vibrio aestuarianus* est impliqué dans leurs mortalités par la sécrétion de la Vam métalloprotéase (Labreuche et al. 2010). Les sécrétomes de *Vibrio tapetis* et *Vibrio aestuarianus* ont été caractérisés (Madec et al. 2014). La plupart des protéines identifiées sont associées à la membrane externe ou periplasmique comme les porines ou adhésines intervenant dans la virulence.

2.3. Système immunitaire de l'huître

L'huître est en permanence au contact de diverses bactéries, parmi elles certaines sont commensales alors que d'autres sont saprophytes ou pathogènes. Lorsque les conditions sont favorables pour ces bactéries saprophytes ou pathogènes elles se multiplient de

façon à infecter l'organisme (Ellis 2001). Mais en condition normale, les huîtres ont la capacité de se défendre face à ces agents infectieux grâce à leur système immunitaire inné (Bachère et al. 2004; Schmitt et al. 2011, 2012; Wang et al. 2017).

Ce dernier comprend deux types de réponse immunitaire : une réponse cellulaire et une réponse humorale. La réponse immunitaire cellulaire inclut l'encapsulation et la phagocytose par les hémocytes circulants. La destruction du pathogène est ensuite assurée par des enzymes, des peptides antimicrobiens ou par la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (Figure 5). La réponse humorale s'effectue au sein du système circulatoire, semi-ouvert chez l'huître. Cette réponse repose sur la reconnaissance des pathogènes présentant des PAMPs « Pathogen-Associated Molecular Patterns » reconnus

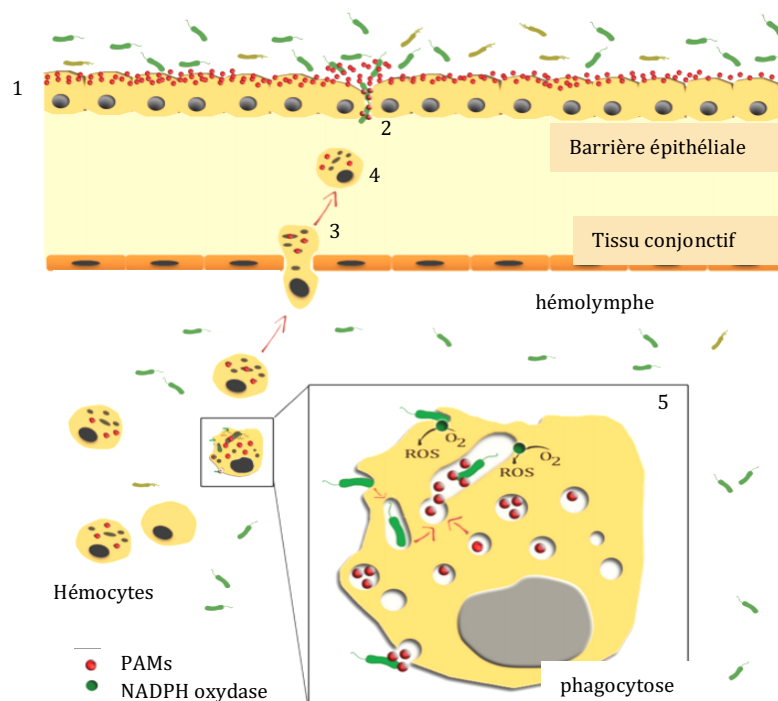


Figure 5 : Schéma illustrant la défense antimicrobienne de l'huître, selon (Schmitt et al, 2012). 1. L'épithélium est en contact avec une microflore abondante. Une huître saine produit des PAMPs afin de prévenir les infections par des organismes pathogènes. 2. En cas de lésion ou d'infection, les PAMPs sont reconnus par les PRRs, ce qui entraîne le recrutement des hémocytes. 3. Infiltration hémocytaire au site d'infection ou de lésion. 4. Les hémocytes servent de vésicules de transport pour les PAMPs qui agissent en synergie avec les PAMPs produits par l'épithélium. 5. Les hémocytes peuvent également phagocyter les pathogènes et les éliminer à l'aide des espèces réactives oxygénées (ROS), d'enzymes ou de PAMPs.

par des PRRs « Pattern Recognition Receptors ». Cette reconnaissance déclenchera la production et la libération d'effecteurs immunitaires (Akira et al. 2006).

Très récemment, Le système immunitaire de l'huître a été revu dans son ensemble mettant en évidence l'ensemble des effecteurs immunitaires ainsi que l'implication du complexe NEI (NeuroEndocrine-Immune) (Wang et al. 2017).

Parmi les PRRS connus on retrouve, les récepteurs Toll-likes, les lectines, les protéines reconnaissant les peptidoglycanes et les protéines de liaisons aux Bactéries à Gram négatif. Parmi ces dernières, certaines se lient aux Lipopolysaccharides LPS ou au β -1, 3-glucanes (Wang et al. 2017).

Par ailleurs, les différentes voies de signalisations entraînant une réponse immunitaire ont également été rapportées (Wang et al. 2017). Elles incluent :

- La voie Toll/NF- κ B
- La cascade de signalisation MAP Kinases
- La voie du système complément

La réponse induite par ces différentes voies consiste en la libération d'effecteurs tels que le lysozyme, la glutathionne-S-transférase, de nombreuses cytokines, des protéines de stress (HSP) et également des peptides antimicrobiens (Schmitt et al. 2012; Wang et al. 2017).

Schmitt et collaborateurs (2012) ont répertorié les différents Peptides Anti-Microbiens (PAMs) identifiés chez *M. gigas*. Parmi eux il y a 3 défensines, 3 Big-défensines, 2 PAMS riches en prolines et 1 BPI (Bactericidal permeability-increasing protein). A l'exception d'une des défensines exprimées dans le manteau, tous les autres PAMs sont exprimés par les hémocytes (Schmitt et al. 2012). Certains sont par ailleurs produits de manière constitutive lorsque d'autres sont induits par la présence de pathogènes (tableau 1) (Schmitt et al. 2012).

Tableau 1. Peptides/protéines antibactérien(ne)s identifiés chez *Magallana gigas*.

Type	Nom	PM (Da)	lieu d'expression	Type d'expression
Defensines	Cg-Defm	4,6	manteau	constitutive
	Cg-Defh1	4,7	Hémocytes	constitutive
	Cg-Defh2	4,6	Hémocytes	constitutive
Big defensines	Cg-BigDef1	10,7	Hémocytes	Inductible
	Cg-BigDef2	9,8	Hémocytes	Inductible
	Cg-BigDef3	9,7	Hémocytes	constitutive
Riche en prolines	Cg-IgPrp	1,8	Hémocytes	Réprimée
	Cg-stPrp	1,5	Hémocytes	Réprimée
"Bactericidal Permeability-Increasing" protéine	Cg-BPI	50,1	Hémocytes	Inductible

PM : Poids Moléculaire.

Chez l'huître, les hémocytes jouent un rôle très important, d'autant plus important que le plasma de l'huître semble pauvre en PAMs (Schmitt et al. 2012). Lors d'une lésion, en tant que cellules circulantes les hémocytes se déplacent au niveau du site d'infection (Figure 6). Duperthuy et collaborateurs (2010) ont réalisé un travail permettant d'expliquer comment un pathogène tel que *Vibrio splendidus* LGP 32 (Lacoste et al. 2001) est capable d'infecter l'huître. Chez *V. Splendidus* LGP32, le gène codant pour la porine OmpU est décrit comme étant un effecteur majeur dans l'interaction *Vibrio splendidus*/ *Magallana gigas* (Duperthuy et al. 2010).

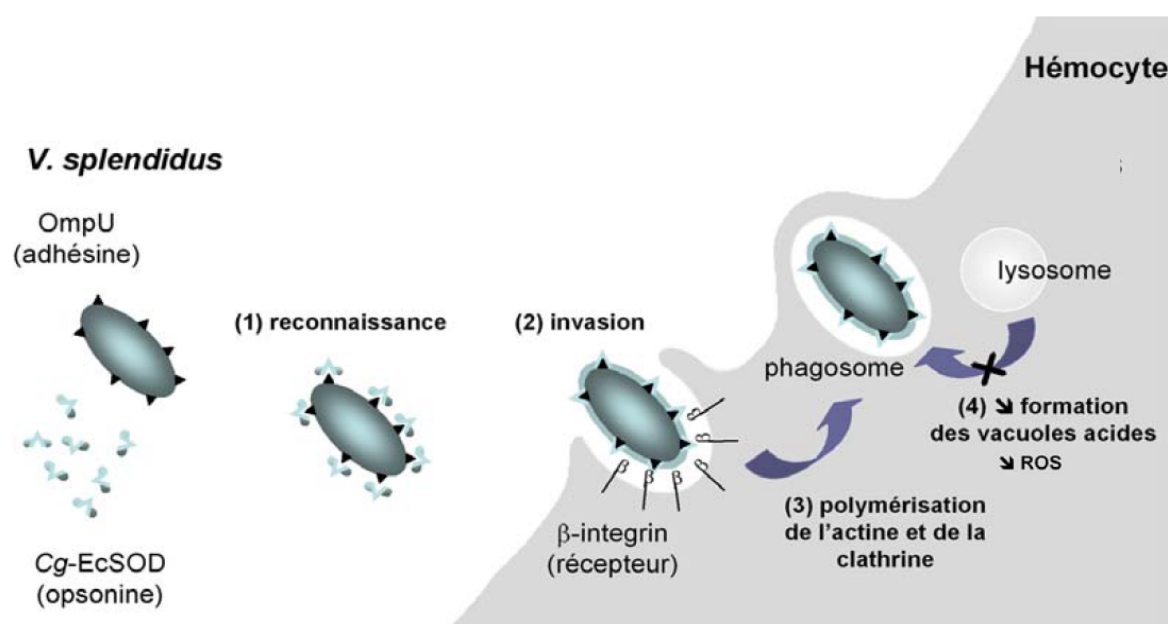


Figure 6 : Modèle d'invasion des hémocytes de *M.gigas* par *V.splendidus*. Le mécanisme d'invasion des hémocytes est dépendant de la β -intégrine présente à leur surface, de Cg-EcSOD en tant qu'opsonine et de la porine OmpU en tant qu'adhésine chez *V. splendidus*. Dans ce modèle proposé par Duperthuy et collaborateur (2010), 1. OmpU de *V. splendidus* est reconnu par la Cg-EcSOD de *M. gigas*. 2. la β -intégrine signale la présence de *V. splendidus* qui est alors internalisé. 3. L'internalisation dépend de l'actine et de la clathrine. 4. Après internalisation, *V. splendidus* inhibe la formation de vacuoles acides et la production de ROS par les hémocytes.

2.4. Quels sont les alternatives permettant de lutter face aux infections en aquaculture et notamment en éclosion ?

Face à l'émergence de maladies associées aux bactéries et notamment au genre *Vibrio* en aquaculture, il devient crucial de développer des solutions. Les antibiotiques font actuellement partie des solutions permettant de lutter contre les infections bactériennes en aquaculture. Mais, n'étant pas une solution toujours approuvée, il est nécessaire de proposer d'autres alternatives plus respectueuses de l'environnement. Une partie dédiée aux antibiotiques (utilisations et conséquences) sera développée dans le chapitre III. Les

pertes économiques importantes rencontrées en aquaculture conduisent certains chercheurs à s'intéresser au développement d'alternatives. Quelques-unes d'entre-elles ont été décrites par Defoirdt et collaborateurs (Defoirdt et al. 2007). Toutes les alternatives ne sont pas exposées ici, seuls quelques exemples sont présentés.

L'une des solutions envisagées concerne l'utilisation de phages. Découverts, au début du XXème siècle et malgré leur efficacité avérée, les bactériophages ont été mis de côté par le succès des antibiotiques. Les phages sont des virus que l'on trouve dans les zones particulièrement riches en bactéries. Ils utilisent ces dernières pour se développer (Defoirdt et al. 2007). Le spectre d'action d'un phage étant très étroit ou spécifique d'une cible, cela constitue une limite à leur utilisation notamment par l'acquisition de résistance (Defoirdt et al. 2011). Par ailleurs l'une des craintes vis-à-vis de leur potentielle utilisation concerne le transfert de gène virulent. Il a été montré que la présence de phages augmentait de manière significative la virulence notamment de *Vibrio harveyi* chez les pénéides (Austin et al. 2003).

Plus récemment, Yamaichi et collaborateurs (2009) se sont appuyés sur une caractéristique commune et propre aux *Vibrios*, le gène *rctB*. Les vibrios ont la particularité de posséder 2 chromosomes circulaires (Trucksis et al. 1998; Yamaichi et al. 1999) dont la réplication du plus petit des deux dépend du gène *rctB* (Yamaichi et al. 2009). Les auteurs ont identifié la vibrepine (1,1,2,2 -tetracarbonitrile) pour « vibrio replication inhibitor ». Cette molécule bloque le gène *rctB* et entraîne l'inhibition de croissance de *Vibrio cholera* et tous les autres vibrios testés comme *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* à des MICs très basse de 0,4-2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Yamaichi et al. 2009). Peut-être que la limite de cette solution est son efficacité et son large spectre. L'objectif étant de limiter la prolifération d'une population à risque et non de faire des cultures axéniques.

D'autres stratégies visent à cibler les mécanismes liés aux facteurs de virulence et notamment interférer au niveau du Quorum sensing c'est-à-dire au niveau de la communication entre les différentes cellules bactériennes. Cette dernière est effectivement nécessaire à la coordination de l'expression de certains gènes d'intérêt (Defoirdt et al. 2011). Pour interférer avec le Quorum sensing, l'utilisation d'antagonistes capables de supprimer l'expression de certains gènes a été démontrée avec l'action de la furanone halogénée sécrétée par une algue, *Delisea pulchra* (Manefield et al. 1999). Elle empêche la colonisation de l'algue par les bactéries. D'autres molécules ciblent

directement les messagers chimiques. C'est le cas de la lactonase, une enzyme sécrétée par une espèce du genre *Bacillus* (Defoirdt et al. 2011).

Les bactériocines sont des peptides produits par des bactéries. Elles sont produites par synthèse ribosomique et sont connues pour leur activité antibactérienne. Les bactériocines les plus connues sont issues des bactéries lactiques et sont déjà couramment utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour la préservation des aliments. Elles sont reconnues comme étant sans danger pour l'homme (Karpiński and Szkaradkiewicz 2013). L'avantage de la bactériocine c'est qu'elle peut être utilisée seule (purifiée) ou avec la bactérie productrice en tant que probiotique. Des études très récentes s'intéressent à l'identification de bactéries lactiques à potentiel probiotique chez l'huître creuse (Kang et al. 2017). Rodrigues et collaborateurs (2014) ont par ailleurs démontré qu'une bactérie du genre *Pseudoalteromonas* était capable avec un peptide l'alterocine de réduire la vitesse de formation d'un biofilm de *V. tapetis* (Rodrigues et al. 2014). Cela constitue des éléments encourageants dans la lutte contre les infections en aquaculture et notamment contre l'anneau brun causé par *Vibrio tapetis* chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* (Park et al. 2006).

Les PAMs sont des molécules produites par tous les êtres vivants, des bactéries jusqu'aux mammifères en passant par les plantes, afin de protéger l'hôte contre les agents infectieux. Ils peuvent être actifs contre les bactéries, les champignons, les virus et les protozoaires (Zasloff 2002; Boman 2003; Hancock and Sahl 2006). Ce sont des éléments constitutifs du système immunitaire, ils ont permis aux organismes même primitifs de résister aux temps. Ces molécules sont décrites pour agir rapidement et parfois même contre les bactéries plus rapidement et plus efficacement que les antibiotiques (Yeaman 2003; Boman 2003). Par ailleurs, les propriétés immuno-modulatrices décrites chez certains PAMs constituent un intérêt certain (Thaker et al. 2012; Haney and Hancock 2013). Enfin, la forte probabilité que ces molécules soient biodégradables rend cette alternative d'autant plus intéressante dans le contexte environnemental actuel.

B. Les peptides Antimicrobiens

1. Historique et présentation générale

Tous les organismes vivants possèdent un système spécialisé qui a pour vocation de les protéger des diverses menaces de l'environnement. Chez les vertébrés, le système immunitaire se décline en deux composantes étroitement liées : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Chez les invertébrés, la défense repose seulement sur l'immunité innée. Les peptides antimicrobiens constituent l'un des éléments clés du système immunitaire inné. Ils sont produits par tous les êtres vivants ([Hancock and Scott 2000](#); [Zasloff 2002](#); [Yeaman 2003](#); [Boman 2003](#)).

L'un des premiers agents antibactériens a été identifié chez les procaryotes. Il s'agit de la gramicidine qui est produite par la bactérie *Bacillus brevis* ([Dubos and Cattaneo 1939](#); [Hotchkiss and Dubos 1940](#)). C'est un peptide antimicrobien de 15 acides aminés de configuration L et D ([Sarges and Witkop 1965](#)). Très rapidement ce peptide a révélé le potentiel des PAMs par la protection des cochons d'Indes face aux infections ([Gause and Brazhnikova 1944](#)). La gramicidine fut utilisée pendant la seconde guerre mondiale seulement en application locale (du fait de sa toxicité) pour lutter contre les infections ([Van Epps 2006](#)). La pénicilline découverte à la même période par Fleming ([Fleming 1929](#)) fut utilisée également pendant la seconde guerre mondiale. C'est avec les avancées sur la pénicilline et la streptomycine, que « l'âge d'or » des antibiotiques commençait. Les molécules intervenant dans la défense immunitaire découverte plus tôt comme le lysozyme étaient mises de côté ([Fleming, 1922](#)).

Malgré cela, le champ de recherche sur les PAMs ne s'est pas interrompu. Après-guerre, la présence d'une activité antimicrobienne à large spectre dans les cellules sanguines humaines était reportée par Skarnes ([Skarnes and Watson 1957](#)). Hirsh suspectait que l'activité bactéricide des leucocytes chez le lapin était due à autre chose que le lysozyme, il nomma cette molécule sans déterminer la séquence la phagocytine, en réalité il s'agissait de la première défensine ([Hirsch 1956](#)). Dans les années 60s, l'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques sonnait déjà la fin de l'ère des antibiotiques ([Ventola 2015](#)). Les recherches sur les PAMs se sont par ailleurs intensifiées dans les années 70s. Le premier PAM caractérisé chez un animal est la bombinine issue de l'amphibien surnommé le « sonneur à ventre jaune » ([Michl and Bachmayer 1963](#)) suivie de la lactoferrine issue du lait de vache ([Groves et al. 1965](#)). Puis d'autres sources comme

les plantes, avec l'identification de la β -Purothionine notamment, chez *Viscum album L*, un PAM de 45 aa avec 8 cystéines (Mak and Jones 1976).

Les connaissances sur les PAMs se sont peu à peu accumulées, des éléments concernant l'origine de la production des PAMs ont notamment été apportés par Boman. En effet, si la majorité des PAMs est produite dans des tissus ou cellules spécialisées de manière constitutives cela n'est pas toujours le cas. Boman et son équipe ont montré que l'expression des PAMs pouvait être induite. Ils ont observé cela pour 3 peptides antimicrobiens chez la puppe de *Cecropia hyalophora* retrouvés dans l'hémolymphe sous l'effet d'*Enterobacter cloacae* (Hultmark et al. 1980).

De plus, Les PAMs sont considérés comme les premiers acteurs ou la première ligne de défense de l'immunité innée. On les retrouve par ailleurs au niveau des tissus et organes les plus exposés comme la peau, les yeux les bronches, les branchies ... (Zasloff 2002). La recherche de PAMs ciblant la peau s'est révélée très fructueuse pour bon nombre de modèles étudiés. Si nous prenons l'exemple des amphibiens, c'est plus de 300 PAMs différents qui ont été identifiés à partir de la peau à ce jour (Ma et al. 2010). Les Magainines, sont des exemples connus de PAMs sécrétés au niveau de la peau chez les amphibiens (Zasloff 1987). Il y d'autres exemples comme la cathélicidine, certaines défensines chez l'homme (Dürr et al. 2006; Rakers et al. 2010, 2013) ou encore les téléostéens (Cole et al. 1997; Robinette et al. 1998; Fernandes 2004; Rakers et al. 2013). Chez les invertébrés marins presque tous les PAMs ont cependant été identifiés soit à partir des hémocytes soit à partir du plasma (Sperstad et al. 2011).

Depuis l'intensification des recherches concernant les PAMs et notamment depuis les années 90s, de plus en plus de PAMs sont identifiés, essentiellement par des approches peptidiques classiques. Avec l'arrivée des études bio-informatiques et les avancées technologiques ce phénomène tend à s'accroître. Par ailleurs dans le but d'optimiser les activités anti-microbiennes, la stabilité et la sélectivité, des PAMs de synthèse ont vu le jour. Ces PAMs de synthèse incluent des séquences d'origine naturelle avec des modifications (substitution d'acides aminés, amidation, acides aminés modifiés)(Chen et al. 1988; Carmona et al. 2013). et des séquences créées *de novo* (Duval et al. 2009). Le nombre toujours croissant de PAMS a donné lieu à l'apparition des bases de données pour les répertorier.

1.1. Les Bases de données dédiées aux peptides antimicrobiens

La découverte croissante de PAMs a nécessité le développement de bases de données pour permettre de les répertorier. Depuis 2002, plusieurs sites dédiés aux PAMs ont vu le jour [Table 2](#). Certains d'entre eux ne sont plus accessibles par abandon ou par évolution comme ANTIMIC devenu DAMPD ([Table 2](#)), d'autres sont actualisés régulièrement comme APD ([Wang and Wang 2004; Wang et al. 2009, 2016](#)) ou CAMP ([Thomas et al. 2010; Waghu et al. 2014, 2016](#)). Chaque base de données a son utilité et/ou sa spécificité. Certaines répertorient les PAMs identifiés chez les plantes, d'autres chez les crevettes ou encore chez les bactéries, lorsque d'autres constituent des banques généralistes. Là encore, il y existe certaines subtilités quant à ces bases de données. Si YADAMP se présente comme étant juste une base de données de PAMs supplémentaire (YADAMP: yet another database on Antimicrobial peptides), d'autres telles que CAMP, APD ou encore DRAMP (Data Repository of AntiMicrobial Peptides) sont des bases de données qui sont à l'inverse complémentaires. APD répertorie uniquement les PAMs naturels découverts chez des êtres vivants à quelques exceptions près comme le peptide *De novo* K4 qui y figure ([Duval et al. 2009](#)). CAMP est une base de données qui accueille les PAMs naturels comme synthétiques et quelques peptides brevetés. Par ailleurs, DRAMP à l'image de CAMP inclut dans son répertoire tous les PAMs mais également les brevets et les essais cliniques ([Table 2](#)).

Bien qu'il existe une grande diversité de PAMs en termes de séquences, il y a néanmoins quelques grandes familles de PAMs. Il s'agit de PAMs que l'on reconnaît notamment sur la base de motifs conservés. Avec ces bases de données il est donc possible de chercher des PAMs en fonction des familles comme celles des défensines, des cathélicidines ou des cecropine ou en fonction du nom du PAM qui est généralement basé sur l'organisme d'origine (exple : cecropine issu de *Cecropia hyalophora*). Il est également possible de chercher des PAMs en fonction de leur structure tridimensionnelle ou des propriétés physico-chimiques... Mais malgré toutes ces bases de données et de toutes ces fonctions, à l'heure actuelle il est encore difficile d'avoir une vision globale et simple de tous les PAMs naturels identifiés. Le [Tableau 3](#) montre la répartition des PAMs issus des banques de PAMs généralistes en fonction de leur origine. Pour chacune d'entre-elles, la totalité des PAMs naturels répertoriés ne sont pas réparties en fonction des grands groupes

d'êtres vivants. APD apparaît être la banque de PAMs qui offre la meilleure répartition bien que cela soit encore incomplet.

Tableau. 2 Bases de données dédiées aux PAMs (au 1^{er} janvier 2018)

Année	Nom	Site	Sujet	Nombre de séquences	Naturels validés	Synthétiques	Brevets
2002	AMSDb	Inactif	PAMs de plantes et animaux	-	-	-	-
2002	SAPD	Inactif	PAMs synthétiques	-	-	-	-
2003	NAD	Inactif	Banque généraliste de PAMs	-	-	-	-
2004	Peptaibol	http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml	PAMs de champignons	317	317	-	-
2004	APD	http://aps.unmc.edu/AP	PAMs naturels	2957	2880	77	-
2004	ANTIMIC	Inactif	Banque généraliste de PAMs	-	-	-	-
2006	PenBase	http://penbase.immunology.aqua.com	PAMs des crevettes	-	-	-	-
2006	Cybase	http://research1t.imb.uq.edu.au/cybase	PAMs cyclique	952	-	-	-
2007	BACTIBASE	http://bactibase.pfb-lab-tun.org/main.php	PAMs des bactéries	177	177	-	-
2007	Defensins	http://defensins.bii.a-star.edu.sg	Défensines chez les eucaryotes	363	363	-	-
2007	AMPer	Inactif	PAMs de plantes et animaux	-	-	-	-
2008	RAPD	Inactif	PAMs et production en système recombinant	-	-	-	-
2009	PhytAMP	Inactif	PAMs de plantes	-	-	-	-
2010	CAMP	http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial	Banque généraliste de PAMs	8164 Dt 5390 prédit	2537	237	2083
2012	YADAMP	www.yadamp.unisa.it	Banque généraliste de PAMs	2525	2525	-	-
2012	DAMPD	Inactif	Banque généraliste de PAMs	-	-	-	-
2012	DADP	http://split4.pmfst.hr/dadp/	PAMs issus des amphibiens	-	-	-	-
2012	LAMP	http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/index.php	Banque généraliste de PAMs	5547 Dt 865 prédit	3039	1643	1491
2014	MilkAMP	http://milkampdb.org/home.php	PAMs issus du lait	405	405	-	-
2016	InverPep	http://ciencias.medellin.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/prospeccionydisenobiomoleculasinvertibrados/InverPep/public/home_en	PAMs issues des onydisenobiomoleculas invertébrés	774	774	-	-
2016	DRAMP	http://dramp.cpu-bioinfor.org/	Banque généraliste de PAMs	4833	4247	576	12 704

Par ailleurs, ces bases de données sont souvent dotées d'applications permettant le calcul de propriétés physico-chimiques comme : l'hydrophobicité, le point isoélectrique ou la charge etc ... c'est le cas d'APD ou encore YADAMP. Il est également possible de prédire la structure en hélice (APD) ou le potentiel antibactérien (CAMP) en fonction de la séquence en AA. La seconde partie du chapitre II traite plus en profondeur ce sujet. Le logiciel CAMP propose également depuis peu un software CAMPsign qui permet de cribler une liste de séquences en fonction de motifs communs à une famille de PAMs ([Hanif Waghu et al. 2016](#)).

Les progrès en bio-informatique et l'existence des bases de données vues précédemment influencent abondamment nos recherches à présent. La puissance de ces outils et la littérature pourraient aider à mieux définir les PAMs et à mieux les comprendre.

Tableau. 3 Répartition des PAMs de chaque banque de PAMs généraliste en fonction de différents taxons.

Taxon	DRAMP	LAMP	YADAMP	CAMP	APD
Bactéries	255	-	-	539	333
Plantes	833	43	158	1311	342
Insectes	276	48	260		509
Amphibiens	1102	76	911		1049
Mammifères	507	442	277		343
Oiseaux	-	38	-	6017 Dt 4003 prédit	40
Poissons	-	-	-		117
Reptiles	-	-	-		35
Mollusques	-	-	-		42

1.2. Qu'est-ce qu'un Peptide Antimicrobien ?

Répondre à la question « qu'est-ce qu'un PAM ? » n'est cependant pas une tâche aisée. Lorsque l'on s'intéresse aux PAMs répertoriées dans les différentes bases de données disponibles, on fait face à une grande diversité de séquences. Néanmoins, quelques grandes caractéristiques leurs sont communes ([Hancock and Sahl 2006](#)).

- Il s'agit de peptides de longueur inférieure à 100 AA et plus couramment d'une longueur comprise entre 11 et 40 résidus.
- Les PAMs sont généralement cationiques du fait de la présence de lysines, d'arginines ou d'histidines, avec parfois jusqu'à 9 charges positives. Toutefois, il existe une petite fraction de PAMs anioniques qui peut-être ont reçu moins d'attention depuis leur découverte. Plus d'une centaine de PAMs anioniques sont

répertoriés par [Harris et collaborateurs \(2009\)](#). Les auteurs décrivent la fonction antibactérienne de ces molécules comme secondaire ([Harris et al. 2009](#)).

- Il s'agit très souvent de molécules amphipatiques. Cette propriété leur confère la possibilité de se lier aux composants lipidiques de la membrane bactérienne qui sont hydrophobes ainsi qu'aux phospholipides qui sont hydrophiles ([Adem Bahar et al. 2013](#)).

Les PAMs naturels sont codés par des gènes et sont générés à partir d'un précurseur suite à un ou plusieurs clivages protéolytiques. Par ailleurs, si beaucoup de PAMs sont synthétisés puis clivés dans leur forme active ([Boman 2003](#)), il est aussi possible de rencontrer des PAMs qui ont subi des modifications post-traductionnelles telles que les exemples cités ci-dessous, pour revue ([Wang 2015](#)):

- Amidation à l'extrémité C-terminale
- Phosphorylation
- Addition d'acides aminés de configuration D
- Méthylation
- Glycosylation
- Formation de ponts disulfures
- Clivages protéolytiques

Avec l'arrivée des bases de données, nous pouvons nous intéresser aux PAMs sous de nouveaux aspects, par exemple en ciblant leur activité biologique, leur mode d'action, leurs caractéristiques physico-chimiques ou encore leurs cibles. À côté il apparaît difficile de les classer avec cette grande diversité de séquences. La méthode de classement la plus communément utilisée s'appuie sur la structure secondaire de ces PAMs ([Bulet et al. 2004](#); [Douglas 2011](#); [Adem Bahar et al. 2013](#); [Wang 2015](#)). 3 groupes sont alors distingués avec un quatrième pour les peptides les plus atypiques.

- Les peptides à hélice α
- Les peptides riches en cystéines
- Les peptides non $\alpha\beta$ comprenant notamment les peptides riches en certains aa
- Les peptides particuliers

Les peptides antimicrobiens à hélice- α

Dans une configuration en hélice α , deux résidus consécutifs sont séparés par une distance proche de 0,15nm (Adem Bahar et al. 2013) l'ensemble du peptide a une forme d'hélice comme son nom l'indique. la Figure 7A montre le résultat d'une projection obtenue avec un logiciel disponible en ligne tel que HeliQuest (Gautier et al. 2008). En fait, les acides aminés se succèdent autour de l'axe central avec un angle de 100° (Adem Bahar et al. 2013). La figure 7B permet de mieux visualiser la manière dont se succèdent les résidus.

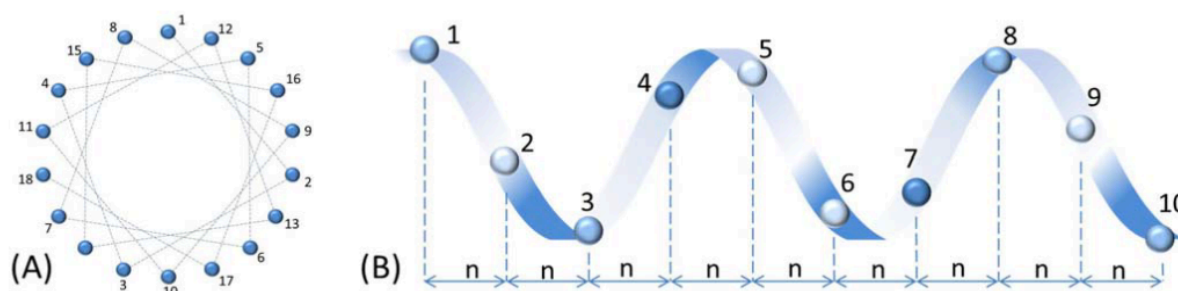


Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'un peptide en hélice- α . (A) Projection d'une hélice- α en vue apicale. (B) Vue de côté d'un peptide en hélice- α ; n représente la distance séparant deux résidus consécutifs avec une distance de 0,15 nm, selon (Adem Bahar et al., 2013).

Le tableau 4 reprend quelques exemples de peptides hélice- α . Lorsque l'on évoque les PAMs qui se structurent en hélice- α , parler de la famille des cecropines est incontournable. Le premier membre de cette famille a été identifié chez le papillon *Hyalophora cecropia* (Hultmark et al. 1980). Un autre peptide apparenté a par la suite été identifié à partir de l'intestin de porc (Lee et al. 1989). Il a par ailleurs marqué l'histoire, puisque 15 ans plus tard, Boman et collaborateurs (2003) se sont aperçus que ce peptide était en fait produit par le nématode, *Ascaris suum*, un parasite présent dans l'intestin du porc (Andersson et al. 2003). Les cecropines identifiées font en général moins de 40 résidus de long, elles sont amphiphiles et la majorité ont une amidation à l'extrémité C-terminale, à l'exception de celles identifiées chez les nématodes (Bulet et al. 2004). L'étude de la structure 3D de la cecropine P1 a été étudiée par des analyses en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et dichroïsme circulaire (CD) (Sipos et al. 1992). L'illustration de la structure de la cecropine est visible (figure 8), elle possède deux hélices- α qui sont liées par une proline. A côté des cecropines, parmi les figures emblématiques des PAMs à hélice- α , il y a les magainines. Les deux membres ont été identifiés chez l'amphibien *Xenopus laevis* par Zasloff (1987). Les magainines 1 et 2

possèdent 23 acides aminés et diffèrent par les 10 et 22^{ème} résidus. Ces peptides sont libérés au niveau de la peau par des glandes à mucus dont la sécrétion est régie par des neurotransmetteurs (Gammill et al. 2012). Depuis, beaucoup de PAMs ont été identifiés au niveau de la peau d'amphibiens (Rollins-Smith et al. 2005; Wang et al. 2016).

Tableau 4. Exemples de peptides antimicrobiens en hélice- α d'invertébrés (bleu) et de vertébrés (vert).

G- : Anti Gram -, G+ : Anti Gram +, B : Antibifilm, C : Anti cellules cancéreuses, H : Anti-HIV, S : Spermicide, P : Antiparasitaire, V : Anti-viral, F : Antifongique, E : inhibiteur d'enzyme

Les invertébrés marins possèdent également des PAMs en hélice- α (Figure 8.A.C). Chez les Urochordés, plusieurs d'entre eux ont été identifiés. Les clavanines A, C, D et E (Lee et al. 1997c) et la clavaspérine (Sherman et al. 2001), isolées à partir de *Styela clava*, ont une longueur de 23 résidus, une richesse en histidines et glycines et possèdent une amidation à l'extrémité C-terminale. Il y a également les stylines riches en phénylalanine ou lysine

(Lee et al. 1997b). Chez un autre modèle de tuniciers, *Halocynthia aurantium*, l'halocyntine et la papillosine ont été identifiées. Chez l'échinoderme, *Strongylocentrotus droebachiensis*, des PAMs un peu particuliers ont été caractérisés plus récemment (Li et al. 2010). Il s'agit des centrocines 1 et 2 qui correspondent à des hétérodimères composés d'une chaîne lourde (30 aa) et d'une chaîne légère (10 aa). Chacune des deux chaînes lourdes des centrocines semble se configurer en hélice- α (Li et al. 2010). Seuls quelques exemples ont été donnés. Ces peptides en hélice- α représente environ 14% des PAMs répertoriées sur APD (420 séquences) (Wang et al. 2016).

Les peptides antimicrobiens riches en cystéines

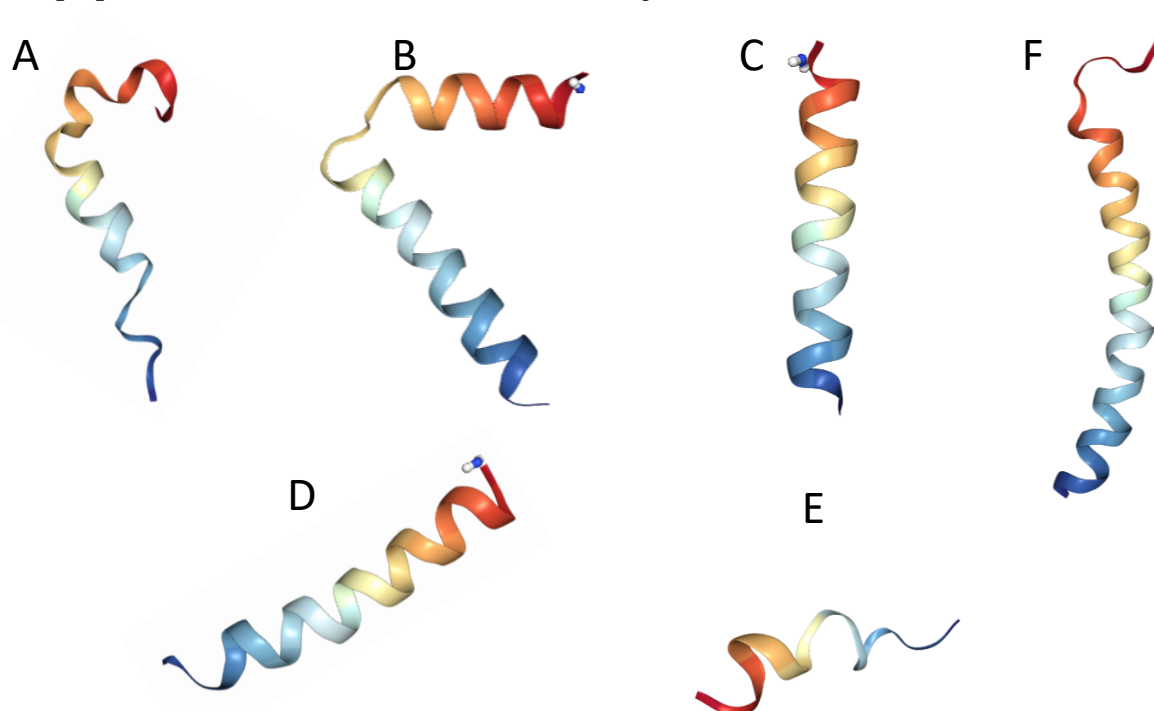


Figure 8 : Structure 3D de différents PAMs en hélice- α obtenues à partir de PDB (Protein data Bank).
A. Pleurocidine, (PDB : 2LS9), (*Pleuronectes americanus*). **B.** Cecropine, (PDB : 2IGR), (*Hyalophora cecropia*).
C. Moronecidine (PDN : 2MCV), (*Morone saxatilis*). **D.** Magainine-2, (PDB : 2MAG), (*Xenopus laevis*). **E.** Temporine A, (PDB :), (*Rana temporaria*). **F.** LL-37, (PDB : 2K6O).

De nombreux peptides antimicrobiens possèdent une ou plusieurs paires de cystéines dont l'oxydation se traduit par la formation de ponts disulfures internes (Powers and Hancock 2003). Dans APD, cela correspond à 16% des PAMs (476 séquences). La formation des ponts disulfures impose alors une configuration secondaire au peptide qui est souvent nécessaire ou qui module l'activité biologique. C'est le cas par exemple de la défensine 3 humaine (Schroeder et al. 2011). Les PAMs à feuillet β sont composés d'au

moins deux brins β reliés entre eux par des ponts disulfures (Bulet et al. 2004). Ainsi, nous pouvons citer l'hepcidine du bar hybride, un PAM de 21 résidus dont 8 cystéines, ce peptide a une configuration typique du feuillet- β (Lauth et al. 2005). La représentation structurale de cette hepcidine est disponible dans la banque de protéines PDB www.rcsb.org (Berman et al. 2000) (Figure 9.A). Cette banque répertorie et permet de visualiser toutes les protéines dont la structure a été élucidée. Parmi les PAMs riches en cystéines, certains se structurent uniquement à partir de feuillet- β , d'autres associent à la fois au moins un feuillet- β et une hélice- α , (Figure 9.C.D.E.F.G.H). Les défensines sont incontestablement les PAMs riches en cystéines les plus étudiées. 363 séquences ont été répertoriées dans la base de données « defensins knowledgebase » dédiée aux défensines (Seebah et al. 2007). Cette famille de PAMs est retrouvée chez de nombreux êtres vivants incluant les mammifères, les plantes, les champignons ou encore les insectes (Ganz 2003; Stotz et al. 2009). Chez les mammifères, on peut diviser cette famille en 3 sous-groupes distincts : les α , β et θ défensines sur la base de la structure des gènes, des précurseurs protéiques et des paires de cystéines formant les ponts disulfures (Selsted et al. 1993; Tang et al. 1999). Alors que les α -défensines semblent n'être retrouvées que chez les Mammifères (Pazgier et al. 2006) le sous-groupe des θ -défensines n'est quant à lui présent qu'au sein des leucocytes de macaque rhésus (Tang et al. 1999). Les β -défensines découvertes plus récemment sont les plus largement distribuées (Wong JH, Xia L 2007). Seules les α -défensines se structurent en feuillet- β (Ganz and Lehrer 1995), les θ -défensines sont quant à elles des peptides cycliques (Tang et al. 1999) et les β -défensines sont des peptides mélangeant feuillet- β et hélice- α (Sahl et al. 2005). Chez les mammifères, les défensines participent autant à l'immunité innée qu'à l'immunité adaptative (Wong JH, Xia L 2007). Chez les Téléostéens, ce n'est qu'en 2007 que les premières défensines ont été identifiées à travers une étude *in silico* (Zou et al. 2007a). Jusqu'à présent seules les β -défensines ont été identifiées chez les poissons. Elles sont associées à d'autres PAMs riches en cystéines comme les hepcidines, les LEAP-2 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide) ou encore les cathelicidines (Masso-Silva and Diamond 2014) qui feront l'objet d'une attention particulière dans le chapitre I.

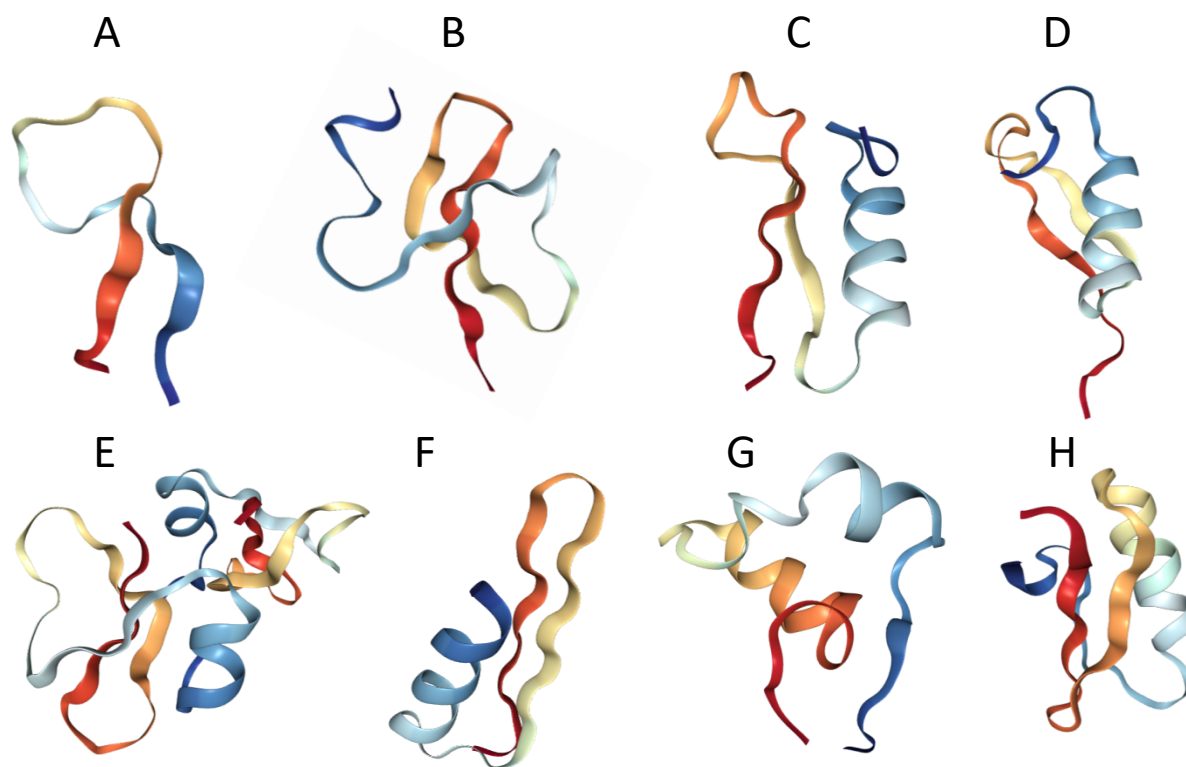


Figure 9 : Structure 3D de différents PAMs riches en cystéines obtenues à partir de PDB (Protein data Bank). A. Hepcidine, (PDB : 2LS9), (*Morone saxatilis*). B. Spheniscine-2, (PDB : 1UT3), (*Aptenodytes patagonicus*). C. MGD-1, (PDB : 1FJN), (*Mytilus alloprovincialis*). D. Cg-Def, (PDB : 2B68), (*Magallana gigas*). E. HBD-2, (PDB : 1FD3), (*Homo sapiens*). F. Mytiline, (PDB : 2EEM), (*Mytilus edulis*). G. Aureline, (PDB : 2LG4), (*Aurelia aurita*). H. Drosomycine (PDB : 1MYN), (*Drosophila melanogaster*).

Les invertébrés produisent également des défensines (Wong JH, Xia L 2007), c'est notamment le cas chez les Arthropodes tels que, les scorpions, les araignées, la drosophile ou les abeilles (Tassanakajon et al. 2014), mais également chez les mollusques bivalves comme la moule (Arena Diaz 2010) ou l'huître (Schmitt et al. 2012) Figure 9.C.D. Chez ces organismes, la majorité des PAMs identifiés à ce jour sont des peptides riches en cystéines (Arena Diaz 2010). Ils ont été étudiés notamment chez deux espèces de moule *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Arena Diaz 2010). Les PAMs de ces deux espèces se classent en 4 groupes incluant les défensines, les mytilines, les myticines et les mytimycines. D'autres défensines et d'autres PAMs riches en cystéines ont été identifiées et leur structure a été déterminée, voir Tableau 5. Ces différents PAMs sont très proches des défensines d'Arthropodes, en particulier par le motif à cystéines (Charlet et al. 1996). Les MGD1 et MGD2 possèdent cependant un 4^{ème} pont disulfure qui ne semble pas affecter leur activité biologique puisqu'elles conservent toutes les deux la même spécificité

Tableau 5. Exemples de peptides antimicrobiens riches en cystéines

Taxon	Organisme	Nom	Activités	Accession APD	Structure primaire
Arthropodes	<i>Phormia terranova</i>	Défensine A	G+	AP00216	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNGKGVCCVRN
	<i>Tachyplesus tridentatus</i>	Tachyplesine I	G+, G-, V, H, C	AP00214	KWCFRVCYRGICYRRCR
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomycine	F, P	AP00672	DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEGRSSGHCSPLKWCCEGC
	<i>Ornithothonus hainana</i>	Oh-défensine	G+, G-, F	AP01973	MLCKLSMFGAVLGVPACAI DCLPMGKTGGSCGGVCGCRKLT FKILWDKKF G
	<i>Leiurus quinquestriatus</i>	scorpion défensine	G+	AP00712	GFGCPLNQGACHRHCRSIRRRGGYCGAGFFKQTCYRN
	<i>Apis mellifera</i> L	Royalisine	G+	AP00226	VTCDDLFSKGVND SACAANCLSLGKAGGHCEKVGICRKT SFKDLWDKRF
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MGD-1	G+	AP00438	GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRGGYCGGWHLRPTCYRCG
		MGD-2	G+, G-	AP00711	GFGCPNNYACHQCHKSIRGYCGGYCAGWFLRCTCYRCG
Mollusques		Mytiline B	G+, G-, V	AP00333	SCASRCKGHCARRCGYVSVLYRGRYCKCLRC
	<i>Mytilus edulis</i>	Mytiline A	G+, G-	AP00332	GCASRCKAKCAGRRCKGWASAFRGRYCYCKCFRC
		Mytimicyne		Arena Diaz 2010	DCCRKPFRRKHCWDC TAGTPYYGYSTRNIFGCTC
		Cg-Def	G+	AP00558	GFGCPGNQLKCNNHCKSISCRAGYCDATLWLRCTCTDCNGKK
	<i>Magallana gigas</i>	Cg-Defh2	G+, G-	AP02618	GFGCPGDQYECNRHCRSIGCRAGYCDATLWLRCTCTGCSGKK
		Cg-Defh1	G+, G-	AP02619	GFGCPDRQYKCN SHCQSIGCRAGYCDATLWLRCTCTDCNGKK
Cnidaires	<i>Crassostrea virginica</i>	AOD	G+, G-	AP00539	GFGCPWNRVYQCHSHCRSISGRLLGGYCAGSLRLTCTCYRS
	<i>Aurelia aurita</i>	Aureline	G+, G-	AP01515	AACSDRAHGHICESFKSFCCKDSGRNGVKLRANCKKTCGLC
Humain	<i>Homo sapiens</i>	hBD-2	G+, G-, V, H, F	AP00524	GIGDPVTCCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKCKP
Téléostéens	<i>Morone saxatilis</i>	Hepcidine	G-	AP00302	GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF
	<i>Sparus aurata</i>	Beta-défensine	G+, G-	AP01796	ASFPWSCPSLSGVCRKVCLPTLFFGPLGCGKGLCGVSHFL
	<i>Miichthys miiuy</i>	LEAP-2	G-	AP02480	MTPLWRIMNSKPF GAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTSHRATSETVNY
Amphibiens		Brevinin-1Ea	G+, G-	AP00071	FLPAIFRMAAKVVPTIICSITKKC
	<i>Rana esculenta</i>	Esculentin-1	G+, G-, I	AP00080	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVGKEVGMDVVRTGDIAGCKIKGEC
Oiseaux	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	Spheniscin-2	G+, G-, F	AP00731	SFGLCRLRRGFCARGRCRFP SIFIGRCSRFVQCRRVW

G- : Anti Gram -, G+ : Anti Gram +, B : Antibifilm, C : Anti cellules cancéreuses, H : Anti-HIV, P : Antiparasitaire, V : Anti-viral, F : Antifongique, I : Insecticidal

d'action pour les bactéries à Gram positif que les défensines A d'insectes (Yang et al. 2000). De plus, la structure 3D de la MGD1 a été déterminée par des analyses RMN et consiste en une configuration classique mélangeant feuillets- β et hélice- α (Yang et al. 2000), Figure 9.C. Les mytilines constituent le second groupe décrit chez la moule, elles contiennent également 8 cystéines. Les mytilines A et B ont été identifiées par des approches classiques en chromatographie (Arena Diaz 2010). Retrouvée dans l'hémolymph à une concentration de 2 μ M, cela est suffisant pour inhiber des bactéries à Gram positif tels que *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* ou *Aerococcus viridans* dont la concentration minimale inhibitrice (MIC) est comprise entre 0.6 et 1.2 μ M (Charlet et al. 1996). A l'image des défensines, la configuration de la mytiline allie feuillets- β et hélice- α (Roch et al. 2008). L'Aureline est un PAM purifié sur la base de son activité antibactérienne (Ovchinnikova et al. 2006). Ce peptide de 40 AA a été identifié chez *Aurelia aurita*. Il présente à la fois des homologies de séquence avec les toxines d'anémone et les défensines d'invertébrés (Ovchinnikova et al. 2006). Récemment, la structure de ce peptide a été étudiée par des analyses en RMN et les résultats montrent une configuration secondaire associant hélice- α et feuillet- β (Figure 9.G) (Shenkarev et al. 2012).

Les peptides antimicrobiens riches en certains acides aminés

C'est un groupe moins représenté que les PAMs en hélice- α ou riches en cystéines. Sur APD, 96 peptides sont répertoriés (soit $\sim 3\%$). Ces PAMs qui présentent une richesse ou un % élevé pour un ou deux acides aminés n'adoptent pas de structure de type hélice- α ou feuillet- β . Ils peuvent être riches en tryptophane comme l'indolicidine (Selsted et al. 1992), riche en arginine et proline comme le PR-39 (Agerberth et al. 1991) ou l'astacidine (Lee et al. 2003), ou riche en glycine comme la Gloverine (Axen et al. 1997) (Tableau 6).

Tableau 6. Exemples de peptides antimicrobiens riches en acides aminés particuliers

Taxon	Organisme	Nom	Activités	Accession APD	Structure primaire	richesse
Arthropodes	<i>Hyas araneus</i>	Hyastatine	G+, G-, F	AP02620	ESFLKSKTGYQGVQTLPGFIGGSQ PHLGGGIGGGRRPFISQPN LGGGIGGGIGGGKPFIPQPNLGGG IGSTRPFPRPQYGDYGSR NSCNRQCPCSTYGGRGICRRWGS CCPTNYK	Proline
		Arasine 1	G+, G-, F	AP00987	SRWSPSGRPRPFGRPKPIFRPRP CNCYAPPCPCDRW	Proline/arginine
		Arasine 2	/	AP00988	SRWSPSGRPRPFGRPNPIFRPRP CICVRQPCPCDTY	Proline/arginine
	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Astacidine 2	G+, G-	AP01720	RPRPNYRPRPIYRP	Proline/arginine
		<i>Armadillidium vulgare</i>	Armadillidine H	G+, G-, F	AP02371	GHLGRPYIGGGGFNRGGGFHRG GGFHRGGGFHSGGGFHR GGGFHSGGSFGYR
	Armadillidine Q		G+, G-, F	AP02742	GHLGRPYIGGGGFNRGGGFHRG GGFHRGGGFQSGGGFHR GGGFHSGGSFGYR	Glycine
Mollusques	<i>Antheraea assamensis</i>	Gloverine	G-	AP02913	KSGGGGWGSGGGGGGGGGWW WSGWGVDR	Glycine/tryptophane
	<i>Magallana gigas</i>	Cg-Prp	G+, G-	AP01379	ILENLLARSTNEDREGSIFDTGPIRR PKRPRPRPEG	Proline/arginine
Mammifères	<i>Homo sapiens</i>	Histatine 3	G+, G-, F	AP00520	DSHAKRHHGYKRFKEKHHSHRG YRSNYLYDN	Histidine
	<i>Sus scrofa</i>	PR-39	G+, G-, C	AP00396	RRRPRPPYLP RPRPPFP PRLPPR IPPGFPPRFPRFP	Proline/arginine
	<i>Bos taurus</i>	BACTENECIN 5	G-	AP00009	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPI FPPIRPPRPLGFPF	Proline/arginine
Téléostéens			indolicine	G-, G+, P, F	(Rozek et al, 2000)	ILPWKWPWWPWRRa
	<i>Gadus morhua</i>	CodCath	G+, G-, F	AP01713	SRSGRSGSGKGGRGSGSGSGSRG SKGPSGSRGSGSGSRGSKGSR GGRSGRGSTIAGNNRNNGGTRT A	Glycine/serine
	<i>Plecoglossus altivelis</i>	aCATH	G-	AP01759	RMRRSKSGKSGSGSKSGSKGSK GSKGSGSKSGSGSGSRPGG GSSIAGGGSKGKGGTOTA	Glycine/serine/lysine

G- : Anti Gram -, G+ : Anti Gram +, C : Anti cellules cancéreuses, H : Anti-HIV, P : Antiparasitaire, V : Anti-viral, F : Antifongique, a : amidation C-terminal, / non renseigné.

Chez les insectes, ces PAMs riches en prolines sont particulièrement bien représentés comme l'abaecine chez l'abeille, *Apis mellifera* (Casteels et al. 1990), la lebecine 1 du papillon du murier, *Bombyx mori* (Hara and Yamakawa 1995), la drosocine identifiée chez la drosophile, *drosophila melanogaster* (Bulet et al. 1993) ou encore la pyrrhocoricine identifiée chez la punaise, *Pyrrhocoris apterus* (Cociancich et al. 1994). Concernant les

peptides riches en glycines, on retrouve les armadillines identifiées chez le cloporte, *Armadillidium vulgare* comme l'armadillidine H (Herbinière et al. 2005) ou plus récemment, l'armadillidine Q identifiée à partir d'hémocytes. Ce dernier est une isoforme de l'armadillidine H qui diffère uniquement par un acide aminé ; La glutamine en position 33 est remplacée par une histidine (Verdon et al. 2016). Par ailleurs, l'étude structurale de ce peptide par des analyses en RMN et en dichroïsme circulaire ont montré que le peptide n'adoptait aucune structure en Trifluoroethanol (TFE) (Verdon et al. 2016). Chez les mammifères, nous pouvons citer les deux exemples que sont l'histatine provenant de la salive humaine (Edgerton and Koshlukova 2000) et l'indolicine de bovin, *Bos taurus* (Rozek et al. 2000). Le premier étant riche en histidines tandis que le second est riche en tryptophanes Tableau 6. Chez les invertébrés marins, Il y a des exemples de peptides riches en prolines et arginines avec l'arasine 1 et ou riche en glycine comme la hyastatine, ces deux PAMs ayant été identifiés chez le crabe *Hyas araneus* (Stensvåg et al. 2008).

Les peptides antimicrobiens plus atypiques

Parmi les PAMs connus certains d'entre eux ne répondent pas strictement aux critères propres à chacun des groupes présentés précédemment.

Chez les Crustacés et en particulier chez les crevettes pénéides, il existe une famille de PAMs un peu à part, Il s'agit des penaeidines. Les premières penaeidines ont été identifiées chez *Litopenaeus vannamei* par une approche classique en chromatographie liquide, à partir d'hémocytes (Destoumieux et al. 1997). Ces PAMs associent à la fois une région N-terminal riche en prolines ou domaine PRD et une région C-terminale riche en cystéines ou domaine CRD (Cuthbertson et al. 2008). La configuration spatiale est particulière, le CRD est décrit comme formant des ponts disulfures, stabilisant une hélice- α , alors que le PRD ne se structure pas (Figure 10) (Yang et al. 2003; Cuthbertson et al. 2005). Ces deux domaines qui caractérisent deux catégories de PAMs différents sont également retrouvés chez d'autres PAMS de crustacés , comme les hyastatines identifiées chez les crabes *Hyas araneus* (Stensvåg et al. 2008) et *Scylla paramamosain* (Shan et al. 2016). Chez l'annélide marin, *Nereis diversicolor*, Tasiemski et collaborateurs (2007) ont identifié l'hédistine, un peptide particulier possédant deux bromotryptophanes. Ce PAM de 22 AA amidé à l'extrémité C-terminale, est produit de manière constitutive et exclusive dans les cellules circulantes NK (Tasiemski et al. 2007). Sa structure en hélice- α fut décrite par Xu et collaborateurs (2009). Parmi les PAMs atypiques, nous pouvons également citer des

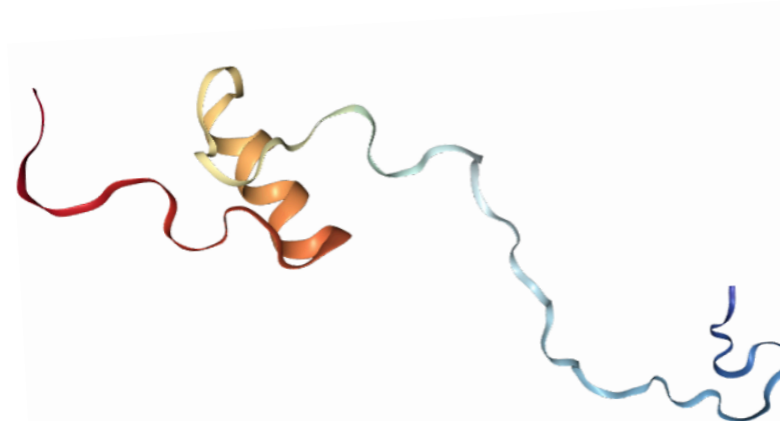


Figure 10 : Structure 3D de la penaeidine 3 de crevette, *Penaeus vannamei* selon (Yang *et al.*, 2003). La région rouge correspond au feuillet- β , suivie par une hélice- α en orange et en bleu, la région non structurée correspondante au PRD.

peptides antibactériens issus de protéines dont l'activité principale n'est pas rattachée à une fonction immunitaire comme la buforine I issu du clivage de l'histone H2A du Crapaud *Bufo bufo* (Park *et al.* 1996) ou astacidine issu de l'hémocyanine de l'écrevisse, *Pacifastacus leniusculus* (Lee *et al.* 2003).

1.3. Les différents modes d'actions des peptides antimicrobiens

Les PAMs grâce à leurs propriétés physico-chimiques peuvent interagir et déstructurer les membranes des bactéries. De par leurs diversités au niveau de leur structure secondaire ou tertiaire, ils présentent différents modes d'action. Une première distinction existe entre les PAMs qui agissent directement sur l'intégrité de la membrane d'une part et ceux qui interfèrent avec des cibles intracellulaires d'autre part. Néanmoins dans les deux cas une interaction avec la membrane est nécessaire (Hancock 1997). Cette interaction est notamment possible grâce aux liaisons électrostatiques entre le peptide chargé positivement et les phospholipides chargés négativement de la membrane des bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, l'interaction est possible *via* les composants des peptidoglycanes comme les acides téichoïques. Face aux cellules eucaryotes, cette interaction est beaucoup plus faible (Zasloff 2002) Figure 11. Le mode d'action ciblant l'intégrité de la membrane est le plus commun (Park *et al.*, 2011). En agissant ainsi, le PAM entraîne la destruction de la bactérie par libération de son contenu cellulaire. Toutefois, avant de dégrader la membrane d'une cellule bactérienne, certaines conditions sont nécessaires. Huang (2000) explique qu'un peptide peut-être sous deux états différents lorsqu'il est lié à la membrane. Sous forme active et non active et le passage de l'une à l'autre dépend du ratio peptide/lipide. Ainsi lorsque la concentration

en peptide est suffisamment importante, les peptides changent alors d'orientation pour s'insérer dans la membrane (Huang 2000).

Trois types d'interaction membrane-peptide sont proposés :

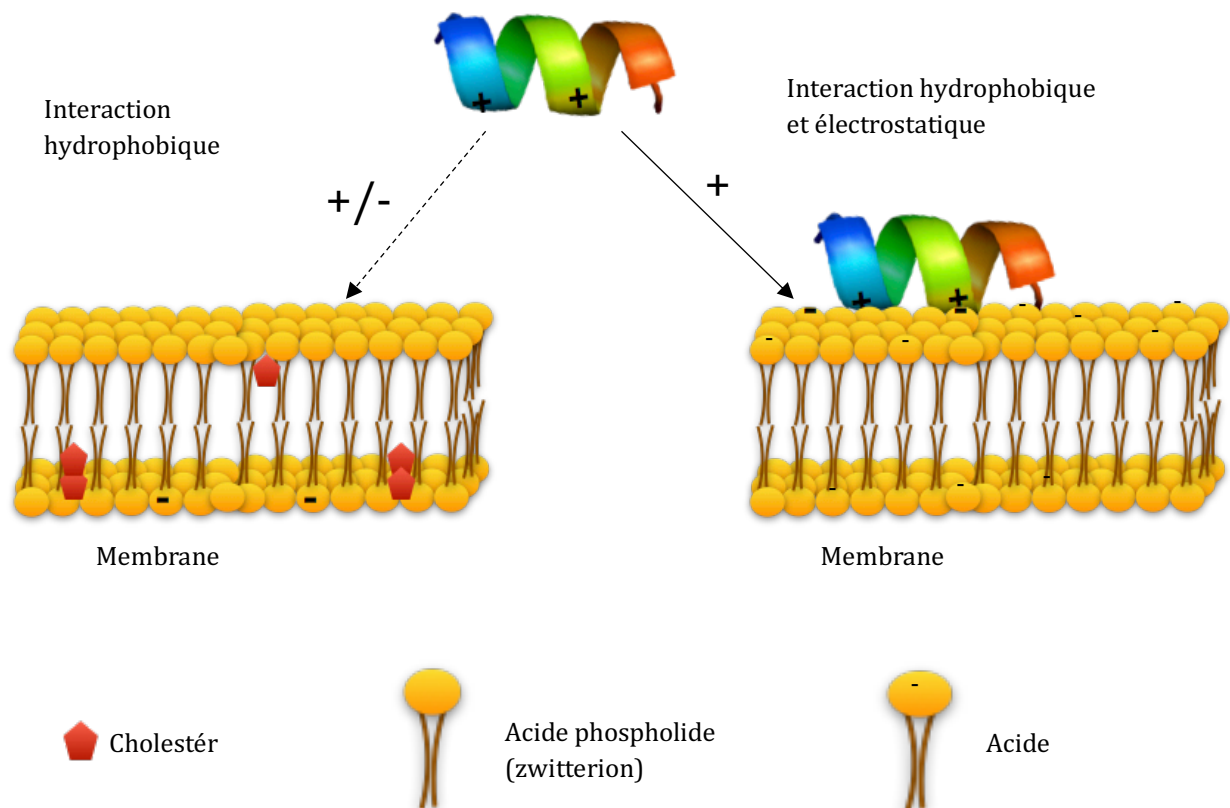


Figure 11 : Mécanisme d'attraction. Interaction d'un peptide antimicrobien pour une membrane, en fonction de sa composition, selon (Zasloff 2002). A gauche une membrane d'organisme multicellulaire, à droite une membrane de cellule procaryote.

le modèle « des pores en douves de tonneaux »

Dans ce modèle, les peptides forment un certain nombre de pores, ils s'insèrent grâce à leur domaine hydrophobe en repoussant les têtes hydrophiles des phospholipides. Les pores formés ont une face interne hydrophile et une face externe hydrophobe. En fait les peptides insérés dans la membrane sont comme les douelles qui forment les tonneaux Figure 12.A (Yeaman and Yount 2003). Les résidus hydrophiles se situent alors vers la lumière du pore (Yeaman and Yount 2003). Ce mode d'action a été observé pour l'alaméthicine (Hall et al. 1984).

Le modèle « des pores toroïdaux »

Sur certains aspects, le modèle des pores toroïdaux présente quelques similitudes avec le précédent, notamment sur l'induction de la mort cellulaire par osmose due à la formation de pores. En revanche, c'est au niveau de la formation des pores que les deux modèles diffèrent. Les peptides restent fixés à la tête polaire de la monocouche lipidique et cela même après être insérés [Figure 12.C](#). L'invagination des lipides entraîne la jonction des deux couches lipidiques, aboutissant à la formation d'un trou toroïdal, à l'image d'un joint d'étanchéité. Ce mode d'action est bien décrit pour des PAMs tels que la melittine ([Yang et al. 2001](#)) ou la magainine ([Matsuzaki et al. 1996](#)).

[Wimley \(2011\)](#) évoque une notion de « travail » pour ces deux modèles qu'il distingue par le fait que dans le premier modèle, les peptides s'insèrent en « travaillant » avec la membrane, qu'ils utilisent pour s'assembler tandis que dans le second, les peptides « travaillent » contre la membrane ce qui aboutit à la rupture de la ségrégation des domaines polaires et apolaires de la membrane.

Le modèle « en tapis »

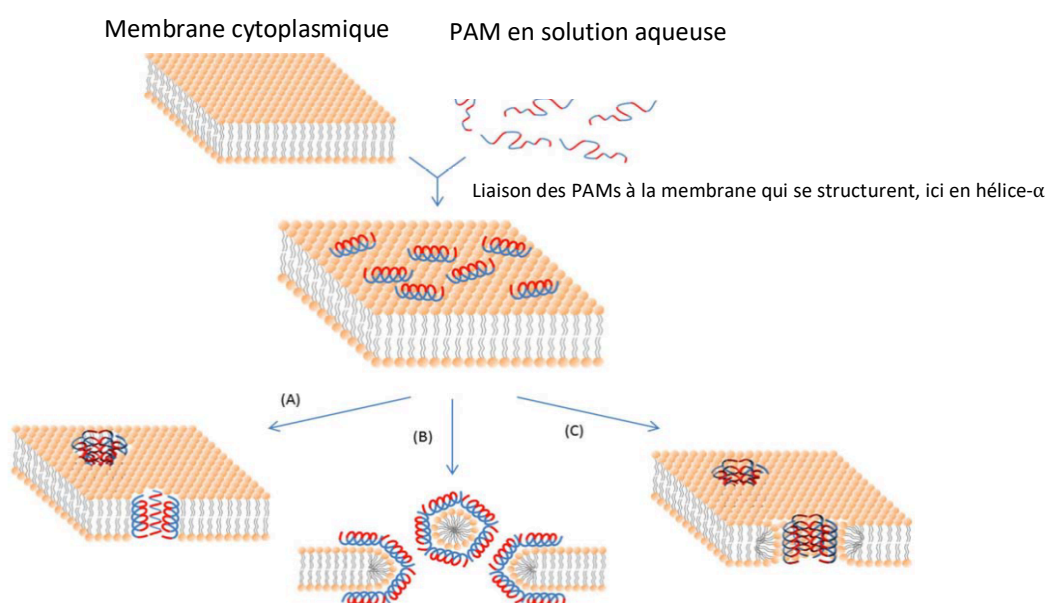


Figure 12: Représentation schématique des différents modes d'action de peptides antimicrobiens qui interagissent avec la membrane bactérienne ([Adem Bahar et al., 2013](#)). **A.** Modèles des pores en douves de tonneau. **B.** Modèle en tapis. **C.** modèle des pores toroïdaux. Les PAMs sont représentés par des peptides en hélice- α et amphipatiques dont la région hydrophile est représentée en rouge et la région hydrophobe en bleu.

Contrairement aux deux autres modèles, ce mode d'action ne nécessite pas de formation de pores. L'exemple le plus connu est celui la cécropine P1 (Gazit et al. 1996). Dans ce mode d'action, le peptide est en fait toujours parallèle à la membrane et n'est actif qu'à des ratios peptide/lipides élevés (Gazit et al. 1996). Shai et collaborateurs (1996) concluent par ailleurs que le peptide doit former un tapis à la surface de la membrane pour la détruire. Les peptides ne s'insèrent pas dans le cœur hydrophobe. Une fois la concentration seuil atteinte, la membrane s'amincit et cède sous l'influence des peptides Figure 12.B. Un exemple de peptide pour lequel ce modèle est décrit est la cathelicidine humaine LL-37 (Oren et al. 1999). Une variante du modèle en tapis est le modèle « *détergent-like* » Ce mode d'action est observé pour les peptides amphiphiles, à des concentrations relativement élevées correspondant à la CMC (concentration micellaire critique), les peptides s'organisent en micelles. A l'image des molécules chimiques classées comme « tensio-actif » tel que le triton par exemple. En s'auto-assemblant les peptides peuvent interagir avec la membrane bactérienne. L'étude du mode d'action des peptides tels que la Warnéricine RK (Verdon et al. 2009) ou le peptide K4 (Legrand et al. 2011) a contribué à la compréhension de ce mode d'action.

L'action des PAMs sur l'intégrité de la membrane est le plus courant et le plus étudié, d'autres travaux s'intéressent aux PAMs qui agissent sur des cibles intracellulaires comme le PR39 (Boman et al. 1993) ou la buforine II (Park et al. 1998a). Le peptide PR-39 traverse la membrane bactérienne sans la déstructurer et semble cibler la synthèse de protéines bactériennes (Boman et al. 1993). Quant à la buforine II, elle est capable de se lier à l'ADN/ARN (Figure 13) (Park et al. 1998a). Boman et collaborateur (1993).

Des enzymes peuvent également être activées par la présence de PAMs et conduire à la mort cellulaire. C'est le cas notamment de l'autolysine chez *Staphylococcus simulans*, une enzyme située au niveau de la membrane bactérienne et qui, en présence du PAM Pep 5, entraîne la lyse cellulaire (Bierbaum and Sahl 1987). La Figure 13 reprend les différents exemples de PAMs ciblant des mécanismes intracellulaires. entraîne la lyse cellulaire (Bierbaum and Sahl 1987). La Figure 13 reprend les différents exemples de PAMs ciblant des mécanismes intracellulaires.

1.4. Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les PAMs sont produits par tous les êtres vivants et leur rôle est de protéger l'hôte face aux microorganismes infectieux. Les bactéries et les PAMs ont par conséquent co-évolué au cours du temps et c'est d'ailleurs l'une des caractéristiques qui rend les PAMs aussi intéressants (Peschel and Sahl 2006). Cela inclut également que certaines bactéries présentent naturellement des résistances face à ces molécules. Les résistances aux PAMs chez les bactéries peuvent être d'origine constitutive (passive) ou inductible (adaptative) (Andersson et al. 2016).

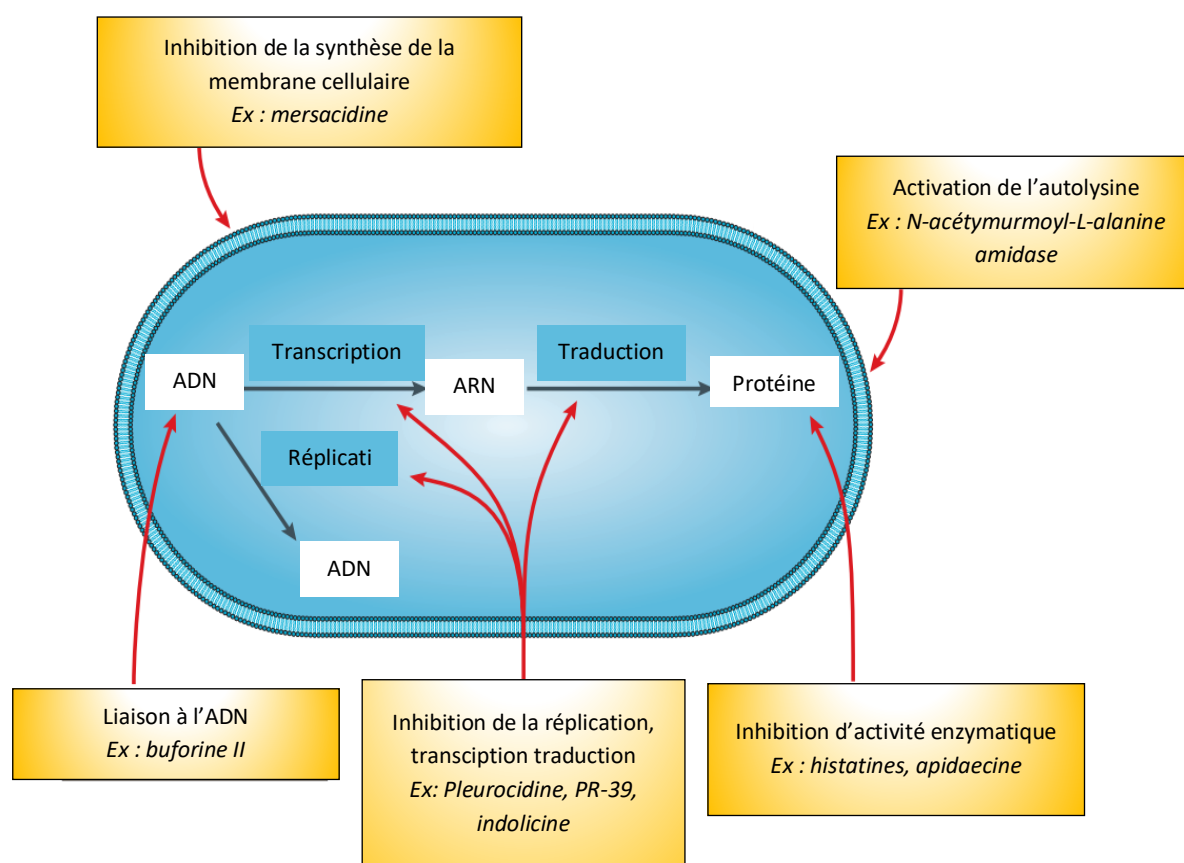


Figure 13: Illustration des mécanismes d'action de peptides antimicrobiens ayant des cibles intracellulaires et non une action directe sur l'intégrité physique de la membrane. Illustration empruntée (brogden 2005).

Résistances passives

Un des mécanismes communs aux différentes bactéries concerne l'incorporation d'éléments chargés positivement dans le but de diminuer l'interaction avec les PAMs majoritairement cationiques (Andersson et al. 2016). Chez les bactéries à Gram négatif et notamment chez *Salmonella typhimurium* pour qui cela a été bien décrit, la réduction du caractère anionique de la membrane se fait par l'addition d'aminoarabinose et de phosphoethanolamine (Matamouros and Miller 2016). En amont ce sont les systèmes régulateurs PhoP/PhoQ et PmrA qui sont à l'origine des modulations membranaires (Gunn and Miller 1996). Ils contrôlent un ensemble de gènes qui interviennent dans la composition de la membrane comme le montre la Figure 14. L'addition de charges positives au niveau du cœur et du lipide A des lipopolysaccharides (LPS), se fait grâce à des cascades enzymatiques illustrées en Figure 14. Par cette modification de la charge membranaire, *S. typhimurium* devient résistante à la polymyxine B et à d'autres PAMs (Manniello et al. 1978; Matamouros and Miller 2016). Chez les bactéries à Gram positif

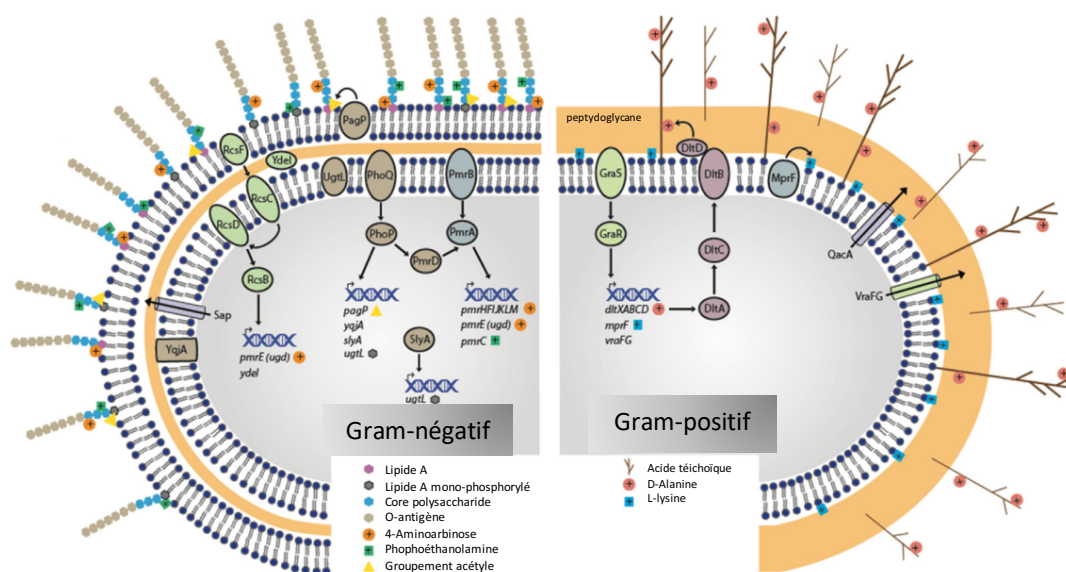


Figure 14: Illustration résumant les différents mécanismes de résistance des bactéries à Gram négatif et à Gram positif contre les peptides antimicrobiens, selon (Andersson et al. 2016). La majorité de ces mécanismes entraînent des modifications au niveau de la membrane. Un autre mécanisme de défense repose sur l'action de pompes à efflux.

c'est l'operon (*dlt*) qui entraîne l'ajout de D-alanine sur les acides téichoïques associés aux peptidoglycans (Peschel et al. 1999) Figure 14. Les acides téichoïques interviennent dans de nombreuses fonctions telles que la division cellulaire, l'adhésion, la virulence et la résistance aux agents antibactériens (Brown et al. 2013). Ils constituent donc une cible privilégiée des PAMs. L'addition de la D-alanine entraîne l'estérification de l'acide

téichoïque et entraîne la réduction du caractère anionique de la membrane. Par ailleurs, [Peschel et collaborateur \(1999\)](#) ont montré que lorsque l'opéron *dlt* est inactivé, la CMI est largement diminuée parfois par 10 suivant les PAMs ([Peschel et al. 1999](#)). Les mêmes observations ont été observées pour d'autres bactéries tels que *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri* ou encore *Listeria monocytogenes* ([Andersson et al. 2016](#)). De la même manière, la protéine MprF (multiple peptide resistance factor) intervient dans l'addition de L-Lysine au niveau de la membrane phospholipidique [Figure 14](#).

Outre les modifications au niveau de leur membrane, les bactéries possèdent d'autres systèmes de défense face aux PAMs. Parmi eux il y a d'une part des systèmes de pompes à efflux et d'autre part la production de protéases ([Andersson et al. 2016](#)). Chez *Salmonella typhimurium*, les PAMs sont évacués à travers un système comprenant une pompe à efflux nommé *sap* et un transporteur ABC encodé par l'opéron *yejABEF* ([Eswarappa et al. 2008](#)). Chez *Staphylococcus aureus* c'est le gène *vraFG* qui code pour un transporteur ABC [figure 14](#).

Un autre moyen de défense contre les PAMs consiste à sécréter des protéases dans le but d'inactiver les peptides ([Yeaman and Yount 2003](#)). C'est notamment la fonction de l'aurolysine, une métalloprotéase produite par *Staphylococcus aureus* qui inactive la LL-37 par clivage du peptide du côté C-terminal ce qui induit une perte de l'activité antibactérienne ([Maria-Neto et al. 2015](#)). Il existe d'autres exemples tels que la PgtE, une enzyme produite par *Salmonella typhimurium* ([Guina et al. 2000](#)) ou encore la protéase OmpT produite par *E.coli* qui clive la protamine avant que ce PAM (que l'on trouve par ailleurs dans le sperme de différentes espèces animales) ne pénètre la bactérie ([Aspedon and Groisman 1995](#); [Stumpe et al. 1998](#)). Ces phénomènes de résistance existent chez les vibrios et notamment chez *Vibrio Splendidus* et *V. aestuarianus*. Duperthuy et collaborateurs (2010) expliquent que le gène OmpU est impliqué dans les mécanismes de résistance de *V. splendidus* contre des PAMs incluant la polymixine B, la protegrine et la BPI humaine ainsi que deux PAMs de l'huître, la Cg-def et la Cg-BPI. De plus la porine OmpU joue un rôle essentiel dans la reconnaissance par les hémocytes puisqu'elle est nécessaire à l'invasion hémocytaire. OmpU est « opsonisé » lors de la phagocytose et permet l'invasion par la bactérie ([Figure 6](#)). Enfin, les auteurs ont également montré que OmpU inhibe la formation de radicaux oxygénés et de vacuoles acides ([Duperthuy 2010](#)) pérennisant ainsi la survie intracellulaire de *V. splendidus*. Si *V. splendidus* peut être

considéré comme un pathogène intracellulaire, *V. aestuariannus* a quant à lui un mécanisme d'évitement hémocytaire différent (Labreuche et al. 2006). Labreuche et collaborateurs (2006) expliquent que *V. aestuariannus* réalise une évasion hémocytaire en sécrétant des produits extracellulaires (ECPs), empêchant alors la destruction par les hémocytes.

Résistances adaptatives

Au travers de la littérature, il est possible de lire que les bactéries ne peuvent ou qu'il leur est difficile d'acquérir des résistances aux PAMs (Batoni et al. 2011; Ghosh and Haldar 2015). Il s'avère que cela n'est pas tout à fait vrai. En effet une étude récente a mis en évidence le transfert horizontal du gène MCR-1 induisant une augmentation de la résistance chez *E.coli* à la colistine (Liu et al. 2016). Ces observations ont été faites lors d'une campagne de surveillance des ressources alimentaires en Chine, précisément dans un élevage de porc (Liu et al. 2016). La résistance acquise par ce gène entraîne une modification des Lipide A des LPS (Liu et al. 2016). Par la suite ce gène MCR-1 fut identifié de manière rétroactive au sein de 3 des 1267 échantillons de matières fécales prélevés auparavant, suggérant un transfert de ce gène de résistance chez des bactéries présentes chez l'humain (Liu et al. 2016). A côté de cette observation *in situ*, d'autres études s'intéressent notamment à l'acquisition de résistance aux PAMs *in vitro*. Ils observent le nombre de générations nécessaires pour acquérir une résistance face à un PAM délivré à des concentrations croissantes, pour revue (Andersson et al. 2016).

Cette introduction nous a permis de présenter de manière succincte les peptides antimicrobiens. A travers leurs diverses caractéristiques, structures, modes d'action, multiples cibles et fonctions, nous voyons en eux un potentiel certain quant à une éventuelle application. Cette vaste diversité au sein des PAMs reflète probablement l'adaptation des espèces aux environnements microbiens caractéristiques des niches écologiques occupées (Zasloff 2002).

Chapitre I : Identification de PAMs chez le poisson-lion, *Pterois volitans*

A. Introduction

1. Présentation du modèle *Pterois volitans*

Le poisson-lion, *Pterois volitans* également appelé rascasse poule ou encore rascasse volante est populaire et très apprécié des aquariophiles pour sa beauté. Son corps est rayé verticalement avec une alternance de bandes marron-orangées et blanches plus ou moins sombres. Le déploiement de ses nageoires et ses couleurs donne une élégance et une prestance certaine à ce poisson [figure 15](#). Néanmoins, malgré sa beauté ce poisson est dangereux. Il possède un appareil venimeux constitué de 18 épines venimeuses localisées au niveau des nageoires dorsales, pelviennes et anales ([Halstead et al. 1955](#)). Ces dernières renferment un tissu glandulaire (Figure X 1 épines) à l'origine de la production d'un venin qui le protège d'éventuels prédateurs. Originaire de l'Indopacifique ce poisson est désormais une espèce invasive en Atlantique, notamment au sud-est des États-Unis, dans le Golfe du Mexique et dans la mer des Caraïbes ([Schofield 2009](#)). Le succès invasif de ce poisson est probablement multifactoriel, toutefois à



Figure 15 : Photographie d'un spécimen de *Pterois volitans*. Les flèches indiquent la localisation des épines venimeuses du poisson-lion : dorsales (verte) ; pelviennes (rouge) et anales (bleue). Source [Bruce Bugbee \(2011\)](#).

l'exception des basses températures rien ne semble limiter son expansion. Cette introduction a pour objectif de décrire ce modèle d'étude original qu'est le poisson-lion.

1.1. Classification

Les téléostéens regroupent près de 25000 espèces, soit environ la moitié des espèces de vertébrés connues. Les téléostéens présentent une grande diversité morphologique, écologique et des caractères adaptatifs variés. Certains vivent dans des eaux froides (à -2°C) tandis que d'autres peuvent vivre à plus de 6000m de profondeur (Pellegrino 2004; Priede and Froese 2013). Dans cette étude nous nous intéressons au poisson-lion qui est un poisson venimeux (Fishelson 1975). La possession d'un appareil venimeux est une adaptation que l'on retrouve chez d'autres espèces de téléostéens et de chondrichthyens. Cette adaptation constitue un système de défense vis à vis des prédateurs. Le nombre de poissons venimeux est estimé à 2000 espèces (Smith and Wheeler 2006). La figure 16 illustre la position phylogénétique du poisson-lion ainsi que celle des autres téléostéens et chondrichthyens venimeux au sein des Cordés. Le poisson-lion est un téléostéen appartenant à l'ordre des Scorpaeniformes, à la famille des Scorpaenidae et au genre *Pterois* figure 17 regroupant 11 espèces (Froese 2017). Ces espèces peuvent se distinguer par leur nombre d'épines et de rayons associés aux différentes nageoires, leur morphologie, les motifs et les couleurs. Cependant cela n'est pas toujours suffisant. En effet, *Pterois volitans* est très proche de *Pterois miles*, tous deux étant originaires de l'Indopacifique. L'Indonésie est la zone où les aires de distribution des deux espèces *P.miles* et *P.volitans* se chevauchent. *P.miles* est retrouvé essentiellement sur les côtes de l'Afrique du sud jusqu'à la mer rouge et le Golfe Persique, la frontière se situe au niveau de Sumatra (Schultz 1986). *P. volitans* est quant à lui retrouvé de l'Indonésie jusqu'au Japon du Pacifique central au Pacifique sud (figure 18) Ces deux espèces sont très proches morphologiquement, néanmoins d'après Schultz (1986) *P.volitans* possède un rayon supplémentaire à la nageoire dorsale et à la nageoire anale. Toutefois, il semble difficile de déterminer malgré les récentes études génétiques (Hamner et al., 2007; Kochzius et al., 2003) s'il s'agit d'espèces distinctes ou d'espèces allopatriques (Fishelson, 2006).

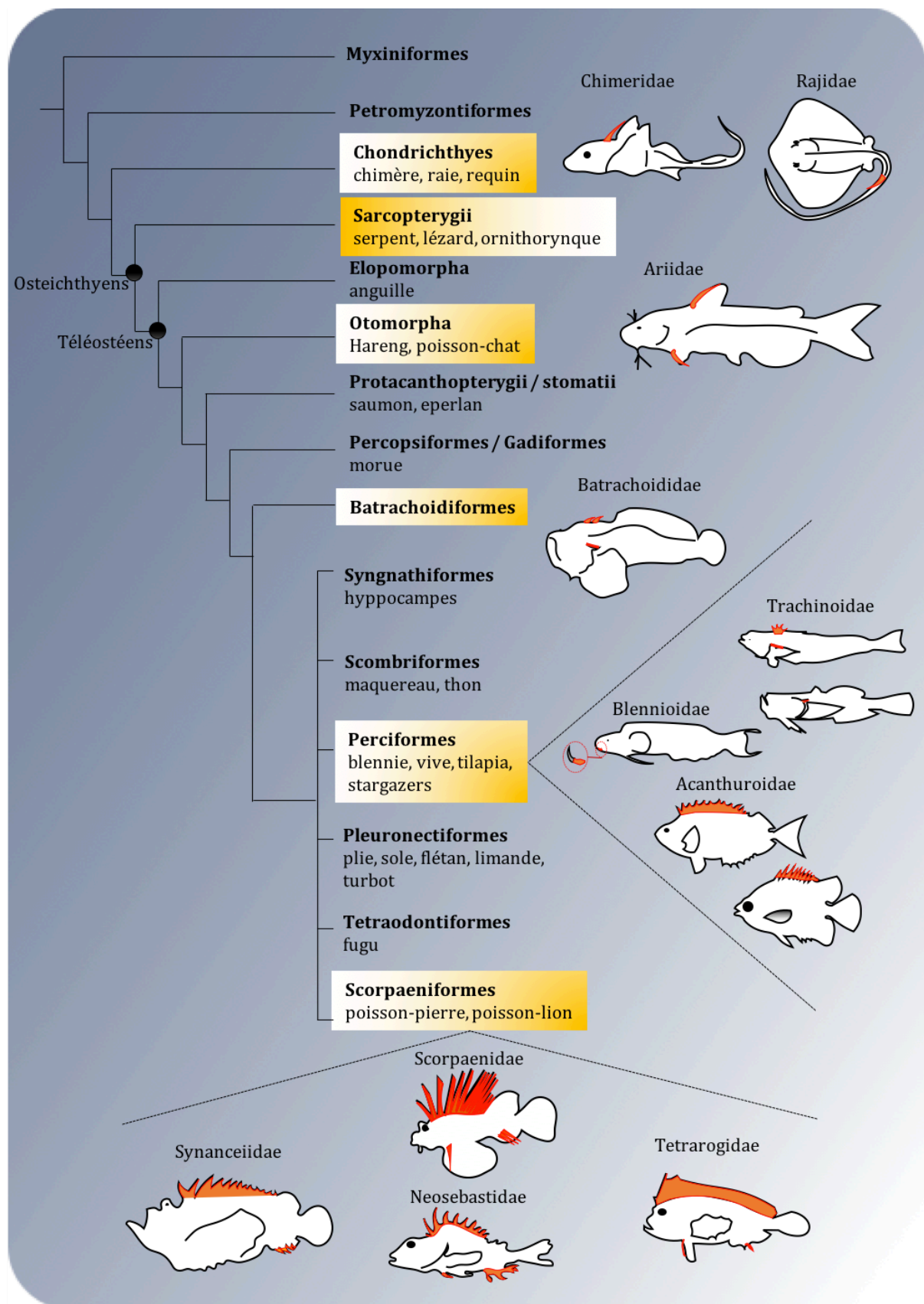


Figure 16 : Position phylogénétique des Scorpaeniformes au sein des gnatostomes. Les Taxons regroupant des espèces venimeuses sont en orange, les appareils venimeux de ces espèces sont en orange/rouge. Figure adaptée des travaux de [Smith et Wheeler \(2006\)](#) et de [Ziegman et Alewood \(2015\)](#).

Ordre	Scorpaeniformes
Sous-ordre	Scorpaenoidei
Famille	Scorpaenidae
Sous famille	Pteroinae
Genre	<i>Pterois</i>
Espèces	<i>Pterois andover</i> (Allen & Erdmann, 2008)
	<i>Pterois antennata</i> (Bloch, 1787)
	<i>Pterois brevipectoralis</i> (Mandrytsa, 2002)
	<i>Pterois lunulata</i> (Temminck & Schlegel, 1843)
	<i>Pterois miles</i> (Bennett, 1828)
	<i>Pterois mombasae</i> (Smith, 1957)
	<i>Pterois radiata</i> (Cuvier, 1829)
	<i>Pterois russelii</i> (Bennett, 1831)
	<i>Pterois sphex</i> (Jordan & Evermann, 1903)
	<i>Pterois volitans</i> (Linnaeus, 1758)

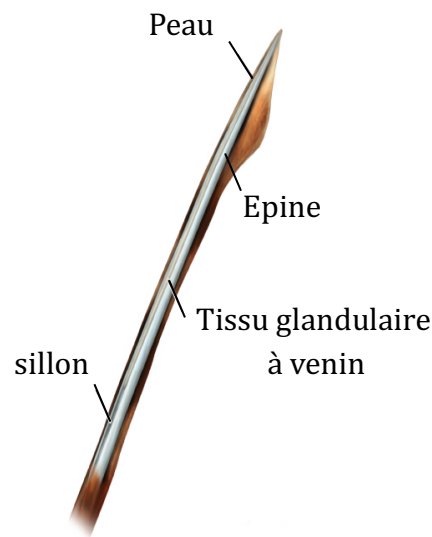


Figure 17 : Positionnement de *Pterois volitans* au sein des Scorpaeniformes, illustration de l'appareil venimeux retrouvé au sein des Scorpaenidae.

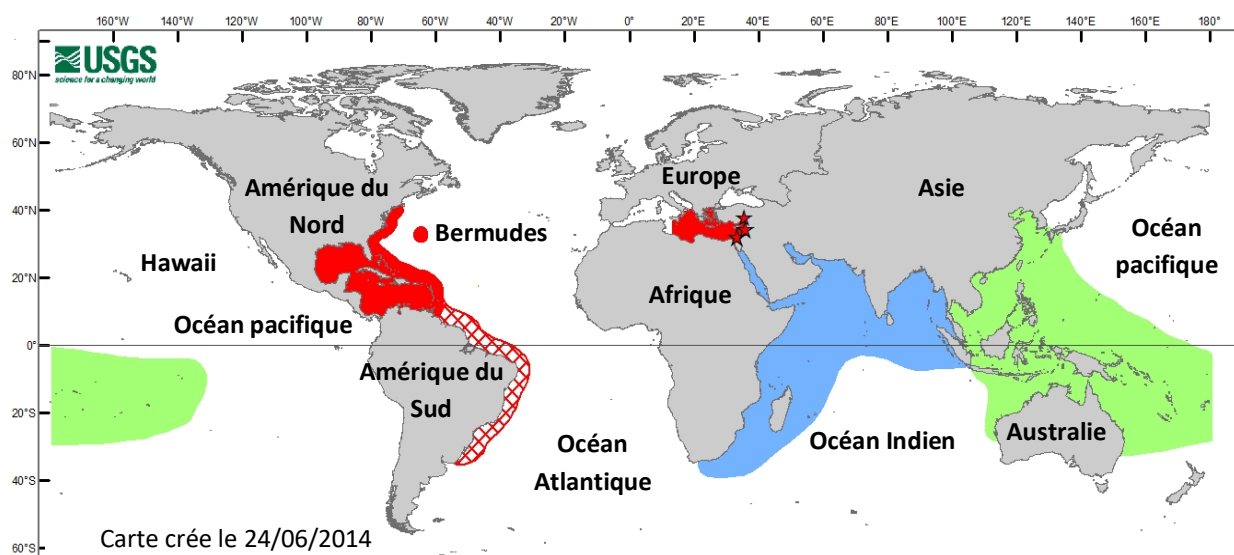


Figure 18 : Répartition géographique de *Pterois volitans* (vert) et *Pterois miles* (bleu) dans leur région native. Les étoiles situées en méditerranée indiquent la zone de migration lessepsienne. En rouge, sont représentées les zones envahies par les deux espèces. Le quadrillage rouge représente les zones susceptibles d'être envahies par ces espèces. Cette figure est adaptée de l'étude menée par U.S. Geological Survey. [2017]. Non indigenous Aquatic Species Database. Gainesville, Florida. Accessed [10/16/2017].

1.2. Mode de vie

Le poisson-lion semble conserver le même comportement en situation d'invasion que dans sa région native de l'Indopacifique (Cure et al. 2012). C'est un poisson que l'on retrouve dans les eaux tropicales jusqu'à 300 mètres de profondeur au sein des récifs coralliens, des mangroves ou des récifs artificiels, le plus souvent dans des zones abritées. Il affectionne les zones aux structures complexes, présentant des anfractuosités, des cavités et des surplombs. Il reste à l'abri durant la journée, souvent la tête en bas (Fishelson 1997). C'est une espèce qui a un comportement territorial et agressif, dès lors qu'elle est installée sur un site. Elle chasse de son territoire les autres espèces au moyen de parades d'intimidation (Fishelson 1997).

C'est un prédateur nocturne qui chasse seul ou en groupe (Lonnstedt et al. 2014). Deux techniques de chasse sont décrites. La première est active, le poisson-lion développe ses grandes nageoires pectorales et rabat sa proie afin de la gober (Fishelson 1997). Cette technique de chasse peut s'accompagner de la formation d'un flux d'eau responsable de la désorientation de la proie (figure 19) (Albins and Lyons 2012). La seconde technique principale de chasse est passive, le poisson-lion au repos attend qu'une proie se rapproche de lui pour la saisir. Sa couleur et la morphologie de ses nageoires lui permettent de se fondre dans son environnement et de surprendre ainsi ses proies.



Figure 19 : Flux d'eau généré par la bouche du poisson-lion lui permettant de désorienter sa proie. Ce flux d'eau est visible *via* un colorant bleu. Source Albins et Lyons (2012).

Le poisson-lion a un régime alimentaire qui est majoritairement piscivore lorsqu'il est adulte, il se nourrit notamment d'espèces récifales. Il peut se nourrir également de crustacés (Morris & Akins 2009, Côté & Maljkovi 2010, Green et al. 2012). Il possède une bouche protractile qu'il lui facilite la capture de nombreuses proies. Un poisson-lion adulte consomme en moyenne 8,5 g de nourriture par jour (Fishelson, 1997). Dans les

régions invasives où les proies sont moins méfiantes et moins habituées à ce prédateur, cette consommation peut aller jusqu'à 13 g par jour (Green et al. 2011).

Si le poisson-lion capture de nombreuses proies quotidiennement, il est quant à lui peu consommé au stade adulte car il ne possède pas de réels prédateurs. Le poisson-lion est en fait protégé par un appareil venimeux qui est composé de 13 épines dorsales, 3 épines anales et 2 épines pelviennes. L'anatomie d'une épine venimeuse est présentée dans la figure 17. L'épine est parcourue par deux sillons qui contiennent un tissu glandulaire à l'origine du venin (Halstead et al., 1955). L'extrait brut de venin est hémolytique sur des érythrocytes de différentes espèces (mouton, cheval lapin et poule) (Shiomi et al., 1989). Il est également létal pour les souris (Kiriake and Shiomi, 2011) et les grenouilles (Cohen and Olek 1989). Par ailleurs, cohen et olek (1989) ont montré que l'extrait de venin affectait la transmission neuromusculaire chez la palourde et la grenouille et que la présence d'une bioamine, l'acétylcholine pouvait être responsable de cet effet. Plus tard, des protéines ont été identifiées au sein du venin du poisson-lion. Il s'agit notamment de deux toxines (Pv-toxines α et β) (Kiriake and Shiomi 2011) et d'enzymes telles que les hyaluronidases, suspectées d'être allergènes (Kiriake et al. 2014) et d'aider à la propagation des toxines (Ziegman and Alewood 2015). L'étude du venin du poisson-lion comme celui d'autres espèces venimeuses est difficile du fait de leur faible stabilité, ils sont notamment très sensibles à la chaleur (Ziegman and Alewood 2015). En revanche si c'est une contrainte pour son étude, cela peut constituer un avantage d'un point de vue médical compte tenu de sa puissance. En effet, le venin du poisson-lion est considéré comme très puissant et extrêmement douloureux. Lors d'une pique la douleur est extrême et immédiate puis elle rayonne autour du point d'injection. La peau se cyanose puis rougit et gonfle en périphérie et peut se nécroser (Patel and Wells 1993; Haddad et al. 2015). Les rapports cliniques indiquent que dans 98% des cas le venin entraîne œdèmes, 90% hyper ou hypoesthésie, 62 % des cas, des crampes et enfin des éruptions cutanées avec démangeaisons dans 32% des cas (Haddad et al. 2015; Resiere et al. 2016). A côté, le venin de *Pterois volitans*, induit suivant la quantité injectée un état de choc qui se manifeste par un état de grande faiblesse, accompagné de vertiges, d'une baisse de la pression artérielle et peut parfois conduire au décès (Kizer, 1985; Resiere et al., 2016; Vetrano et al., 2012.).

1.3. Cycle de vie

Seule l'étude de la reproduction et du comportement associé chez le *pterois* nain, *Dendrochirus brachypterus* a été décrite en détails par Fishelson (1975), l'auteur a focalisé sa publication sur cette espèce tout en précisant que des observations semblables ont été faites pour d'autres *Pterois* tels que *Dendrochirus brachypterus*, *Pterois radiata* et *Pterois volitans*. Chez ces espèces gonochoriques, le mâle initie, à la tombée de la nuit, la parade nuptiale qui se décline en quatre étapes (Fishelson 1975). La première correspond à une étape de prospection qui consiste à nager lentement de femelle en femelle en ciblant celles qui ont la partie ventrale argentée. Durant la seconde étape, arborant un pattern plus sombre, le mâle semble se pavaner vers la femelle de son choix en levant la tête vers la surface de l'eau. La troisième étape consiste à encercler la femelle en étant de plus en plus près, l'une des nageoires pectorales du mâle venant au contact de la femelle. Lors de l'étape ultime, le mâle remonte à la surface suivi par la femelle. Le couple peut répéter plusieurs fois cette parade avant l'émission des gamètes. Après de multiples contacts entre les deux géniteurs, la femelle libère en surface deux poches de mucus contenant les ovocytes matures qui sont fécondés dans un second temps par le mâle. Les œufs sont ensuite laissés au gré des courants sans protection parentale (Figure 20). Alors que la femelle s'isole vers le fond, le mâle entreprend une nouvelle parade nuptiale avec une seconde femelle. Une fois la maturité sexuelle atteinte (à l'âge d'un an), une femelle est capable de pondre tous les 3 à 4 jours en continu. La taille de la ponte dépend de l'âge et

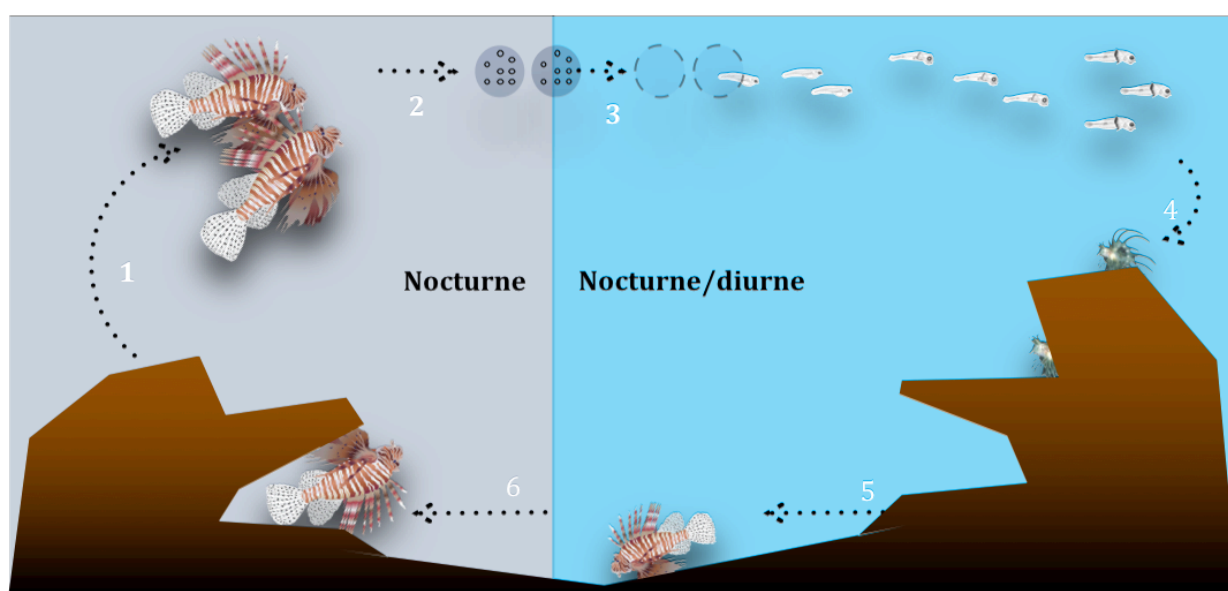


Figure 20 : Cycle de vie du poisson-lion 1) La parade nuptiale ; 2) Ponte de deux masses d'œufs enrobés d'un mucus ; 3) Eclosion des larves ; 4) Métamorphose 5) Croissance rapide des juvéniles. Retour à une vie benthique. 6. Maturité des poissons-lion.

de la taille de la femelle et contient en moyenne 30 000 œufs. Une femelle peut donc libérer près de 2 millions d'œufs par an (Fishelson 1975; Gardner et al. 2015).

Deux à trois jours après la ponte, le mucus se désagrège et libère une multitude de larves. Le développement larvaire est planctonique et dure environ 30 jours (Ahrenholz and Morris 2010) ensuite, les larves se métamorphosent et se rapprochent de la zone benthique (Figure 20). Les juvéniles ont une taille de 10 à 12 mm, et présentent des ressemblances au niveau de leur morphologie et de leur comportement alimentaire avec les adultes (Fishelson 1975). Les juvéniles vont continuer de croître rapidement avec un taux de croissance estimé de 0.9 mm par jour pour les populations invasives de l'océan atlantique et de 0.6 mm pour les populations natives du pacifique (Benkwitt and Steinke 2013; Albins 2013; Pusack et al. 2016). La vitesse de croissance diminue ensuite de façon logarithmique avec l'âge. Enfin, la maturité sexuelle est atteinte après une période d'un an (Morris 2009) et les nouvelles cohortes sont en mesure de se reproduire et d'assurer à leur tour la survie de leur espèce.

1.4. Le poisson-lion : une espèce invasive

Comme évoqué précédemment, le poisson-lion est une espèce originaire de l'Indopacifique qui a été introduite au sud de la Floride à la fin du siècle dernier. L'origine de son invasion reposerait sur la libération de plusieurs individus d'un aquarium par l'ouragan Andrew (août 1992). Très rapidement le poisson-lion a su s'étendre le long de la côte Atlantique des États-Unis, au nord du Golfe du Mexique ainsi que le long des côtes bordant la mer des Caraïbes recouvrant une zone de 7,3 millions de km² (Côté et al. 2013). En plus d'avoir conquis des régions très éloignées, le *Pterois* a atteint des densités de population très importantes qui dépassent largement celles rencontrées dans sa région native, des densités de 400 individus par hectare ont été enregistrées en région envahie contre 26 individus par hectare dans sa région native (Green and Côté 2009). Avec de telles densités en Atlantiques, la consommation de proies par an et par hectare se situe aux alentours d'une tonne. L'impact du *Pterois* est néfaste à plusieurs niveaux et notamment sur le recrutement larvaire, qui peut être diminué de 80% en 5 semaines (Albins and Hixon 2008). Il diminue aussi le nombre de proies disponibles pour les prédateurs endémiques mais aussi de certaines espèces qui ont un rôle clé pour le bien-être des récifs coralliens en participant à la réduction de macro algues au bénéfice des coraux (Albins 2015).

1.5. Connaissance immunité et les maladies associées

En plus des aspects négatifs décrits précédemment, le poisson-lion ne semble pas avoir de frein à son expansion, à l'exception de facteurs abiotiques. Il a su se reproduire dans

ces nouvelles régions et grâce à son appareil venimeux on ne lui connaît pas de prédateurs. Egalement aucune maladie n'a été décrite chez le poisson-lion. Quelques études portent sur des parasites mais il s'agit de parasites généralistes ou de parasites que l'on retrouve chez les carnivores ([Ramos-Ascherl et al. 2015](#); [Fogg et al. 2016](#)) dont certains affecteraient encore moins le *Pterois* que d'autres espèces ([Sikkel et al. 2014](#)). Le *Pterois* est souvent décrit comme étant plus résistant aux infections que d'autres espèces mais il n'y a pas de réelles études à ce sujet. [Albins \(2016\)](#) a décrit le suivi d'un spécimen blessé sous la nageoire dorsale par une flèche de harpon. Ce dernier est resté à l'abri dans le récif. 24 heures après, sa blessure semblait refermée et était recouverte de mucus. Deux semaines plus tard la plaie n'était plus visible, il ne restait qu'un défaut de pigmentation ([Albins 2016](#)).

A la vue de ces données, Il semblerait que le système immunitaire du poisson lion soit efficace.

2. Système immunitaire des poissons téléostéens

Les poissons sont exposés en permanence à des agents pathogènes comme les bactéries, les champignons ou autres virus. Ils doivent être en mesure de se protéger afin de pérenniser leur espèce. Le maintien de leur intégrité se fait grâce au système immunitaire qui est composé de mécanismes de défense innés et adaptatifs.

L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes et est active et présente dans l'organisme avant toute exposition à des agents infectieux grâce à sa non-spécificité. La défense immunitaire innée est présente chez tous les organismes multicellulaires mais aussi de manière plus primitive chez les organismes unicellulaires capables de phagocyter ou de produire des peptides antimicrobiens ([Bruhn et al. 2003](#); [Adem Bahar et al. 2013](#)).

Les premiers signes d'immunité adaptative sont apparus chez les Chondrichthyens avec l'apparition des premières immunoglobulines et des gènes RAG (Recombination Activating Genes) il y a 450 millions d'années ([Figure 21](#)) ([Litman et al. 2010](#)). Les produits de ces gènes par des réarrangements somatiques permettent de générer de façon aléatoire les molécules de reconnaissance, tels que les immunoglobulines, les récepteurs des lymphocytes B (BCR) et T (TCR) qui sont des effecteurs clefs de la réponse immunitaire adaptative ([Zhang et al. 2014](#)). L'immunité adaptative en fait se développe après une exposition à des pathogènes. Les lymphocytes induits par un pathogène

reconnu prolifèrent de façon clonale et deviennent des cellules effectrices (Gellert 2002). Le système immunitaire adaptatif constitue un système de défense efficace grâce à sa spécificité, à sa mémoire et permet une réaction plus rapide lors de nouvelles expositions à un même pathogène reconnu.

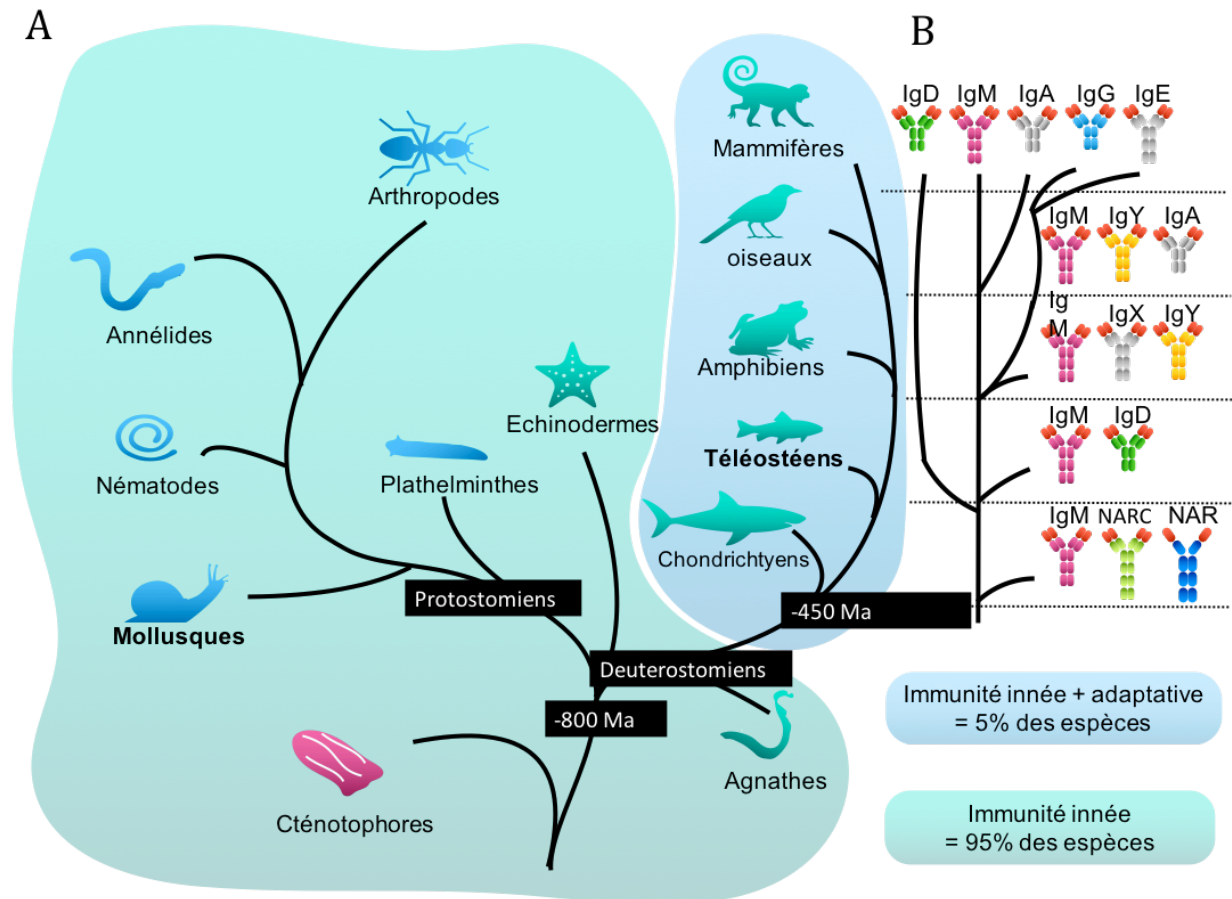


Figure 21: Evolution du système immunitaire. (A) Distribution de l'immunité adaptative et innée au sein du règne animal. le clade avant la séparation des protostomiens et des deutérostomiens est rose, les protostomiens sont bleus et les deutérostomiens sont verts. Les clades regroupés dans la zone verte ont un système immunitaire qui repose uniquement sur des mécanismes innés. Les clades regroupés dans la zone bleue possèdent un système immunitaire composé de mécanismes innés et adaptatifs (B) Evolution et répartition des superfamilles d'immunoglobulines présentes des chondrichthyens jusqu'aux aux mammifères. Ig correspond à immunoglobuline.

Ces deux mécanismes de défense fonctionnent en étroite relation afin de maintenir l'intégrité des organismes. Cette introduction se focalise principalement sur les premières barrières de défense chez le poisson en ciblant particulièrement la peau.

La phase de reconnaissance des organismes pathogènes constitue un élément important de la réponse immunitaire innée. Elle est possible grâce à la présence de PRR « Pattern Recognition Receptors (PRR) capables de reconnaître des motifs particuliers appelés PAMPs « Pathogen Associated Molecular Patterns » ([Medzhitov and Janeway 1997](#)). Ces motifs reconnus sont par exemple les lipopolysaccharides (LPS) communs aux bactéries à gram-négatif, les acides téichoïques des bactéries à gram-positif, les β -1.3 glucanes des champignons ou encore les ARN double brins de virus ([Magnadóttir and Magnadóttir 2006](#)). La reconnaissance de l'un de ces éléments entraîne l'activation de mécanismes de défense. Ces PRR peuvent constituer des effecteurs solubles présents à la surface de la peau, tels que les lectines ou d'autres effecteurs humoraux. Ils peuvent également être exprimés à la surface de cellules immunitaires non spécifiques comme les granulocytes, les macrophages et des cellules cytotoxiques tels que les NK ([Medzhitov and Janeway 1997](#); [Stafford and Belosevic 2003](#)).

D'abord identifiés chez la drosophile ([Anderson et al. 1985](#)) puis chez les vertébrés les TLRs sont décrits comme étant impliqués dans la reconnaissance du non-soi ([Medzhitov et al. 1997](#)). Le poisson rouge est le premier modèle chez qui les TLRs ont été reportés, ils ont par la suite également été décrits chez le tétraodon et le zebrafish ([Stafford and Belosevic 2003](#)). Chez les poissons, il existe une grande diversité de TLRs, plus de 20 types différents ont été identifiés à ce jour. Ils reconnaissent de manière spécifique les PAMPs ([Zhang et al. 2014](#)). La reconnaissance d'un pathogène par un TLR entraîne l'activation d'une cascade de signalisations bien décrites chez les poissons ([Zhang et al. 2014](#)) qui a pour objectif d'entraîner la synthèse et la libération d'effecteurs de la réponse immunitaires comme les iNOS (inducible Nitric Oxyde-Synthase), les lectines, les molécules du complément, et les peptides antimicrobiens PAMs ([pahl, 1999](#)).

A côté de la réponse immunitaire induite par la présence de pathogènes, de nombreuses molécules œuvrant pour la protection de l'hôte sont exprimées de manière constitutive et sont déjà présentes au niveau de l'organisme et notamment au niveau de la peau, qui possède aussi un rôle crucial dans la prévention des infections.

2.1. La peau des poissons

La peau des poissons constitue la 1^{ère} barrière [figure 22](#). Sa structure est complexe, au-delà des cellules épithéliales, elles renferment des osteoblastes à l'origine des écailles, des chromatophores (mélanophores, xanthophores...) à l'origine des couleurs et une multitude de leucocytes. La peau correspond ainsi à une structure pluristratifiée en renouvellement constant, les cellules en surface étant à l'origine de la production de mucus ([Rakers et al. 2010](#)). Le mucus a de multiples rôles, il intervient dans la régulation osmotique, ionique, acido-basique, les échanges gazeux et également dans la locomotion ([Shephard 1994](#)). Il participe à la formation d'un biofilm ([Shephard 1994](#)). Le mucus intervient ainsi par son biofilm et par sa richesse en effecteurs immunitaires dans la défense immunitaire ([Rakers et al. 2010](#)).

Le mucus est une fine couche visqueuse sécrétée à la surface de l'épiderme par des cellules spécialisées. Les Mucines en sont les constituants majoritaires, ce sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (> 200 KDa) qui interagissent avec d'autres protéines, ions et lipides ([Gomez et al. 2013](#)). Ce mucus possède des propriétés d'agglutination plus ou moins prononcées en fonction de sa composition et qui peut varier en fonction des espèces ([Ángeles Esteban 2012](#)). A ce mucus sont associées diverses molécules qui permettent de lutter contre les pathogènes et constituent une protection efficace [Figure 22](#) ([Rakers et al. 2013](#)) :

a) Les Enzymes

Le lysosyme (> 10 KDa) est l'une des principales enzymes retrouvées dans le mucus de poissons comme chez le saumon ([Uribe et al., 2011](#)). C'est une enzyme qui agit sur les liaisons covalentes ($\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique) entre l'acide N-acétyl-muramique et N-acétyl-glucosamine retrouvée notamment au sein des peptidoglycanes de la paroi cellulaire des bactéries à gram-positif ([Saurabh and Sahoo 2008](#)). Le lysozyme a également une activité sur les bactéries à gram-négatif avec l'aide du système complément ([Stafford and Belosevic 2003](#)). Le lysozyme est retrouvé associé à des produits de sécrétion comme la salive ou le mucus chez de nombreux animaux ([Saurabh and Sahoo 2008](#)) c'est le cas pour le poisson plat *Paralichthys olivaceus* ([Sung Jung et al. 2012](#)) ou les saumons ([Uribe et al. 2011](#)). L'alkaline phosphatase (AP) est une enzyme impliquée largement dans le système de défense inné. Elle est retrouvée non seulement au niveau du mucus sécrété par la peau et les intestins, mais également au niveau sanguin ([Nigam et al. 2012](#)). L'étude de l'AP chez

le saumon de l'Atlantique montre qu'elle est présente dans le mucus et sa concentration augmente en présence de parasites (Rossi et al. 2000), L'AP est aussi très présente lors de la régénération de la peau du poisson chat après lésion (Ángeles Esteban 2012). Cette enzyme a une activité antibactérienne grâce à sa capacité hydrolytique (Iger and Abraham 1990). Les protéases sont également des enzymes clés présentes au sein du mucus des poissons, elles comprennent notamment la trypsine ou encore les cathepsines L, B et D. Ces protéases interviennent dans la protection de l'hôte en agissant directement sur les protéines des bactéries ou bien en modifiant la structure du mucus. Ces protéases peuvent également activer par clivage d'autres effecteurs immunitaires tels que des peptides

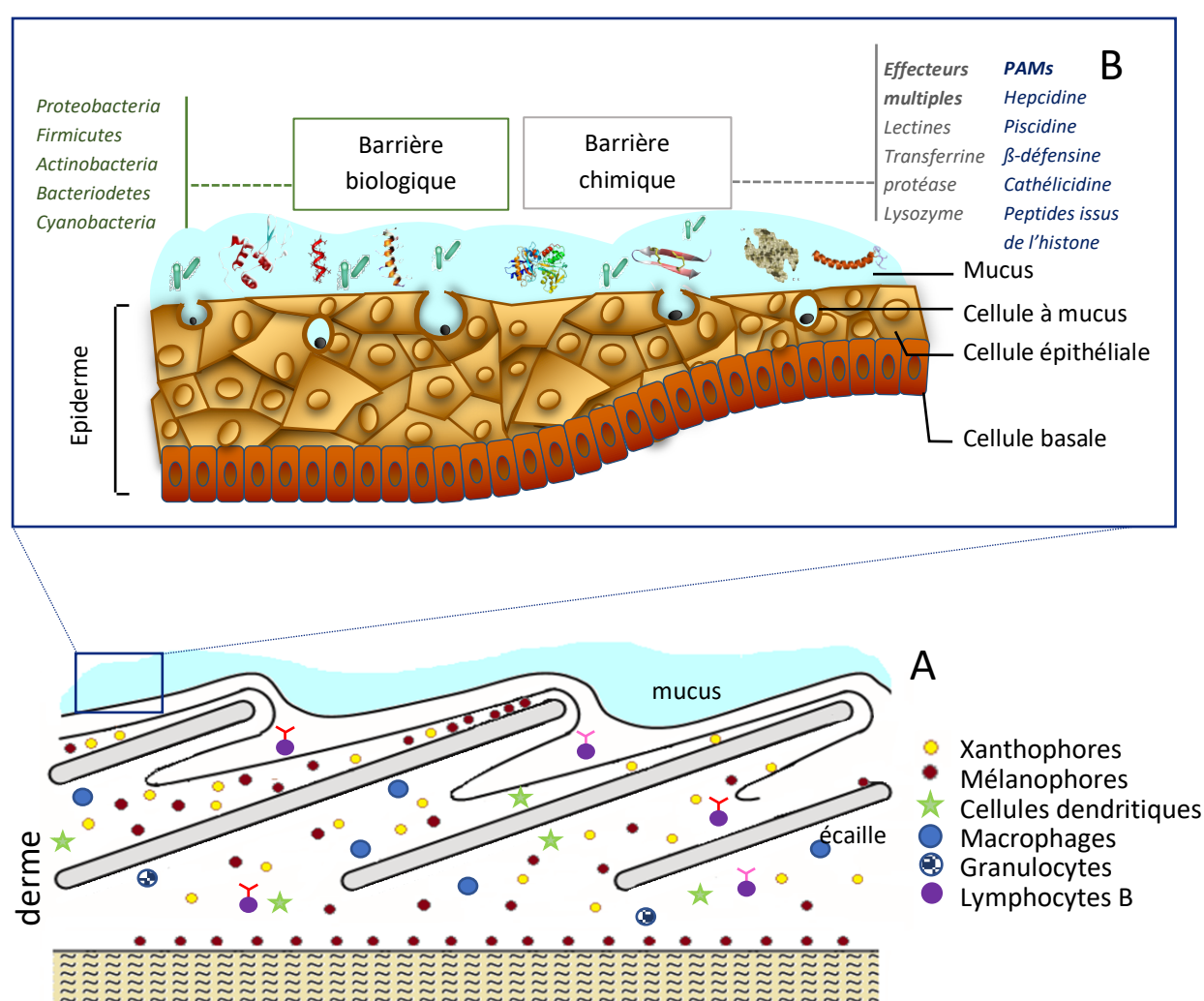


Figure 22 : Illustration de la peau des Téléostéens.(A) Vue générale ; (B) détail de l'épiderme.

antimicrobiens (Ángeles Esteban 2012). Par exemple la cathepsine D, chez le poisson chat est présente sous sa forme non active (procathepsine D) au niveau du mucus associée à la peau. Lors d'infections une metalloprotéase non caractérisée est induite, puis clive la

procathepsine D. La cathepsine D clive alors la liaison serine¹⁹-arginine²⁰ de l'histone H2A, et permet la libération de la parasine I, qui est un peptide antimicrobien (Cho et al. 2002).

b) Les lectines

Les lectines jouent un rôle important dans l'immunité innée et adaptative chez les poissons. Ce sont des glycoprotéines capables d'agglutiner et de se lier aux carbohydrates et de précipiter les cellules associées. Elles jouent aussi le rôle de molécules de reconnaissance capables d'entraîner une réponse immunitaire en interagissant avec les composants cellulaires de pathogènes par le biais du complément par exemple et d'activer la phagocytose (Ángeles Esteban 2012). Les lectines se divisent en plusieurs groupes comprenant les lectines de type C, I, F les pentraxines, Les calnexines et les galectines (Andréa and Bezerra 2013). Elles ont été identifiées chez les vertébrés et sont présentes chez tous les poissons, des requins jusqu'aux téléostéens comme le saumon ou la carpe (Russell and Lumsden 2005). La revue proposée par André et Bezerra (2013) s'intéresse aux lectines de poissons, ils reportent par ailleurs les fonctions associées à chacun des différents groupes de lectines connus.

Les Galectines ou lectines de type-S se lient particulièrement aux β -galactosidoses et elles interviennent dans la réponse inflammatoire ou dans le contrôle de la croissance cellulaire et de l'apoptose.

Les lectines de type-C dont l'activité dépend de la présence de calcium (Ca^{2+}) interviennent dans l'immunité innée, la promotion de la phagocytose, l'activation du système complément, l'adhésion cellulaire ou encore dans le transport des leucocytes au niveau du site d'infection.

Les pentraxines sont également dépendantes des ions calciums pour exercer leurs fonctions, elles reconnaissent les éléments étrangers et les cellules aberrantes à détruire. Elles opsonisent les éléments dangereux et entraînent leur destruction en activant le système complément.

Les lectines de types F agissent essentiellement en tant que molécules de reconnaissance au sein du système immunitaire inné

Les lectines ont été détectées au niveau du mucus sécrété par la peau de quelques poissons tels que l'anguille, le poisson chat, la sole pour ne citer qu'eux et ont également

été identifiées au niveau des œufs de ces mêmes espèces (Andréa and Bezerra 2013). Elles entraînent l'agglutination de nombreux pathogènes. Les lectines du mucus du poisson plat (*windowpane flounder*) agglutinent des levures marines, celles isolées du mucus de l'anguille agglutinent *vibrio anguillarum* (Stafford and Belosevic 2003).

c) *Les transferrines*

Le fer est un élément essentiel pour le métabolisme intermédiaire et secondaire, l'activité enzymatique, la croissance, le caractère pathogénique des bactéries et de nombreuses autres fonctions (Messenger and Barclay 1983). Chez les vertébrés, l'homéostasie du fer est maintenue par des protéines qui ont une grande affinité pour cet élément. La transferrine, une glycoprotéine de 70 à 80kDa est l'une des principales protéines qui régulent la disponibilité du fer par son transport, son absorption et son stockage, il s'agit de sa fonction principale. Aussi elle évite les excès de fer qui sont toxiques pour l'organisme (Stafford and Belosevic, 2003). La transferrine participe à l'immunité en abaissant le niveau de fer et crée un environnement hostile au développement de bactéries. Elle est retrouvée dans le sang et également au niveau du mucus, de manière constitutive chez le saumon, le bar et la brème et est surexprimée lors d'infection chez le saumon (Brinchmann 2016). Par ailleurs, les produits de clivages de la transferrine entraînent l'activation des macrophages chez le poisson rouge (Stafford and Belosevic 2003).

d) *Les PAMs chez les poissons*

A côté des molécules citées précédemment, Les peptides antimicrobiens font partie des effecteurs majeurs du système de défense immunitaire (Zasloff 2002). Ils sont connus pour leur action rapide, directe sur les pathogènes et sont considérés comme des molécules essentielles de la première ligne de défense de l'immunité innée. De nombreux PAMs ont été caractérisés chez Les téléostéens (Masso-Silva and Diamond 2014). Sur la base d'homologie de séquences entre les différents PAMs, plusieurs familles de PAMs ont émergé. Parmi lesquels nous comptons les défensines, les LEAP (Liver Expressed Antimicrobial Peptide), les cathélicidines, les piscidines et les peptides dérivés de l'histone (Masso-Silva and Diamond 2014). Certains d'entre eux comme les défensines, les cathélicidines ainsi que les LEAPs sont des PAMs riches en cystéines également présents chez les mammifères. Ces peptides riches en cystéines seront décrits plus en détail dans une partie qui leur est consacrée. Par ailleurs, les piscidines ont été identifiées pour la

première fois dans les années 2000 et depuis, elles constituent une famille de PAMs spécifique des poissons qui est de plus en plus étudiée.

A côtés de ces peptides décrits précédemment il existe une catégorie de PAMs plus atypique et longtemps insoupçonnée, il s'agit de peptides cryptiques dérivés de protéines. En 1958, Hirsch démontra l'activité bactéricide de l'histone B sur différentes souches bactériennes dont *Escherichia coli*, *salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*. Plus tard, Park et collaborateurs (1995) purifiaient à partir d'extrait peptidique d'estomac de grenouille asiatique deux peptides antimicrobiens qu'ils ont appelés Burofine I et II, ces peptides étaient en fait issus de l'histone H2A. L'histone joue un rôle dans la défense immunitaire à travers ses produits de dégradation comme tend à le montrer leur activité antimicrobienne (Parseghian and Luhrs 2006). Les études réalisées sur la peau et le mucus associées aux téléostéens ont mis en évidence la présence de nombreux peptides antimicrobiens issus de l'histone tels que la parasine I chez le poisson-chat, *Parasilurus asotus*, (Park et al. 1998b), l'histone H1 chez le saumon d'Atlantique (Richards et al. 2001), l'oncorhyncine II de la truite, *Oncorhynchus mykiss* (Fernandes 2004) et l'hipposine chez le flétan, *Hippoglossus hippoglossus* (Birkemo et al., 2003). Ces peptides sont actifs sur de nombreuses cibles à de faibles concentrations, par exemple l'hipposine inhibe 8 bactéries gram-positives dont *Bacillus subtilis* (1.3-2.5µM) et 12 bactéries gram-négatives dont *Vibrio anguillarum* (5-10µM) (Birkemo et al., 2003). D'autre part l'oncorhyncine II inhibe *Micrococcus luteus* et *Planococcus citreus* entre 0.2 et 0.4µM (Fernandes 2004). Par ailleurs des questions se posent sur les paramètres qui conditionnent la participation de ces fragments d'histones dans l'immunité innée. Leur présence, au sein du mucus, est-elle due à la libération de contenus cellulaires de cellules mortes ou est-ce que le clivage de l'histone est induit par la présence de pathogènes ?

3. Objectifs

Il n'y a actuellement aucune donnée concernant les effecteurs immunitaires chez le poisson-lion. C'est un poisson qui ne semble pas être affecté par les maladies infectieuses, il est invasif et son expansion ne semble pas être limitée. Les données rassemblées chez les autres téléostéens, montrent qu'il y a des familles de PAMs bien définies. Par ailleurs, les PAMs ainsi que les effecteurs immunitaires décrits précédemment semblent être particulièrement présents au niveau de la peau, de manière constitutive ou induite. L'objectif de ce chapitre est d'identifier les PAMs présents au niveau de la peau du

poisson-lion. Outre l'aspect fondamental que constitue l'identification de PAMs chez cette espèce invasive, l'objectif final de cette recherche est de sélectionner et d'évaluer le potentiel de PAMs pour une utilisation en aquaculture et notamment dans l'écloserie.

B. Les PAMs riches en cystéines chez les poissons

1. Etat de l'art

Chez les poissons téléostéens, Le système immunitaire bien que composé de mécanismes innés et adaptatifs semble s'appuyer sur la présence de nombreux effecteurs immunitaires qui possèdent une action directe sur les agents pathogènes, les PAMs. De nombreux PAMs sont décrits chez les téléostéens, il y a notamment les PAMs riches en cystéines qui sont retrouvés chez d'autres organismes que les téléostéens comme les mammifères par exemple. Au sein de ce grand groupe que représentent ces PAMs riches en cystéines, plusieurs familles de PAMs se distinguent, parmi elles il y a : les β -défensines, les cathélicidines et les LEAPs « Liver Expressed Antimicrobial Peptide » dont la description est faite ci-après.

Les β -défensines

La famille des défensines est probablement la famille de PAM la plus étudiée et la plus connue. Elle est composée de peptides riches en cystéines de poids moléculaire compris entre 2 et 5 KDa (Zhao and Lu 2014). Elles sont retrouvées chez les plantes, les champignons, les insectes et les vertébrés (Wong JH, Xia L 2007). Nous avons évoqué plus haut la distinction de 3 sous-familles de défensines chez les mammifères avec les α , les β et θ défensines. Chez les poissons uniquement la sous-famille des β -defensines a été reportée à ce jour (Zou et al. 2007a; Casadei et al. 2009a; Cuesta et al. 2011). Les premières défensines de poisson ont été identifiées chez le poisson-zèbre, le fugu et le tetraodon (Zou et al., 2007). A ce jour 19 défensines ont été identifiées chez 12 espèces de poissons différentes, certains espèces comme le poisson plat *Paralichthys olivaceus* en compte 5, tandis qu'une seule est décrite chez la daurade royale, *Sparus aurata* (Masso-Silva and Diamond 2014). Chez les poissons, les défensines sont retrouvées dans différents tissus tels que les intestins, le foie, les gonades, la rate, les reins et la peau. Toutefois, La peau est le tissu dans lequel l'expression basale de la défensine est la plus importante (Cuesta et al. 2011; van der Marel et al. 2012; Masso-Silva and Diamond 2014). Les études fonctionnelles des défensines de poisson ne sont pas nombreuses. Cependant, la β -defensine de la morue d'Atlantique produit en système recombinant est capable

d'inhiber *Planococcus citreus* et *Micrococcus luteus* deux bactéries à gram-positif à des concentrations minimales inhibitrices respectives de 0.4-0.8 μ M et 25-50 μ M (Ruangsri et al. 2013). Le peptide synthétique de la défensine du medaka est quant à lui capable d'inhiber la croissance de plusieurs bactéries notamment à gram-négatif comme *Aeromonas hydrophila* (13.4 μ M) ou *Escherichia coli* (32.6 μ M) (Zhao et al. 2009). Certaines défensines de poisson sont capables d'inhiber des virus de poissons marins (Jin et al. 2010; Guo et al. 2012). A côté de ces activités où le microorganisme est ciblé directement par le peptide, l'étude de la β -défensine de la morue d'Atlantique, *Gadus morhua* montre qu'elle peut augmenter l'activité de phagocytose des leucocytes présents au niveau des reins (Ruangsri et al. 2013). Ensemble ces données montrent que les β -défensines présentes chez les poissons jouent un rôle important dans la défense de l'hôte, notamment au niveau de la peau.

Les cathélicidines

Chez les mammifères les cathélicidines forment une famille de PAMs qui regroupe des peptides dont les séquences en acides aminés des formes matures ne présentent pas de fortes homologies. Cependant des homologies de séquences sont trouvées au niveau du précurseur et plus particulièrement au niveau du peptide signal ainsi que dans la région N-terminale du propeptide, avant le site de clivage du peptide mature. Cette région est appelée le domaine catheline (Tomasinsig and Zanetti 2005). Les cathélicidines sont retrouvées chez un invertébré, la myxine (Uzzell et al. 2003), chez tous les vertébrés et également chez les amphibiens (Lai and Gallo 2009). Chez l'homme, on ne trouve qu'un seul gène codant pour une cathélicidine, il s'agit de la hCAP18. C'est une protéine de 18 KDa qui possède deux ponts disulfures et qui est capable d'inhiber la cathepsin-L. Au sein des neutrophiles, des cellules NK et également des mastocytes la hCAP18 est clivée en région C-ter par une protéase à serine (élastase) de manière à libérer un peptide de 37 aa, la LL-37. Ce peptide y est stocké à des concentrations atteignant les 40 μ M (Lai and Gallo 2009; Duplantier and van Hoek 2013) la LL-37 est par ailleurs libérée de manière constitutive au niveau de la peau (Dürr et al. 2006). La LL 37 est active contre de nombreuses cibles, incluant bactéries, virus, champignons, parasites, cellules cancéreuses... à des MIC parfois inférieure à 0.7 μ g.mL⁻¹(Dürr et al. 2006). Chez les poissons, c'est chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) que le premier gène codant pour une cathélicidine a été identifié (Goetz et al. 2004; Chang et al. 2005). Peu après Chang et collaborateurs (2006) identifient un nouveau gène chez la truite et deux autres chez le

saumon (*Salmo salar*) (Chang et al. 2006). Les auteurs remarquent de fortes homologies de séquences entre ces précurseurs. Cette conservation concerne surtout le peptide signal et la région codant pour le prodomaine contenant les 4 cystéines conservées (le domaine catheline) (Chang et al. 2006). La région codant pour le peptide mature est quant à elle très peu conservée, confirmant les observations reportés chez les mammifères pour lesquelles cela est plus documentés (Dürr et al. 2006). Avec l'identification de nouvelles cathélicidines chez la morue et la truite mouchetée, il a été suggéré que chez les poissons il pourrait exister deux classes de cathélicidines distinctes (Maier et al. 2008; Masso-Silva and Diamond 2014). L'une regrouperait des peptides linéaires, telles que chez la morue (Maier et al. 2008) tandis que l'autre réunirait des peptides formant un pont disulfure, comme chez la truite (Chang et al. 2005). L'analyse de Masso-Silva et Diamond (2014) indique que les précurseurs de cathélicidines d'une même classe peuvent partager jusqu'à 90% d'identité mais qu'entre deux classes différentes les homologies sont très faible. Par ailleurs la caractérisation du peptide mature de la cathélicidine de morue a permis de confirmer le site de clivage du peptide mature « RXRR » également retrouvé chez les autres poissons (Broekman et al. 2011). Il correspond à un site de clivage à serine protéase comme chez les mammifères (Dürr et al. 2006; Broekman et al. 2011). Cette cathélicidine a été identifiée sur la base de son activité antibactérienne sur *Bacillus megaterium* à la suite de 3 étapes de séparation en chromatographie liquide (Broekman et al. 2011). A côté, il semblerait que l'activité des cathélicidine soit relativement spécifique de certaines cibles en fonction des espèces. La codCATH synthétique est active sur des bactéries gram-négatives (moyenne 10µM) et sur des champignons (2.5µM) mais pas sur les bactéries gram-positives (Broekman et al. 2011). La cathélicidine de la myxine est quant à elle active sur les bactéries gram-négatives et positives mais pas sur les champignons (Uzzell et al. 2003). Les deux cathélicidines de la truite semblent avoir des activités différentes sur les bactéries gram négatives notamment, ce qui pourrait suggérer une certaine complémentarité (Chang et al. 2006). Les gènes codants pour les cathélicidines présentent par ailleurs des niveaux d'expressions variables. Chez la truite mouchetée, on retrouve une faible expression dans tous les tissus tels que la peau, le cerveau, les reins, le foie, l'intestin, les muscles, le cœur... et une surexpression est observée en présence de *Aeromonas salmonicida* (Maier et al. 2008). Chez la truite, les différents gènes codants pour les cathélicidines ne présentent pas les mêmes profils d'expressions. En effet l'une est exprimée de manière constitutive dans les branchies, les reins le foie, la rate et la peau et est surexprimé après stimulation bactérienne. L'autre

n'est présente que dans le foie 24h après la stimulation bactérienne (Chang et al. 2006), suggérant des fonctions différentes. Enfin, si chez les mammifères on connaît de multiples fonctions concernant les cathélicidines, les recherches portant sur celles de poissons sont encore réduites. Toutefois l'étude des cathélicidines de saumon suggèrent qu'elles aient un rôle immunomodulateur en stimulant l'expression de cytokines (Bridle et al. 2011).

Les LEAPs « Liver Expressed Antimicrobial Peptide »

Cette famille de PAMs regroupe des peptides qui sont exprimés au niveau du foie « Liver ». C'est chez l'humain que la première LEAP plus couramment appelée hepcidine a été caractérisée (Krause et al. 2000; Park et al. 2001) puis chez les reptiles, les amphibiens et les poissons. La première identifiée chez les poissons est l'hepcidine du bar hybride rayé à la suite d'un challenge bactérien (Shike et al. 2002). Depuis plus de 37 hepcidines ont été identifiées chez les poissons (Masso-Silva and Diamond 2014). Les hepcidines sont des PAMs relativement courts de moins de 30 aa pouvant former 3 ou 4 ponts disulfures dont la structure tertiaire est un feuillet- β . Des hepcidines identifiées chez certaines espèces sont codées par de multiples copies de gènes comme chez le poisson zèbre et d'autres téléostéens (Douglas et al., 2003; Robertson et al., 2009; Shike et al., 2004). L'expression du gène codant pour l'hepcidine chez le poisson varie en fonction de l'espèce, le foie peut en exprimer une ou plusieurs tandis que d'autres tissus comme les reins, la rate, les muscles et la peau en expriment une d'entre elles ou aucune (Bao et al., 2005; Hirono et al., 2005; Rodrigues et al., 2006). En plus d'être actif sur des bactéries à gram-positifs et négatifs l'hepcidine intervient dans la régulation du fer grâce au motif ATCUN (Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding) qu'il possède en N-terminale, cette régulation du fer pourrait également jouer un rôle dans l'immunité du poisson de la même manière que la transferrine (Rodrigues et al. 2006). La LEAP-2 est le second PAM synthétisé au niveau du foie identifié chez l'humain. La truite est le premier modèle de poisson chez qui deux LEAP-2 ont été identifiées (Zhang et al. 2004) et on compte plus d'une quinzaine d'espèces qui présente ce PAM (Li et al. 2015). C'est un peptide antimicrobien long d'une quarantaine d'acides aminés qui possède 2 ponts disulfures (Hocquellet et al., 2010). L'expression de la LEAP-2 augmente lors de challenge bactérien notamment au niveau des intestins pour la truite (Zhang et al. 2004) et au niveau de la peau chez la carpe (Yang et al. 2014a). L'expression de ces LEAP dépend des espèces de poissons. Plusieurs isoformes sont reportées chez certains poissons et les expressions sont différentes (Yang et al. 2014a; Li et al. 2015). Si leur implication dans l'immunité a

été longtemps étudiée à travers l'analyse de leur expression lors de challenge bactérien chez les poissons, leur activité antimicrobienne a été, quant à elle, très peu étudiée. Toutefois, La LEAP-2 de l'ayu est capable d'inhiber la croissance de *Vibrio anguillarum* et d'*Edwardsiella tarda* à une concentration de 6.25 µg.ml⁻¹ ([Li et al. 2015](#)).

2. Les PAMs riches en cystéines identifiés chez le poisson venimeux, *Pterois volitans*.

Cette étude a pour objectif de présenter les PAMs riches en cystéines présents au niveau de la peau du poisson-lion.

Les résultats de cette étude ont été intégrés dans une publication en cours de soumission dans la revue internationale "Peptides". Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

Cette étude constitue la première description de PAMs chez le poisson venimeux, *Pterois volitans*. Le transcriptome *de novo* ciblé de l'appareil venimeux du poisson-lion a permis d'identifier plusieurs PAMs dont 4 d'entre eux codent pour des PAMs riches en cystéine. Ces PAMs sont relatifs au LEAP-2 et à l'hepcidine tous deux de la famille des « Liver Expressed Antimicrobial Peptides » et également à la β -defensine et à la NK-lysine. L'approche peptidomique menée en parallèle a permis de confirmer la présence d'au moins l'un de ces PAMs, la β -defensine. Par ailleurs, les PAMs identifiés chez le poisson-lion ont été alignés avec les PAMs d'autres vertébrés. Les résultats montrent de très fortes homologies de séquences avec la conservation de caractéristiques propres à chacun de ces PAMs. Cela inclut le nombre de cystéines ainsi que leur position, la présence de motifs particuliers en acides aminés et la conservation de site de clivage enzymatique. Ensemble ces données suggèrent une évolution commune de ces PAMs concernant leur rôle dans la protection de l'hôte contre les infections. Par ailleurs, au niveau de l'appareil venimeux, ils pourraient être impliqués lors de l'envenimation dans la protection de l'hôte et/ou accentuer l'effet du venin notamment.

Cysteine-rich antimicrobial peptides in the venomous fish *Pterois volitans*.

Baptiste Houyvet^{a,d}, Yolande Bouchon-Navaro^b, Claude Bouchon^b, Erwan Corre^c, Céline Zatylny-Gaudin^{a*}

^aNormandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France

^bUniversité des Antilles, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UNICAEN, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Labex Corail, Campus de Fouillole, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

^cPlateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (UPMC-CNRS), F-29688 Roscoff, France

^dSATMAR, Société ATLantique de MARiculture, 50760 Gatteville-Phare, France

*Corresponding author

E-mail: celine.gaudin@unicaen.fr

Highlights

- Identification of antimicrobial peptides for the first time in lionfish.
- Cysteine rich peptides related to hepcidin, LEAP-2, NK lysin and β -defensin.
- Key immune factors associated to venom apparatus

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) participate to the immune system to avoid infection and are present in all living organisms. Fish express numerous AMP families including defensins, cathelicidins, LEAPs (liver-expressed antimicrobial peptides), histone-derived peptides, and piscidins (a fish-specific AMP family). These families are well described in non-venomous fish, but undocumented in venomous fish. The present study demonstrates for the first time the occurrence of AMPs in the venomous lionfish. From a unique and targeted transcriptome of the venom apparatus of *Pterois volitans*, we identified 4 transcript sequences encoding cysteine-rich antimicrobial peptides (AMPs). These AMPs are related to liver-expressed antimicrobial peptides (hepcidin and LEAP-2), β -defensin, and NK-lysin, and show high structural conservation. They are described for the first time in a species of the Scorpaenidae family. A peptidomic approach allowed us

to confirm the presence of at least one of them. The great level of conservation of these lionfish AMPs with related AMPs from other fish and mammalian species support their evolutionary role in defense against diseases. Our results also suggest that these numerous AMPs are present to protect the venom apparatus of *Pterois volitans* following envenomation and/or to enhance the action of venom.

Keywords: venomous fish; lionfish; antimicrobial peptides; transcriptome; innate immunity

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are the major cornerstone of the innate immune system that act to protect their host against infection. Their diversity is huge. They are found in all living organisms ranging from microorganisms to pluricellular organisms like plants and animals. AMPs differ in structure and activity (Ganz & Lehrer 1998; Hoffmann et al. 1999; Lehrer & Ganz 1999; Zasloff 2002). Fish are a major component of the aquatic fauna. They live in a microbe-rich environment and are permanently surrounded by aquatic pathogens. Their skin has a key function in physical and physiological protection as a first defense barrier where AMPs play an antagonistic role against invasive pathogens. Several AMPs have been identified recently in fish, including liver-expressed antimicrobial peptides (hepcidins and LEAP-2), defensins, cathelicidins, histone-derived peptides, and a fish-specific family called piscidin (Masso-Silva & Diamond, 2014). Among the AMPs characterized so far in fish, some of them are also found in mammals, in particular cysteine-rich peptides which make up a large AMP group that includes hepcidins, LEAP-2s, β -defensins, and cathelicidins. The first fish hepcidin was described in gills of hybrid striped bass after bacterial challenge (Shike et al. 2002). Hepcidins have also been identified in several species of fish in which they are generally encoded by multiple distinct hepcidin genes, as in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), Atlantic salmon, (*Salmo salar*), zebrafish (*Danio rerio*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*) or smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) (Douglas et al., 2003; Robertson et al., 2009; Shike et al., 2004). Gene expression of fish hepcidins is variable and depends on the species. Liver expresses one or more hepcidin genes, while other tissues like kidney, spleen, stomach, skin and muscle express only one of them or none of them (Bao et al., 2005; Hirono et al., 2005; Rodrigues et al., 2006). Mature fish hepcidins can have six or eight cysteine residues as observed in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepcidin-like peptides (Douglas et al., 2003). In

addition to antimicrobial activity against fungi and both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Lauth et al. 2005; Yang et al. 2011), hepcidin can act as an iron-regulatory hormone (Rodrigues et al. 2006). A second cysteine-rich antimicrobial peptide derived from liver LEAP-2 was identified in fish, with four highly conserved cysteine residues. The first two LEAP-2s in fish were identified in rainbow trout and displayed constitutive expression in liver and inducible expression in intestine and skin (Zhang et al. 2004). LEAP-2 is an important immune factor involved in the immune response against pathogens in fish (Zhang et al. 2004; Yang et al. 2014a; Liu et al. 2014). Among AMPs we also found the defensin family, which is widely distributed among fungal, plant and animal lineages. With their conserved compact structure displaying a set of cationic loops, defensins display multiple innate immune functions (Shafee et al. 2016). Vertebrate defensins have a characteristic β -sheet-rich fold involving six cysteines connected by disulfide bonds. The pairing of cysteines and the length of amino acid sequences between cysteines resulted in the family being subdivided into α -defensins and β -defensins (Ganz 2003). Only β -defensin-like structures have been observed in fish to date (Zou et al. 2007a; Casadei et al. 2009a; Cuesta et al. 2011). The first fish defensins were discovered by Zou et al. (2007) who identified seven β -defensins in the three fish species zebrafish (*Danio rerio*), fugu (*Takifugu rubripes*) and tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*). Biological activity of fish β -defensins has been studied and demonstrated: antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, activity against fish-specific viruses, and chemotactic capacity (Zhao et al. 2009; Jin et al. 2010; Cuesta et al. 2011). β -defensin is expressed in various parts of the fish body, with the highest basal expression level in the skin, head kidney and spleen (Casadei et al. 2009b) and also in the eyes (Zhao et al. 2009). Most of the cysteine-rich peptides in fish display important sequence homologies, except cathelicidins which display sequence divergences. Cathelicidin precursors contain a signal peptide, then a conserved cathelin-like domain, and finally a variable C-terminal antimicrobial domain (Maier et al. 2008; Scocchi et al. 2009). Cathelicidins have been identified in several fish; the first peptides were identified in Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) (Uzzell et al. 2003), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Chang et al. 2005). Antimicrobial activity of fish cathelicidins is variable. For example codCATH, a cathelicidin from Atlantic cod (*Gadus morhua*), is highly active against Gram-negative bacteria and fungi but less active on Gram-positive bacteria (Broekman et al. 2011). Fish may have several cathelicidin genes that do not display the same expression profile regarding bacterial challenge. In

rainbow trout, the rtCATH_2 gene displays a high basal expression level whereas rtCATH_1 is induced upon bacterial challenge (Chang et al. 2006). In ayu (*Plecoglossus altivelis*), expression of the cathelicidin gene has been detected in numerous tissues including gill, liver, spleen and intestine, with a time-dependent induction after challenge (Lu et al. 2011). Antimicrobial activity has also been observed for NK lysines derived from fish (Hirono et al., 2007; Zhou et al., 2016). NK lysine was initially identified as an antimicrobial peptide from porcine natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes (Andersson et al. 1995b). In fish, several NK-lysins were identified with conserved saposin domain at the origin of antimicrobial activity (Cai et al. 2016). Other AMPs that do not contain any cysteine have been identified in fish as piscidins (Salger et al. 2016) and histone-derived peptides (Robinette et al. 1998). Histone-derived peptides are common to all vertebrates, whereas piscidins are specific to fish. Piscidins possess 18 to 46 amino acid residues; they are amphipathic α -helical peptides (Noga et al. 2009; Salger et al. 2011). The first piscidin to be identified was pleurocidin, a 25-residue peptide isolated and characterized from *Pleuronectes americanus* (Cole et al. 1997). Piscidins are present in a wide range of teleosts, particularly in the order Perciformes (Silphaduang et al. 2006). They are localized in gill, skin, intestine, head-kidney and spleen tissues. They are an important component of fish immune defense against pathogens (Silphaduang et al. 2006), and their antimicrobial activity is strong against a range of microorganisms and maintained in high salt concentrations (Lauth et al. 2002).

Antimicrobial peptides have been studied in many teleosts (Masso-Silva and Diamond 2014), but no study had yet been carried out in venomous fish. The lionfish *Pterois volitans* recently invaded the western North Atlantic region, and more particularly the Caribbean sea (Schofield 2009). The species is native from the Indo-Pacific Ocean. It was accidentally released from a public aquarium in Florida in 1992 and then colonized most of the coasts of the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. This predator represents a major threat for local biodiversity and for local coral reef ecology (Arias-González et al. 2011; Green et al. 2012). The success of its invasion is probably due to the lack of adapted predators, parasites, and microbial pathogens.

The present study focuses on the cysteine-rich antimicrobial peptides present in the venom apparatus of the lionfish *Pterois volitans*. We associated a transcriptomic approach and a peptidomic approach to identify antimicrobial peptides in this venomous fish.

2. Materials and methods

2.1. Animal collection

Fish sampling was conducted by spearfishing during the years 2015 and 2016. As *P. volitans* is an invasive species, the French government promotes any sampling able to contribute to its eradication. Dorsal spines, pelvic fins and skin were dissected from 20 lionfish and stored in RNA later solution (Thermo Fisher Scientific) or acetic acid 3%.

2.2. Illumina sequencing

Total RNA was extracted in TriReagent from the dorsal spines or pelvic fins from ten lionfish. The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher), and RNA quality was verified using a bioanalyzer (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared with an Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, Part# 15008136 Rev. A) as described in Cornet et al. (2014). The sequencing of 150 paired-end reads was performed on a Miseq (Illumina).

2.3. Bioinformatic analysis

The lionfish project includes two Illumina libraries from dorsal spines and pelvic fins for a total of 8,117,178 and 8,471,617 paired-end reads, respectively, with a maximal read length of 150 bp. Reads were deposited in SRA under the accession numbers SRR5141017 and SRR5141018.

Adapter removing and quality trimming from the raw reads were performed using Trimmomatic (Bolger et al. 2014). The transcriptome was assembled using the two libraries and the Trinity platform (version 2.0.6) for *de novo* assembly, a genome-independent transcriptome assembler, using the default parameter (Grabherr et al. 2011).

Peptide prediction was performed using Transdecoder (Haas et al. 2013). Similarity search (blastp of the Transdecoder predicted peptides) was performed against the

Uniprot-Swissprot database version 2015_06. Peptide signal prediction was performed using SignalP v4.1 (Petersen et al. 2011). Transmembrane peptide detection was performed using TMHMM v2.0c (Krogh et al. 2001). Protein domain search was performed using hmmscan from the hmmer v.3.1b1 suite against the Pfam-A database (Finn et al. 2014) (version 27.0). Finally transcriptome functional annotation was

performed using the Trinotate pipeline (<http://trinotate.github.io>) described in [Haas et al. \(2013\)](#).

Additionally, molecular weights (MW) and isoelectric points (pI) were calculated using ExPASy compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/), and multiple sequence alignment was performed using CLC Main Workbench6 (CLC BIO). Domain prediction was performed with SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

Cleaned reads were remapped for each library independently on the full transcriptome using Bowtie2 (version 2.2.6 – [Langmead and Salzberg, 2012](#)), and relative abundance values were estimated using RSEM (version 1.2.0 – [Li & Dewey, 2011](#)) to get FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) values.

2.4. Peptidomic analysis

Ten dorsal spines and pelvic fins were homogenized in acetic acid 3% at a 1:10 (w/v) ratio and centrifuged 20 min at 35,000xg at 4°C. The supernatants were concentrated on Sep-pak C18 cartridges (Waters) and dried in a speed-vacuum. Samples were reduced with 100 mM DTT and alkylated with 50 mM iodoacetamide and analyzed in NanoLC-MALDI-TOF/TOF and NanoLC-ESI-LTQ-Orbitrap as described in [Zatlyny-Gaudin et al. \(2016\)](#).

3. Results and discussion

The analysis of the transcriptome obtained from the venom apparatus of *Pterois volitans* yielded 76,327 unique transcript sequences. Annotation of protein sequences using the Uniprot_Swissprot and ncbi nr databases yielded transcripts encoding skin proteins, venom proteins like toxins and enzymes (data not shown), among others. Other transcripts corresponding to immune factors were also identified, especially 4 full-length transcripts encoding cysteine-rich antimicrobial peptides: 2 peptides related to liver-expressed antimicrobial peptides (hepcidin and LEAP-2), 1 β -defensin, and 1 NK-lysin. These cysteine-rich AMPs were expressed in pelvic fin and venomous spines, with the highest expression level for β -defensin in pelvic fin ([Figure 23](#)). We also unveiled AMP-related peptides. The first AMP was Pv-hepcidin. Alignment of the predicted amino acid

sequence of *Pv*-hepcidin with hepcidins from other fish is shown in [figure 24.A](#). Among the hepcidins aligned with *Pv*-hepcidin, the highest level of amino acid identity was observed with hepcidins from medaka (*Oryzias melastigma*) (78.99%) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (77.78%). The predicted prepropeptide of *Pv*-hepcidin contained a signal peptide of 24 amino acids, a prodomain of 40 amino acids, and a mature peptide of 26 amino acids. Sequence variability was mainly observed in the signal peptide and

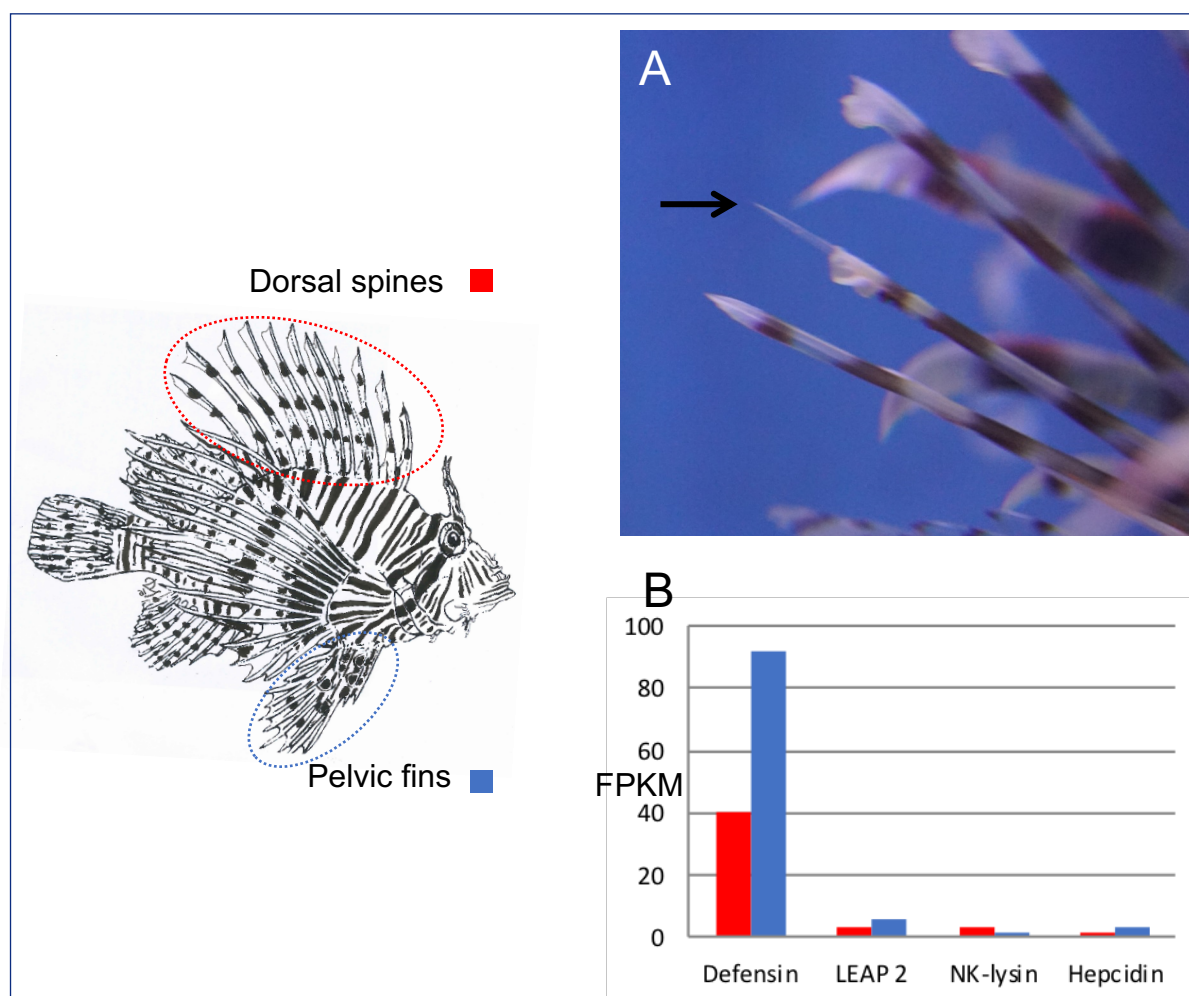


Figure 23 : Study of dorsal spine and pelvic fins of lionfish, *Pterois volitans*. (A) Photograph of dorsal spines: the arrow indicates a spine after envenomation, with retracted skin; (B) Expression of cysteine-rich antimicrobial peptides in dorsal spines (red) and pelvic fins (blue). (FPKM Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped).

prodomain regions. Between the prodomain region and hepcidin stands a conserved RX(K/R)R motif of propeptide convertase which releases the mature peptide ([Nakayama, 1997](#)). The predicted mature hepcidin of lionfish contained 8 cysteines with N- and C-terminal sequences conserved with other fish hepcidins. With a calculated molecular weight (MW) of 3,001.58 Da, a pI of 8.76, a hydrophobic ratio of 50% and a total net charge of 4, lionfish hepcidin exhibited antimicrobial characteristics. The arrangement of the 8

conserved cysteines in hepcidins confers them the tridimensional structure essential for antimicrobial activity, as described for zebrafish hepcidin (Lin et al. 2014). Lionfish hepcidin also possessed the N-terminal sequence QSHL that is essential for iron homeostasis and controls ferroportin internalization and degradation, as observed for zebrafish hepcidin (Nemeth et al. 2006). Lionfish hepcidin, like other vertebrate hepcidins, potentially has a dual function in iron regulation and host defense. We only found one transcript encoding hepcidin in lionfish, but there may be other genes expressed in liver or other tissues, similarly to several teleosts (Douglas et al., 2003; Robertson et al., 2009; Shike et al., 2004; Hirono et al., 2005).

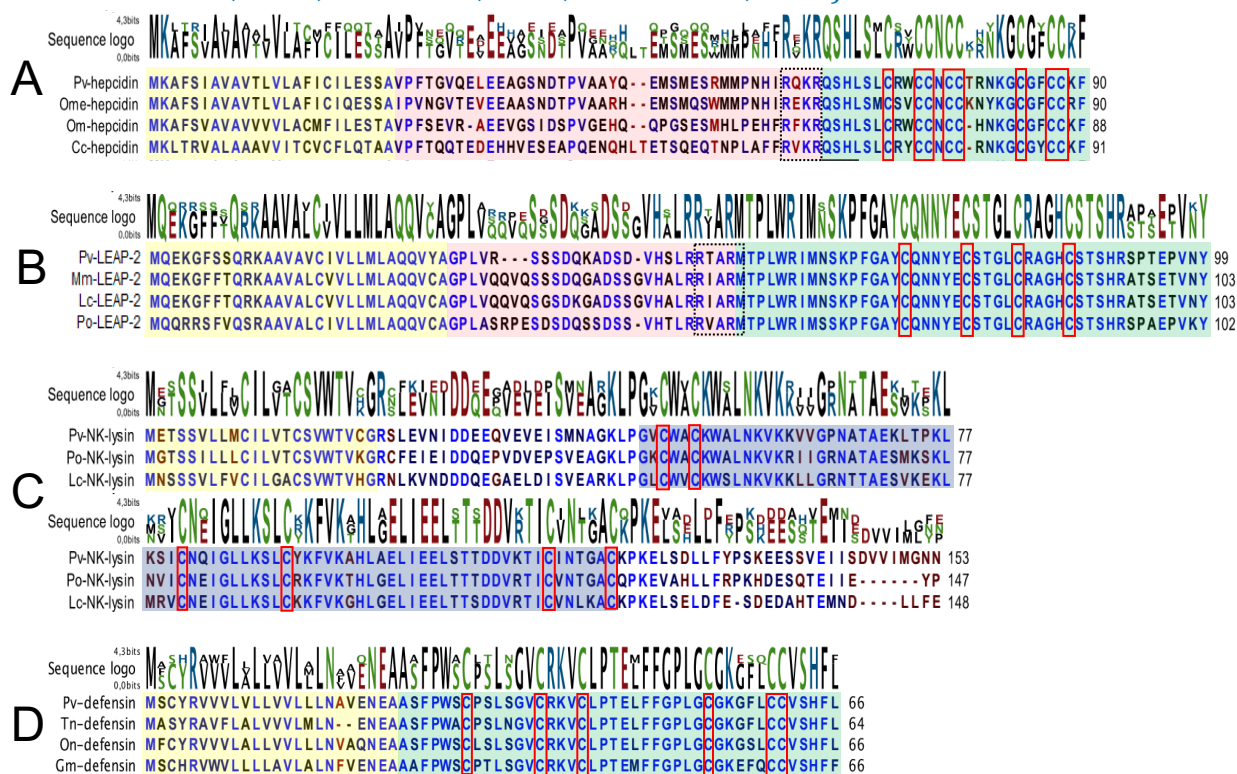


Figure 24: Sequence alignment of cysteine-rich antimicrobial peptides. **(A)** *Pterois volitans* Pv-hepcidin with *Oryzias melastigma* Ome-hepcidin (AEG78327.1), *Oncorhynchus mykiss* Om-hepcidin (ADU85830.1) and *Cyprinus carpio* Cc-hepcidin (AFY23859.1). The RX(K/R)R motif for cleavage of the mature hepcidin peptide is indicated in dotted black boxes, and the QSHL motif is underlined. **(B)** *Pterois volitans* Pv-LEAP-2 (liver-expressed antimicrobial peptide 2) with *Miichthys miiuy* Mm-LEAP-2 (AHN13905.1), *Larimichthys crocea* Lc-LEAP-2 (AFC90192.1), and *Paralichthys olivaceus* Po-LEAP-2 (ACB97648.1). The RXXR motif for the cleavage of the mature LEAP-2 peptide is indicated in dotted black boxes. **(C)** *Pterois volitans* Pv-NK-lysin with *Paralichthys olivaceus* Po-NK-lysin (AU260449.1) and *Larimichthys crocea* Lc-NK-lysin (AIL25791.1) **(D)**. *Pterois volitans* Pv-defensin with *Tetraodon nigroviridis* Tn-defensin (CAJ57644.1), *Oreochromis niloticus* On-defensin (AGW83444.1), *Gadus morhua* Gm-defensin (AEB69787.1). The sequence logo summarizes the consensus sequence and amino acid variations with fish sequences. Yellow, signal peptide; red, prodomain; green, mature peptide; blue, Saposin B domain. Cysteines are framed in red boxes.

We also identified another liver-expressed AMP in lionfish fins and venomous spines, namely a liver-expressed antimicrobial 2 related peptide, or Pv-LEAP-2-RP. Sequence alignment of Pv-LEAP-2-RP with other LEAP-2 precursors of teleosts

demonstrated the same conformation, with a signal peptide, a prodomain and a mature peptide (fig.24 B). The conserved RXXR motif for propeptide convertases was located before the cleavage site separating the prodomain from the mature peptide, as observed in other LEAP-2 transcripts (Liu et al. 2014). The variability of LEAP-2 sequences was mainly observed in the prodomain region, whereas the signal peptide sequence and the mature peptide sequence were well conserved. The mature peptide Pv-LEAP-2-RP shared high amino acid identity (>90%) with other fish LEAP-2-RP peptides.

Pv-LEAP-2-RP, like other selected fish LEAP-2s, is a 46-amino-acid peptide with four conserved cysteine residues, a net charge of 2, a hydrophobic ratio around 30%, and an isoelectric point close to 8.5. Contrary to hepcidins, disulfide bond formation does not seem necessary for antimicrobial activity as suggested for human LEAP-2 (Hocquellet et al., 2010), but in fish no data are available about the structure-bioactivity relationships. Few antimicrobial activities of fish LEAP-2 have been described. Lionfish LEAP-2-RP probably has the same activity as Mm-LEAP-2 which only differs by 4 amino acid residues in the C-terminal end (Liu et al. 2014).

The third cysteine-rich AMP we identified in lionfish was an NK-lysin-related-peptide. The Pv-NK-lysin-RP precursor consisted of 153 amino acid residues. *In silico* analysis showed that Pv-NK-lysin-RP contained a signal peptide sequence (residues 1–22) and a Saposin B domain (residues 48–122) well conserved between fish NK-lysins (Figure 24.C). Structure prediction of Pv-NK-lysin-RP (data not show) indicated five α -helices, spaced out by three loops in the protein molecule, as demonstrated for the structure of porcine NK-lysin and human granulysin, two members of the saposin-like protein family (SAPLIP) (Andersson et al. 1995a; Liepinsh et al. 1997; Anderson et al. 2003). NK lysins or peptides derived from NK lysin have been showed to display antimicrobial activity. Saposin B domains of three Channel catfish NK-lysins had an antimicrobial effect on *E. coli* and *S. aureus* (Cai et al. 2016). Moreover, antimicrobial activity was observed for sequences corresponding to the cationic core region of the NK lysin saposin domain of *Larimichthys crocea* and *Paralichthys olivaceus* (Hirono et al. 2007; Zhou et al. 2016). The saposin domain with its six cysteines is well conserved among NK-lysins of fish and lionfish (figure 24.C) and suggests a potential function in the immune response and probable antimicrobial activity.

The last cysteine-rich AMP we identified in lionfish was a β -defensin. Alignment of lionfish β -defensin with β -defensins from other fish is presented in figure 24.D. The

precursor of defensins is organized more simply than the precursors of other cysteine-rich peptides, with a signal peptide followed by 42-amino-acids beta-defensin. The sequence of β -defensin is well conserved among fish, with amino acid identity > 95% with β -defensins of puffer fish (*Tetraodon nigriviridis*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The position of the six cysteines is conserved; only two amino acid residues differ between the β -defensin sequences of *Pterois volitans*, *Tetraodon nigriviridis* and *Oreochromis niloticus*. Lionfish β -defensin possessed characteristic features of cationic peptides, with a net charge of 1,7, a molecular weight of 4,495.39 Da, and an isoelectric point of 8.35. The occurrence of β -defensin in lionfish was confirmed by mass spectrometry analysis. Out of the 4 AMPs we detected by transcriptomic approach, defensin was the only one identified in lionfish peptidic extracts. The skin is one of the tissues with the highest basal expression level for fish β -defensin (Zou et al. 2007b; Casadei et al. 2009a; Cuesta et al. 2011; van der Marel et al. 2012). Transcriptomic data showed high expression levels of Pv- β -defensin (Fig. 23.B). Besides, the absence of Pv-NK-lysin, Pv-hepcidin and Pv-LEAP-2 detection in the peptide extracts implied that they were either below the detection limit or not present in the samples, especially as RNA expression levels of these three AMPs were much lower than Pv- β -defensin (figure 23.B). Besides, cysteine-rich AMPs like LEAP-2, NK-lysin and hepcidin are usually overexpressed in response to infection and inflammation (Zhang et al. 2013; Liang et al. 2013; Yang et al. 2014b). We cannot exclude that these 3 AMPs are weakly constitutively expressed in lionfish and up-regulated by infection, as observed for bass hepcidin, for example (Shike et al. 2002). The skin makes up a great part of the venom apparatus in *Pterois volitans*. When lionfish defends itself against a predator, its skin and venom apparatus are damaged (Fig 23.A). Cysteine-rich AMPs could be overexpressed in lionfish venomous spines to avoid infection after envenomation. The occurrence of cysteine-rich AMPs has already been demonstrated in venom, e.g. in scorpion venom (Conde et al. 2000). We cannot rule out that lionfish cysteine-rich AMPs possess a dual role in the immune response and in envenomation to enhance the action of venom, with a cytolytic effect as described for hadrurin in scorpion venom (Torres-Larios et al. 2000) melittin in bee venom (Fennell et al. 1968) and crabrolin in hornet venom (Argiolas and Pisano 1984).

Conclusion

The present study reports for the first time the identification of four cysteine-rich antimicrobial peptides in the Scorpaenidae family: hepcidin, LEAP-2-RP, NK-lysin-RP, and β -defensin. No cathelicidin was identified. The presence of cysteine-rich AMPs in the lionfish venom apparatus suggests their involvement during or after envenomation to protect damaged skin.

Acknowledgments

Sequencing was performed by the SÉSAME platform (François Baclesse Center, Caen). We thank Dominique Vaur, Angelina Legros Antoine Rousselin and Nicolas Goardon for their hospitality and technical support. We thank Benoit Bernay (Platform Proteogen, Caen) and Alexandra Kraut (iRTSV-BGE, Grenoble) for Mass spectrometry analysis. We also thank Pierre-Yves Buys and Laurent Fouré (Cité de la mer, Cherbourg).

3. Conclusion: PAMs riches en cystéines

Les 4 peptides riches en cystéine relatifs à des PAMs de vertébrés identifiés dans cette étude chez *Pterois volitans*, sont les premières molécules de ce type décrites chez ce modèle. L'identification de ces effecteurs ouvre de nouvelles perspectives de recherche vis-à-vis de cette espèce invasive. Le suivi de l'expression des PAMs du poisson-lion lors de challenge pourrait apporter des éléments sur son système immunitaire. Par ailleurs, l'évaluation fonctionnelle comparée de ces PAMs avec leurs homologues respectifs permettrait de déterminer leur efficacité face à des pathogènes connus de téléostéens. Toutefois, bien que la conservation de ces PAMs au sein du règne animal présente un intérêt certain d'un point de vue évolutif, des éléments compromettent à ce jour leur potentiel dans le domaine de l'appliqué. Ces PAMs possèdent de nombreuses cystéines comme chez l'hepcidine qui en compte 8. Ces cystéines s'apparient pour former des ponts disulfures pour imposer une conformation spatiale qui détermine l'activité biologique du peptide. D'autre part il s'agit de PAMs relativement longs en termes de résidus et lorsque qu'on imagine une utilisation en routine le coût de production est un critère à prendre en compte. Bien qu'il existe des systèmes de production permettant de produire ces molécules en autonomie, cela demande en plus de moyens financiers, des infrastructures et un savoir-faire.

La stratégie établie pour répondre aux objectifs de cette thèse est de sélectionner des PAMs de petite taille qui n'ont pas de structure complexe. Pour ces raisons ces PAMs

n'ont pas fait l'objet d'une recherche plus approfondie, Nous nous sommes concentrés sur des peptides linéaires de petite taille tels que les piscidines.

C. Les PAMs spécifiques des poissons : Les piscidines

1. État de l'art

Les piscidines constituent une famille de peptides antimicrobiens spécifiques aux poissons. Les noms attribués aux peptides de cette famille sont divers et sont parfois en lien avec l'espèce d'origine (piscidines, moronecidines, dicentracines, gaduscines....). Parmi les piscidines, il y a les pleurocidines, identifiées pour la première fois chez le poisson plat, *Pleuronectes americanus* (Cole et al. 1997) à partir du mucus. Peu de temps après la piscidine-1 (également appelée moronecidine) ainsi que la piscidine-3 ont été caractérisées au niveau des mastocytes des branchies du bar hybride (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) (Silphaduang and Noga 2001). La moronecidine, peptide de 22 acides aminés a été identifiée au niveau de la peau par Lauth et collaborateurs (2002) sous deux isoformes présentant soit une lysine soit une arginine en position 18. Ces isoformes sont en fait issues de deux allèles différents apportées par chacun des deux parents du bar hybride. Avec les avancés en bioinformatiques de nouveaux gènes codant pour des pleurocidines ont été identifiés à partir de données génomiques d'espèces de poissons plats (Douglas et al. 2003c). Par la suite, le nombre de familles de téléostéens présentant ces peptides s'est largement agrandi. En effet, les approches par immunohistochimie menées par Silphaduang and collaborators (2006) montrent une large distribution des piscidines chez différentes familles de téléostéens tels que les Moronidae, les Serranidae, les Sciaenidae, les Siganidae et les Belontiidae. L'étude d'EST disponibles dans la base de données NCBI par Salger et collaborateurs (2016) suggèrent la présence de piscidines chez davantage de familles de poissons. L'identification de nouvelles piscidines à partir de bases de données transcriptomiques ou génomiques s'appuie essentiellement sur les fortes homologies de séquence au niveau du peptide signal associés au sein du précurseur des piscidines. L'alignement de plusieurs précurseurs de piscidines tend à le montrer **Figure 25**.

Si chez le bar européen *Dicentrarchus labrax* seul un précurseur codant pour la dicentracine a été identifié à ce jour (Salerno et al. 2007), chez certaines espèces, il peut y avoir plusieurs précurseurs. Chez le tilapia, *Oerochromis niloticus*, 5 transcrits codant pour 5 « piscidin-like » ont été identifiés (peng, 2012) **Tableau 7**. Chez le bar hybride rayé, 9 précurseurs de piscidines différents ont été identifiés (Salger et al 2016). La caractérisations des piscidines du bar hybride (Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002; Silphaduang et al. 2006; Corrales et al. 2009; Salger et al. 2011, 2016; Park et al.

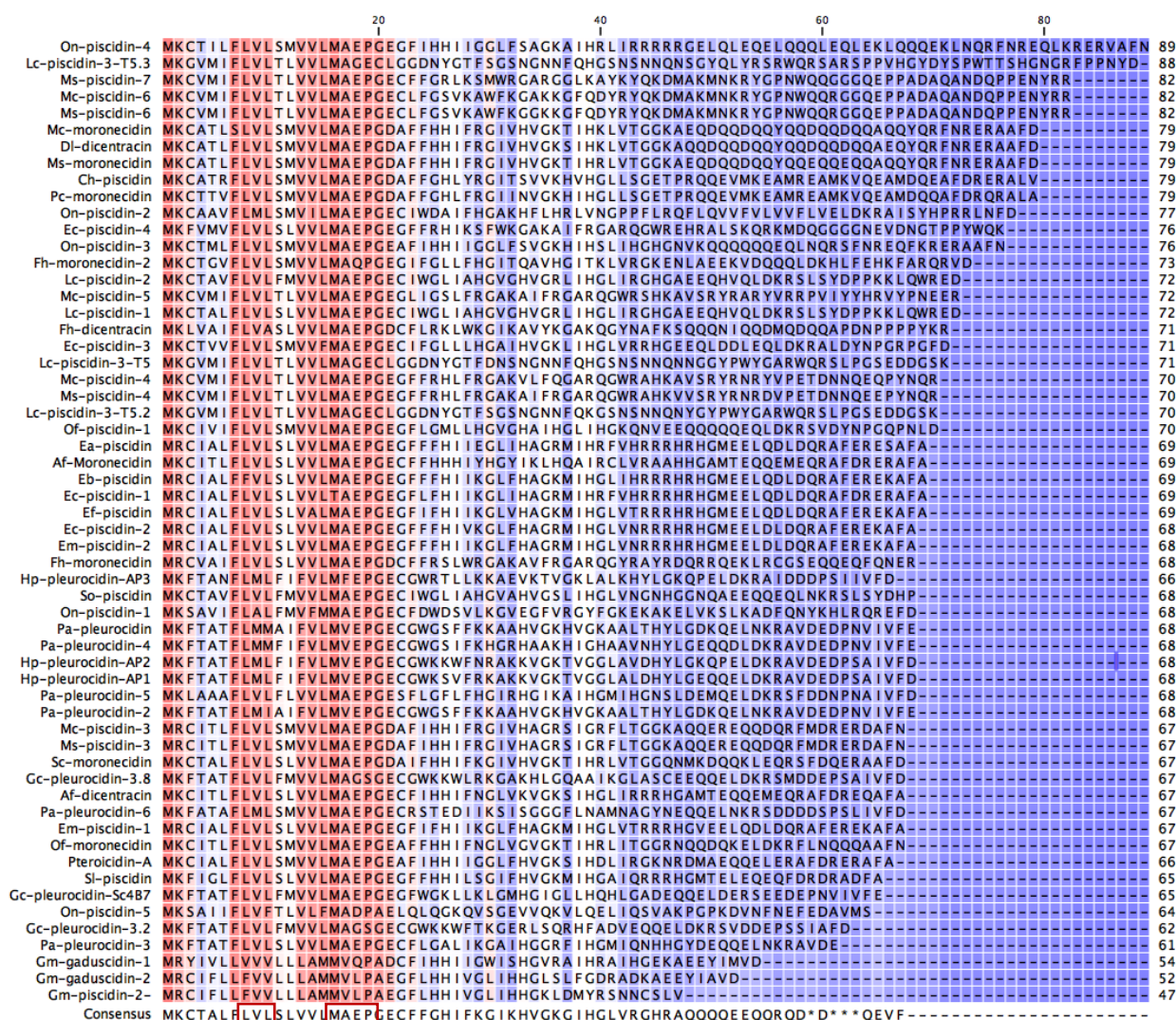


Figure 25 : Alignement des précurseurs de piscidines connus chez les Téléostéens disponibles dans la base de données NCBI. Les numéros d'accèsions de chacun des précurseurs est disponible dans le **tableau 1** en annexe. le cadre rouge représentent les motifs conservés utilisés pour la recherche de piscidines chez *Pterois volitans*.

2011a) leur confère un statut de référence. Salger et collaborateurs (2016) ont récemment proposé de classer les différentes piscidines chez les différentes espèces parentes du bar hybride en 3 classes définies selon la longueur les fonctions et l'analyse phylogénétique. Ainsi, la classe I regroupe les deux isoformes de la piscidine-1 et de la piscidine-3 d'une longueur de 22 acides aminés. La classe II regroupe les piscidines 4 et 5, longues de 44 et 46 acides aminés et enfin la classe III compte les piscidines 6 et 7, chacune d'elles longue de 55 acides aminés. Chez ce modèle cette proposition de classification est possible par la complémentarité des différentes approches menées. En effet, La caractérisation du peptide mature à travers une approche peptidique classique apparait comme cruciale et permet de le positionner au sein de son précurseur. C'est notamment le cas pour chacune des piscidines des classes I et II identifiées chez le bar hybride dont les formes natives ont été

caractérisées par le biais d'analyses en spectrométrie de masse et/ou de séquençage par dégradation d'Edman (Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002; Noga et al. 2009; Salger et al. 2011, 2016). Lorsque l'on s'intéresse aux autres piscidines cela peut paraître moins clair. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'activité *in vitro* de piscidines issues de transcrits, sans avoir caractérisé les formes natives. Leur longueur a été fixée de manière subjective, par homologie de séquence ou par l'outil SMART disponible en ligne (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) qui permet de prédire les différents domaines d'une protéine. C'est le cas par exemple des peptides synthétiques TP1, TP2, TP3, TP4 et TP5 issus des piscidines du tilapia (Peng et al. 2012) ou encore plus récemment de la Rbpisc issue de *Oplegnathus fasciatus* (Bae et al. 2016). D'une part, les données concernant la longueur des peptides matures étant absentes pour bon nombre des piscidines décrites, leur classification paraît plus délicate. D'autre part, les piscidines ont longtemps été décrites comme des PAMs de petite taille dont la longueur en acides aminés était comprise entre 18 et 26 acides aminés, ce que remet en cause la caractérisation de la piscidine 4 (Noga et al. 2009) ainsi que celle de ses isoformes (Salger et al. 2011) supérieures à 44 acides aminés. Une des particularités de certaines piscidines réside dans la présence d'une amidation comme cela a été observé pour la moronecidine chez le bar hybride (Lauth et al. 2002) et les chrysophsines caractérisées chez la dorade *Chrysophrys (Pagrus) major* (Iijima et al. 2003). Ces observations ont conduit à amider lors de leur synthèse d'autres piscidines sans que leur amidation endogène soit établie (Yin et al. 2006) (Patrzykat et al. 2003) **Tableau 7**. L'amidation du peptide pouvant notamment impacter sa structure (Mura et al. 2016) et/ou ses activités biologiques (Cuttitta 1993; Dennison and Phoenix 2011). Toutes les piscidines ne sont pas amidées, c'est le cas de la piscidine 4 et de la pleurocidine (Cole et al. 1997; Noga et al. 2009) **Tableau 7**. Par ailleurs, les piscidines adoptent généralement une structure en hélice α . Cette configuration pouvant être plus ou moins importante comme le montre Parks et collaborateurs (2011). Le contenu en hélice de la piscidine 4 est de 17% et 23% en présence de 50% et 100% de TFE contre 40% pour la piscidine-1 dans 75% de TFE (Park et al. 2011a). Les différences de structure chez les piscidines du bar hybride se traduisent selon les observations de Salger et collaborateurs (2016) par des activités biologiques différentes mais complémentaires permettant ainsi d'optimiser la protection de l'hôte face aux microorganismes. Ainsi, les peptides de petite taille de la

classe I sont très actifs sur les bactéries gram-positives et négatives mais moins actifs

Tableau 7. Répertoire de différentes piscidines étudiées en fonction de la méthode de détection.

Famille	Origine	Nom	Im	G	E	Détection			Numéro d'accesion		
						P	-NH2 vérifiée	amidé			
Channichthyidae	<i>Chionodraco hamatus</i>	chionodracine	X	PCR	X	ND	non	non	CBX55949.1		
moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i> (bar commun)	Dicentracin	X	PCR	ND	ND	non	non	P59906.1		
		Gm-gaduscidine-1	ND	EST	X	ND	non	non	ACS91329.1		
Gadidae	<i>Gadus morhua</i> (morue d'Atlantique)	Gm-gaduscidine-2	ND	EST	X	ND	non	non	ADK63424.1		
		Gm-piscidine-2-β	ND	ND	ND	ND	non	non	ADU34223.1		
Sciaenidae	<i>Larimichthys crocea</i> (tambour à gros yeux)	Piscidin-5-like protein	ND	PCR	ND	ND	non	non	AIL82389.1		
		Pis5lt2	ND	PCR	X	ND	non	non	AQS27931.1		
		Pis5lt3	ND	PCR	X	ND	non	non	AIL82388.1		
		Pc-pis	ND	PCR	X	ND	non	non	ACE78289.1		
Syngnathidae	<i>Hippocampus kuda</i> (hippocampe doré)	HKPLP	ND	EST	ND	ND	non	oui	AAX58115.1		
Moronidae	<i>Morone chrysops</i> (bar blanc)	Moronecinid (Piscidin-1)	X	GQ	X	MS/Edm	oui	oui	Q8UUG2.1		
	<i>Morone saxatilis</i> (bar rayé)	Moronecinid (Piscidin-1)	X	GQ	X	MS/Edm	oui	oui	Q8UUG0.1		
	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i> (White bass x Striped bass)	Piscidin-3	X	GQ	X	MS/Edm	oui	oui	APQ32046.1		
	<i>Morone saxatilis</i> (bar rayé)	Piscidin-4	X	GQ	X	ESI-MS/Edm	oui	oui	ADP37959.1		
	<i>Morone chrysops</i> (bar blanc)	Piscidin-4	X	GQ	X	ND	non	non	APQ32050.1		
	<i>Morone chrysops</i> (bar blanc)	Piscidin-5	ND	GQ	X	ND	non	non	ADP37960.1		
	<i>Morone saxatilis</i> (bar rayé)	Piscidin-6	ND	GQ	X	ND	non	non	APQ32044.1		
	<i>Morone chrysops</i> (bar blanc)	Piscidin-6	ND	GQ	X	ND	non	non	APQ32043.1		
	<i>Morone saxatilis</i> (bar rayé)	Piscidin-7	ND	GQ	X	ND	non	non	APQ32054.1		
		TP4	ND	EST	X	ND	non	oui	AGA16547.1		
Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i> (tilapia)	TP3	ND	EST	X	ND	non	oui	AGA16546.1		
		TP5	ND	EST	ND	ND	non	oui	AGA16548.1		
		TP2	ND	EST	X	ND	non	oui	AGA16545.1		
		TP1	ND	EST	ND	ND	non	oui	AGA16544.1		
Sparidae	<i>Pagrus major</i> (dorade japonaise)	Chrysopsin-2	X	ND	ND	ESI	oui	oui	P83546.1		
		Chrysopsin-1	X	ND	ND	ESI	oui	oui	P83545.1		
		Chrysopsin-3	X	ND	ND	ESI	oui	oui	P83547.1		
Percichthyidae	<i>Seriola lalandi</i>	Piscidin	ND	TQ	X	ND	non	ND	ARK85994.1		
Carangidés	<i>Siniperca chuatsi</i> (perche chinoise, mandarin)	Piscidin	ND	PCR	X	ND	non	oui	AAV65044.1		
Oplegnathidae	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rbpisc	ND	EST	X	ND	non	non	BAM99884.1		
		pOf-Pis1	ND	GQ	X	ND	non	non	KT354978		
Serranidae	<i>Epinephelus coioides</i> (mérrou à taches oranges)	Epinecidin-1	ND	EST	X	ND	non	oui			
		Epinecidin-1 peptide 1	X	EST	X	ND	non	oui	AY705494		
		Epinecidin-1 peptide 2	X	EST	X	ND	non	oui			
		ecPis-3	ND	TQ	X	-	ND	non	KP715614.3		
		ecPis-4	ND	TQ	X	-	ND	non	KP715615.3		
		ecPis-2 s	ND	TQ	X	nano ESI/LC-MS	oui	non	HQ437913.3		
		Pleuronectidae	<i>Limanda ferruginea</i> (limande jaune)	ple YT2 (Fragment)	ND	X	X	ND	non	oui	AY273175
				Pleurocidin	ND	PCR	X	ND	non	ND	DQ248966
		Pleuronectidae	<i>Limanda limanda</i> (limande commune)	prepropolypeptide (Fragment)	ND	PCR	X	ND	non	ND	
				ple GcSc4B7	ND	PCR	X	ND	non	oui	AAP55798.1
Pleuronectidae	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i> (fausse limande)	ple GC3.2	ND	PCR	X	ND	non	oui	AAP55800.1		
		ple GC3.8	ND	PCR	X	ND	non	non	AAP55799.1		
Pleuronectidae	<i>Pseudopleuronectes americanus</i> (plie rouge)	ple GcSc4C5 (Fragment)	ND	PCR	X	ND	non	non	AAP55798.1		
		ple1	X	PCR	X	MS/Edm	oui	non	P81941.2		
		ple2	ND	PCR	X	ND	non	oui	Q90ZY0.1		
		ple4	ND	PCR	X	ND	non	oui	Q90ZX8.1		
		ple3	ND	PCR	X	ND	non	oui	Q90VW7.1		
		ple5	ND	GQ	X	ND	ND	ND	AY282498		
		ple6	ND	GQ	X	ND	non	oui	AY282498		
		ple AP1	ND	PCR	X	ND	non	oui	AAP55793.1		
		ple AP2	ND	PCR	X	ND	non	oui	AAP55794.1		
		ple AP3	ND	PCR	X	ND	non	oui	ABB70232.1		
Pleuronectidae	<i>Hippoglossoides platessoides</i> (flétan nain)	ple Hb26 (Fragment)	ND	PCR	X	ND	non	oui	AY273180		
		ple Hb18 (Fragment)	ND	PCR	X	ND	non	oui	AY273181		
Nototheniidae	<i>Notothenia coriiceps</i>	moroNC-NH2	ND	TQ	ND	ND	non	oui	AAX58115.1		
Bathydraconidae	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	moroPC-NH2	ND	GQ	ND	ND	non	oui	AOW44479.1		

Im : immunohistochimie ; G : gene ; E : Etude de l'expression ; P : Peptidomique ; PCR : approche ciblée ; EST : Expressed Sequences Tag ; GQ : Approche Génomique ; TQ : Approche Transcriptomique ; ND : Non Déterminé ; X : approche réalisée ; - : réalisé mais pas de résultats ; MS : Spectrométrie Masse (MALDI-TOF) ; Edm : séquençage par dégradation d'Edman ; ESI-MS : Spectrométrie de Masse (Electrospray).

contre les protozoaires par rapport aux piscidines de la classe III de plus grande taille à faible activité antibactérienne. Les piscidines de classe II, de taille intermédiaire, ont un spectre d'activité plus large, mais moins efficace ([Silphaduang and Noga 2001](#); [Noga et al. 2009](#); [Salger et al. 2011, 2016](#)).

Les piscidines sont principalement localisées au niveau de la peau, des branchies, des intestins, du rein et de la rate ([Masso-Silva and Diamond 2014](#); [Katzenback 2015](#)), certaines pouvant être détectées dans le foie, l'estomac, les muscles, le cœur ou le cerveau ([Katzenback 2015](#)). Les piscidines sont surtout connues pour être exprimées par les mastocytes présents au niveau des branchies et de la peau, dans les granulocytes éosinophiles et dans les cellules à mucus présentes au niveau de la peau ([Cole et al. 1997](#); [Silphaduang and Noga 2001](#); [Silphaduang et al. 2006](#); [Katzenback 2015](#)). Le niveau d'expression des piscidines est variable en fonction des espèces étudiées mais aussi en fonction des isoformes. Par exemple chez le tilapia, les piscidines TP2, 3 sont fortement exprimées au niveau de la peau et des branchies, un peu moins au niveau du rein mais pas du tout au niveau des intestins, en revanche la TP4 est plus exprimée seulement au niveau des intestins ([Peng et al. 2012](#)). L'Of-Pis1, la piscidine étudiée chez *Oplegnathus fasciatus* est quant à elle très majoritairement exprimée dans les branchies et également au niveau de la rate, des intestins et de la peau ([Umasuthan et al. 2016](#)). Enfin, chez la morue, la *pis2* est exprimée au niveau des 16 tissus étudiés, la *pis1* dans 11 et la *pis2-β* dans seulement 3 d'entre eux ([Ruangsri et al. 2012](#)).

Par ailleurs d'autres études montrent également que l'expression des piscidines peut-être induite par de nombreux PAMPs qui incluent les LPS, les bactéries gram-positives et négatives, par les parasites et les virus pour revue ([Masso-Silva and Diamond 2014](#)). l'expression peut varier en fonction des espèces, par exemple chez le tilapia il n'y a pas de surexpression en fonction des différentes stimulations, en revanche chez *Oplegnathus fasciatus*, l'Of-Pis1 est 10 fois plus exprimée après stimulation ([Peng et al. 2012](#); [Umasuthan et al. 2016](#)). Prises ensemble ces données montrent la complexité et la variabilité à caractériser ces piscidines, cependant elles montrent que les piscidines jouent un rôle important dans la défense immunitaire innée notamment au niveau du mucus au vu de leur expression mais aussi par rapport aux différentes activités *in vitro* qui leur sont décrites, notamment sur les bactéries gram-positives et négatives sur des parasites et sur des virus, pour revue ([Masso-Silva and Diamond 2014](#)).

Parallèlement, quelques études montrent que certaines piscidines pourraient jouer

un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en régulant le niveau d'expression de certains transcrits. C'est le cas de l'interleukin-1 β ou la cyclo-oxygénase-2 en présence de la pleurocidine ([Peter Chiou et al., 2006](#)) ou de Mx2 et Mx3 en présence de l'epinicine-1 ([Wang et al., 2010](#)).

2. Identification d'un peptide antimicrobien, une « moronecidine-like » chez le poisson venimeux *Pterois volitans* : étude fonctionnelle et structurale de la pterocidine- α .

Lors de cette étude, une analyse peptidomique de la peau du poisson-lion a permis de caractériser la forme native de la pterocidine A, un peptide très proche de la moronecidine.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale " Fish and Shellfish Immunology ". Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

Originaire de l'indopacifique, le poisson-lion *Pterois volitans* est désormais une espèce invasive des caraïbes et représente une menace majeure pour la faune et la flore endémique ainsi que leur écosystème associé. Aucune donnée n'a été récoltée au sujet du système immunitaire de ce poisson qui semble être épargné de toutes agressions extérieures. L'approche peptidomique menée dans cette étude a permis d'identifier pour la première fois chez ce poisson venimeux la forme native d'une piscidine, appelée pterocidine- α . Cette piscidine a été détectée sous les deux formes amidée (pterocidine- α -CONH₂) et non amidée (pterocidine- α -COOH) qui ont été toutes deux synthétisées et étudiées par des approches structurale et fonctionnelle. Les deux peptides ont montré des activités *in vitro* différentes. La pterocidine- α -CONH₂ est bactéricide sur des pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*) tandis que la pterocidine- α -COOH révèle uniquement quelques activités bacteriostatiques. Par ailleurs, les deux peptides sont capables d'induire l'hémolyse d'érythrocytes de différents vertébrés comme ceux de l'homme, du bar ou de la petite roussette. La pterocidine- α -CONH₂ se révèle toutefois plus toxique en induisant l'hémolyse à de plus faibles concentrations (40% d'hémolyse à 5 μ M pour la pterocidine- α -CONH₂ et moins de 10% à 5 μ M pour la pterocidine- α -COOH sur les érythrocytes de bar). Enfin, l'analyse par dichroïsme circulaire montre que les deux peptides adoptent une structure en hélice α , avec un contenu en hélice α plus important pour la pterocidine- α -CONH₂. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'amidation impacte fortement la structure et l'activité de la pterocidine- α .



Full length article

Identification of a moronecidin-like antimicrobial peptide in the venomous fish *Pterois volitans*: Functional and structural study of pteroidicin- α Baptiste Houyvet^{a,f}, Yolande Bouchon-Navaro^b, Claude Bouchon^b, Didier Goux^c, Benoît Bernay^d, Erwan Corre^e, Céline Zatylny-Gaudin^{a,*}^a Normandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France^b Université des Antilles, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UNICAEN, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Labex Corail, Campus de Fouillol, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe^c CMABio³ FF 4206 ICORE, Normandie Université, UNICAEN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France^d Plateforme Proteogen, FF 4206 ICORE, Normandie Université, UNICAEN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France^e Plateforme ABiMS, Station biologique de Roscoff (UPMC-CNRS), F-29688 Roscoff, France^f SATMAR, Société ATLantique de MARiculture, 50760 Gatteville-Phare, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pterois volitans
Antimicrobial peptides
Amidation
Piscidin
Pteroidicin A
Pteroidicin α

ABSTRACT

The present study characterizes for the first time an antimicrobial peptide in lionfish (*Pterois volitans*), a venomous fish. Using a peptidomic approach, we identified a mature piscidin in lionfish and called it pteroidicin- α . We detected an amidated form (pteroidicin- α -CONH₂) and a non-amidated form (pteroidicin- α -COOH), and then performed their functional and structural study. Interestingly, the two peptides displayed different antibacterial and hemolytic activity levels. Pteroidicin- α -CONH₂ was bactericidal on human pathogens like *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*, as well as on the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, while pteroidicin- α -COOH only inhibited their growth. Furthermore, the two peptides induced hemolysis of red blood cells from different vertebrates, namely humans, sea bass and lesser-spotted dogfish. Hemolysis occurred with low concentrations of pteroidicin- α -CONH₂, indicating greater toxicity of the amidated form. Circular dichroism analysis showed that both peptides adopted a helical conformation, yet with a greater α -helix content in pteroidicin- α -CONH₂. Overall, these results suggest that amidation strongly influences pteroidicin- α by modifying its structure and its physico-chemical characteristics and by increasing its hemolytic activity.

1. Introduction

Piscidins are fish-specific antimicrobial peptides (AMPs) that participate to host defense in aquatic environments rich in microorganisms and potential pathogens. The first member ever identified in this family was pleurocidin, a 25-residue peptide with an α -helical structure characterized from winter flounder (*Pleuronectes americanus*) skin [1,2]. Shortly afterwards, piscidin-1, otherwise called moronecidin, was identified from mast cells [3], gills and skin [4] of the hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). Moronecidin is a 22-amino-acid peptide with C-terminal amidation and an α -helix conformation [4]. Among piscidin-like peptides, few of them have been characterized by combining HPLC, MS analysis and Edman degradation. In addition to moronecidin and pleurocidin, only four piscidins have been characterized biochemically: three carboxyamidated chrysopsins in the red sea bream (*Chrysophrys major*) [5] and ecPis2s in the orange-spotted

grouper (*Epinephelus coioides*) [6]. Besides, other approaches like immunohistochemistry or sequencing of cDNA revealed the occurrence of a multitude of piscidins largely distributed among fish families [7,8]. Moreover, in addition to the short piscidins made of around twenty amino acid residues, sequences may be longer, e.g. in piscidin-4, a 44-amino-acid peptide characterized from hybrid striped bass mast cells [9]. Immunological approaches unveiled peptides related to piscidin-4 in other species [10]. Faced with the diversity of primary structures in piscidins from a same species, Salger and collaborators [11] proposed a classification for hybrid striped bass piscidins, with three classes based on peptide length, phylogenetic analysis, and functionality. This classification could be used for other species insofar as the mature forms of piscidins are characterized. Many studies on piscidins were carried out on short synthetic peptides, based on amino acid sequence alignment or prediction using tools like SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [12,13], e.g. for RbPisc from *Oplegnathus fasciatus* [14] or more recently

* Corresponding author. BOREA University of Caen, Esplanade de la paix, 14032 Caen, France.

E-mail address: celine.gaudin@unicaen.fr (C. Zatylny-Gaudin).

moroNC-CONH₂ and moroPC-CONH₂ from *Notothenia coriiceps* and *Parachaenichthys charcoti*, respectively [15]. Amidation has been observed for some endogenous piscidins like piscidin-1 and piscidin-3 from hybrid striped bass and three chrysopsins from red sea bream [3–5]. Some piscidins are not amidated, like piscidin-4, pleurocidin or ecPis2s [1,6,9]. In most studies on piscidins conducted from ESTs or genes, all synthesized piscidin-related peptides were amidated. However, the occurrence of amidated peptides has never been confirmed and is even questioned in certain species like *Oreochromis niloticus* or *Siniperca chuatsi* [16,17]. Although amidation seems to play an important role in the structure-function relationships of AMPs [18–21], this does not seem to be the case for piscidins, as suggested by Chekmenov and collaborators [22] for piscidin-1 and piscidin-3 from hybrid striped bass. Consequently, the role of amidation in piscidins still remains unclear.

Lionfish is a venomous fish belonging to the Scorpaenidae family. No study has yet been published on its immune system components, e.g. antimicrobial peptides. The present study focuses on lionfish (*Pterois volitans*) peptides related to moronecidin or piscidin-1. This article reports the functional and structural study of two amidated and non-amidated forms of the mature peptide identified from lionfish skin.

2. Materials and methods

2.1. Animal collection

Fish sampling was conducted by spearfishing during the years 2015 and 2016. As *P. volitans* is an invasive species, the French government promotes any sampling able to contribute to its eradication. Dorsal spines, pelvic fins and skin were dissected from 20 lionfish and stored in RNA later solution (Thermo Scientific, Waltham, WA, USA) or acetic acid 3%.

2.2. Transcriptomic approach

Total RNA was extracted in TriReagent (Sigma, St Louis, MO, USA) from dorsal spines or pelvic fins from ten lionfish. The total RNA concentration of each sample was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific), and RNA quality was verified using a bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). cDNA libraries were prepared with an Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, Part# 15008136 Rev. A), as described in Cornet and collaborators [23]. The sequencing of 150 paired-end reads was performed on a Miseq (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

2.3. Bioinformatic analysis

The lionfish project included two Illumina libraries from dorsal spines and pelvic fins, for totals of 8,117,178 and 8,471,617 paired-end reads, respectively, with a maximum read length of 150 bp. Reads were deposited in SRA under the SRR5141017 and SRR5141018 (Bioproject PRJNA360033).

Adapter removal and quality trimming from the raw reads were performed using Trimmomatic [24]. The transcriptome was assembled using the two libraries with the *de novo* assembler Trinity (version 2.0.6), a genome-independent transcriptome assembler, using the default parameter [25].

Peptide prediction was performed using Transdecoder [26]. Similarity search (blastp of the Transdecoder-predicted peptides and blastx of the assembled transcripts) was performed against the Uniprot-Swissprot database (version 2015_06). Protein domain search was performed using hmmscan from the hmmer v.3.1b1 suite against the Pfam-A database [27] (version 29.0). Peptide signal prediction was performed using signalP v4.1 [28]. Finally transcriptome functional annotation was performed using the Trinotate pipeline (<http://trinotate.github.io>) described in Haas and collaborators [26]. Additionally,

molecular weights and MS products (Mw) were calculated or predicted using ProteinProspector tools (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) and multiple sequence alignment was performed using CLC Main Workbench6 (CLC BIO).

2.4. Peptidomic analysis

The skin from five lionfish was homogenized in acetic acid (Sigma) 3% at a 1:10 (w/v) ratio and centrifuged 20 min at 35,000 g at 4 °C. The supernatants were concentrated on Sep-pak C18 cartridges (Waters, Milford, MA, USA) and dried in a speed-vacuum. Samples were reduced with 100 mM DTT (sigma) and alkylated with 50 mM iodoacetamide (Sigma), and analyzed by Nano-LC-MALDI-TOF/TOF. For nano-LC fragmentation, peptide samples were first desalted and concentrated onto a C18 Omix tip (Agilent Technologies) before analysis. The chromatography step was performed on a nano-LC system (Prominence) (Shimadzu, Kyoto, Japan). Peptides were concentrated on a Zorbax 5 × 0.3-mm C18 precolumn and separated on a Zorbax 150 × 75-μm C18 column (Agilent Technologies). Mobile phases consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma), 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% trifluoroacetic acid in 99.9% ACN (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France) (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nL.min⁻¹, and the gradient profile was as follows: constant 2% B for 5 min, from 2 to 5% B in 1 min, from 5 to 32% B in 144 min, from 32 to 70% B in 10 min, from 70 to 90% B in 5 min, and back to 2% B in 10 min. The 300 nL.min⁻¹ volume of the peptide solution was mixed with 1.2 μL.min⁻¹ volumes of a solution of a 5 mg/mL CHCA matrix (LaserBio Labs, Université Nice-Sophia-Antipolis, France) prepared in a diluent solution of 50% ACN with 0.1% TFA. Twenty-second fractions were spotted by an AccuSpot spotter (Shimadzu) on a stainless steel Opti-TOF™ 384 target. MS experiments were carried out on an 5800 proteomics analyser (AB Sciex, Vaughan, Canada) equipped with TOF-TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18–39), ACTH (7–38) (LaserBio Labs) and mass precision was better than 50 ppm in reflectron mode. A laser intensity of 3400 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1000 single spectra (5 × 200) in the 700–4,000Da mass range. MS/MS spectra from the twenty most intense ions were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 4300. For tandem MS experiments, the acceleration voltage was 1 kV, and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings.

The fragmentation pattern was used to determine peptide sequences. Database searching was performed using the Mascot 2.5.1 program (Matrix Science, England). A database corresponding to a homemade *Pterois volitans* EST database (including 76,327 entries) was used. The variable modifications allowed were as follows: methionine oxidation and dioxidation, C-terminal amidation, and N-terminal pyroglutamate. “No enzyme” was selected. Mass accuracy was set to 200 ppm and 0.6 Da for the MS and MS/MS modes, respectively.

2.5. Synthesis of pterocidin-α

Both forms of the mature peptide pterocidin-α-COOH or α-Pte (FIHHIIGGLFHVGVKSIHDLIR) and pterocidin-α-CONH₂ or α-Pte-CONH₂ (FIHHIIGGLFHVGVKSIHDLIR-CONH₂) identified in lionfish skin extracts were synthesized by Proteogenix (France) with a purity percentage > 95%.

2.6. Antibacterial assay

Antimicrobial activity of α-Pte, α-Pte-CONH₂ and a 1:1 mix of the two peptides was assayed against several bacteria summarized in Table 1. The minimal growth inhibition concentration (MIC) was

Table 1
Bacterial strains and media used to determine MICs and MBCs.

	Bacteria	Origin	Culture medium	Test medium
Gram-positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 110871	BHI	PBHI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 76.117	TSB	PTSB
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53.1 56	Col	Col
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	CIP 54 .8T	LB	PB
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 103446	TSB	PTSB
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CIP 103209T	TSB	PTSB
	<i>Vibrio vulnificus</i>	CIP 109783	MB	SPB

CIP: Collection from the "Institut Pasteur"; MB: Marine Broth (Conda): 40.20 g/L, pH 7.6; SPB (Saline Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 15 g/L, pH 7.2; LB: (Luria-Bertani): peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5; PB (Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.4; BHI: Brain Heart Infusion (BD): 37 g/L, pH 7.4; PBHI Poor Brain Heart Infusion (BD): 18.5 g/L, peptone 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, pH 7.4; TSB: Trypticasein Soy Broth (Conda): 40 g/L, pH 7.3; PTSB: 20% TSB medium (Conda), 2.5% NaCl, w/v, pH 7.3; Col: Columbia broth (Conda) 35 g/L, pH 7.4.

determined in triplicate by liquid growth inhibition assays [29]. Briefly, 10 μ L of peptide solution were incubated in microtiter plates with 100 μ L of a bacterial suspension at a starting optical density (D_{600}) of 0.001 in poor-broth nutrient medium (PB: 1% peptone, 0.5% NaCl, w/v, pH 7.5). Non-marine bacteria were grown in PB, except *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Aeromonas salmonicida* that were grown in poor trypticasein soy broth (PTSB: 20% TSB medium (Conda), 2.5% NaCl, w/v, pH 7.3) and *Listeria monocytogenes* grown in poor brain heart infusion (PBHI: BHI (BD) 18.5%, peptone 5%, NaCl 2.5%, pH 7.4), and marine bacteria grown in saline PB (SPB: 1% peptone, 1.5% NaCl, w/v, pH 7.2). Bacterial growth was evaluated by measuring optical density at 595 nm after 16-h incubation at 30 °C (20 °C for marine bacteria). MICs were expressed in μ M as an [a] - [b] concentration interval, where [a] was the last concentration with microbial growth and [b] was the first concentration with 100% growth inhibition. MBCs (minimal bactericidal concentrations) were expressed in μ M as an [a] - [b] concentration interval, where [a] was the last concentration with microbial growth and [b] was the first concentration that killed 100% of the bacteria.

2.7. Bactericidal time course of pterocidin- α -CONH₂

Vibrio vulnificus and *Staphylococcus aureus* were grown overnight in marine broth or in Columbia broth. Bacteria diluted in fresh culture medium were incubated until the logarithmic growth phase ($DO_{600nm} = 0.2$). Assays were performed in 96-well microplates. α -Pte-CONH₂ at 5 μ M for *S. aureus* or 50 μ M for *V. vulnificus* was added in triplicate to bacterial suspensions corresponding to a starting optical density (D_{600}) of 0.001. Ten microliters were taken after different incubation times at 30 °C (0, 15, 30, 60 and 120 min), diluted in sterile sea water, and finally plated on marine broth or Columbia agar. Bacterial growth was observed after 24 h of incubation at 30 °C to determine the time lapse required for α -Pte-CONH₂ to kill all bacteria.

2.8. Scanning electron microscopy (SEM)

A mid-logarithmic-phase culture of *Staphylococcus aureus* was exposed in duplicate to 50 μ M of α -Pte, α -Pte-CONH₂, or phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) as a control, in Columbia broth for 2 h at 30 °C. Bacteria were pelleted by centrifugation at 3,000 $\times$ g for 5 min, and washed 2 times in PBS. The supernatants were removed, and the pellets were fixed in 1 mL of glutaraldehyde 2% in 0.1M phosphate Sorensen buffer (pH 7.4) for 18 h. The cells were then sedimented on

poly-L-lysine-coated coverslips (Thermanox[®]) for one week in glutaraldehyde 1% in 0.1M phosphate Sorensen buffer (pH 7.4). The bacteria on the coverslips were washed 3 times in 0.1M phosphate buffer. Then they were dehydrated in a graded alcohol series. The samples were critical-point-dried (Leica CPD 030), sputter-coated with platinum (Jeol JFC1300), and viewed with a Jeol (JSM 6400 F) scanning electron microscope at the Electron Microscopy Center of the University of Caen (CMABio³).

2.9. Hemolytic activity

Hemolytic activity of α -Pte, α -Pte-CONH₂, was determined on red blood cells (RBCs) of three vertebrates: human (*Homo sapiens*) RBCs, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) RBCs, and lesser-spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) RBCs. Human (h), sea bass (sb) or lesser-spotted dogfish (lsd) RBCs were washed two times in PBS or PBS supplemented with 0.6 mg/mL of NaCl₂, and diluted to obtain a solution of 1% of erythrocytes. 90 μ L of the solution were incubated with 90 μ L of different peptide concentrations ranging from 10 μ M to 250 μ M, dissolved in PBS buffer for 1 h at 37 °C. Finally, hemolysis was determined by measuring the optical density of the supernatant at 415 nm. Zero hemolysis (blank) and 100% hemolysis were determined in PBS buffer and Triton X-100 (sigma) 1%, respectively.

2.10. Circular dichroism

CD spectra of synthetic, amidated and non-amidated pterocidin- α (0.1 mg/mL) were measured in potassium phosphate buffer in the presence or in the absence of trifluoroethanol 20%, 30% or 75% (v/v) on a CD spectrophotometer, JASCO J810 in a 1-mm path length cell. CD spectra were recorded from 190 to 250 nm. CD spectrum analysis and relative helix contents were deduced using the online BESTSEL software program developed by Micsonai and collaborators [30].

3. Results

3.1. Identification of pterocidin- α

Skin peptide extracts were separated by nano-LC and analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Database searching from mass spectrometry results with the Mascot 2.5.1 program revealed the presence of several peptides including one peptide encoded by a precursor of a piscidin-related peptide. Two forms of this peptide were identified in the two extracts at m/z values of 2409.09 and 2408.22. After MS/MS spectrum analysis (Fig. 1), the peptide with the primary sequence FIHHIIGGLFHVGVKSIHDLIR turned out to have 2 amidated and non-amidated forms, and was called pterocidin- α .

3.2. Sequence analysis of pterocidin A

Pterocidin- α is encoded by the pterocidin A precursor. This precursor was identified from the *de novo* transcriptome of lionfish dorsal spines and pelvic fins. Transcriptome assembly contained 76,327 transcripts with an average contig length of 668 nucleotides. The pterocidin A precursor is related to the piscidin precursor, with a sequence composed of 198 nucleotides encoding 66 amino acid residues. Multiple alignment of the pterocidin A precursor with other known piscidin precursors is presented in Fig. 2. More than 80 percent of identity was found with the other piscidin precursors. However, the most conserved part among the precursors corresponded to the 22-amino-acid signal peptide. The sequence corresponding to piscidin remained more variable. Pterocidin- α was similar to *tilapia* piscidins and revealed the presence of an extra glycine residue adjacent to the C terminal arginine responsible for peptide amidation, as observed for moronecidin and piscidin-3 of hybrid striped bass [4].

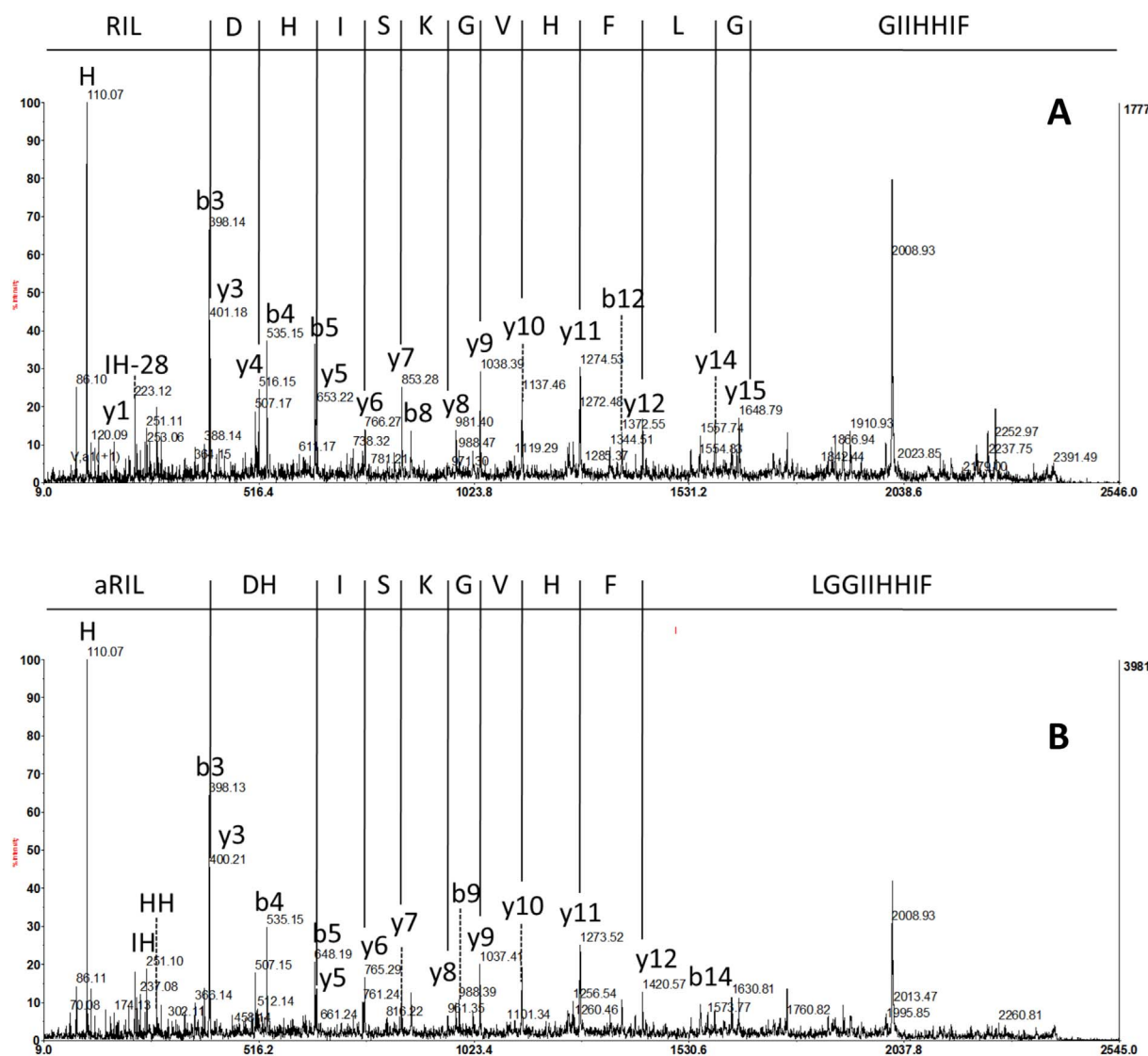


Fig. 1. MS/MS spectra of (A) pterocidin- α -COOH and (B) pterocidin- α -CONH₂.

3.3. Antibacterial activity of pterocidin- α

3.3.1. Determination of MICs and MBCs of pterocidin- α used alone or in a mixture

The minimal inhibitory or bactericidal concentrations of the two forms of pterocidin- α used alone or in a mixture were determined for several Gram-positive and Gram-negative bacteria including human, fish, and shellfish pathogens. The results are reported in Table 2. Pterocidin- α -CONH₂ inhibited all bacteria except *Salmonella typhimurium*. It inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida* at concentrations ranging between 1 and 5 μ M, and *Enterococcus faecalis* and *Vibrio vulnificus* at concentrations ranging between 10 and 25 μ M. Additionally, pterocidin- α -CONH₂ was bactericidal on these strains, with MBCs of 1–5 μ M for *S. aureus*, 5–10 μ M for *A. salmonicida*, 10–25 μ M for

E. faecalis and *E. coli*, and 25–50 μ M for *L. monocytogenes* and *V. vulnificus*. Pterocidin- α -COOH had a narrower spectrum of antibacterial activity. It inhibited only three strains, namely *S. aureus*, *E. coli* and *A. salmonicida*, with respective MICs of 5–10 μ M, 10–25 μ M and 25–50 μ M. Moreover, it did not display any bactericidal activity. Finally, a 1:1 mixture of the two forms had the same activity spectrum as pterocidin- α -CONH₂ alone, but with higher MICs and MBCs.

3.3.2. Time course of pterocidin- α -CONH₂ bactericidal activity

The time taken for α -Pte-CONH₂ to kill bacteria was evaluated on two strains. The results demonstrated that α -Pte-CONH₂ could kill bacteria in less than 30 min (*S. aureus*) and 120 min (*V. vulnificus*).

3.3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

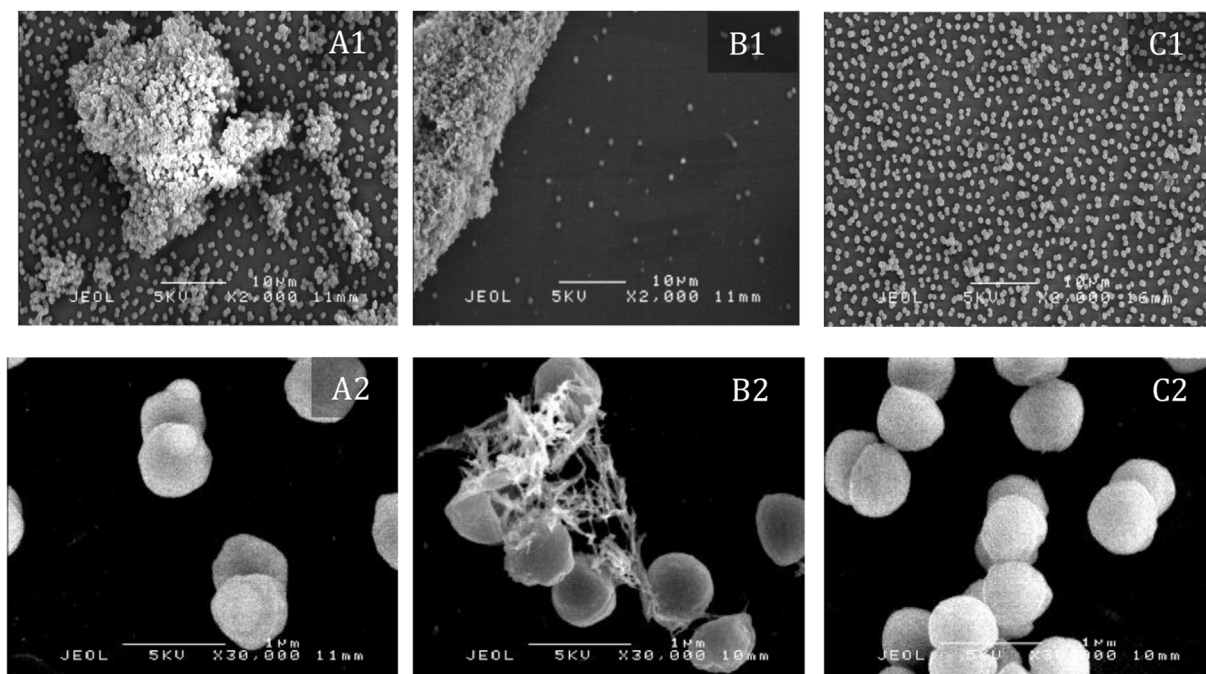
We examined bacterial cultures in the presence of α -Pte, α -Pte-

On-piscidin-4	MKCTILFLVLSMVVLMAEPGEFIIHHIIGGLFSAGKAIHRLIRRRRRGELQLEQELQQQLQLEKLQQQEKLNQR-FNREQLKRERVAFN	89
On-piscidin-3	MKCTMLFLVLSMVVLMAEPGEAFIHHIIGGLFSVVGKHIHSLIHGHGNVK-----QQQ-----QQQELNQRSFNREQFKRERAAFN	76
Pv-pterocidin-A	MKCTIALFLVLSMVVLMAEPGEAFIHHIIGGLFHVVGKSIHDLIR-GKNRD-MAE-----QQEL-ERAFDRER-----AFA	66
Mc-moronecidin	MKCATLSLVLSMVVLMAEPGDAFFHHIFRGIHVHVGKTIHKLVTGGK-----AEQDQDQYQQDQDQDQQAQQYQRFNRER-----AAFD	79
Mc-piscidin-3	MRCITLFLVLSMVVLMAEPGDAFIIHHIFRGIHVHAGRSIGRFLTGGK-----AQQEREQQDQ-----RFMDRER-----DAFN	67

Fig. 2. Alignment of *Pterois volitans* Pv-pterocidin-A with *Oreochromis niloticus* On-piscidin-3 (AGA16546.1) and On-Piscidin-4 (AGA16547.1), *Morone chrysops* Mc-moronecidin (AF332621.1) and Mc-piscidin-3 (APQ32047.1). The signal peptide is indicated in the yellow box, and the glycine residues predicted to be converted into C-terminal amides are highlighted in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2Antimicrobial activity of the two forms of pterioicidin α used alone or in a mixture.

	Bacteria	α -Pte		α -Pte-CONH ₂		α -Pte x α -Pte-CONH ₂	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	NA	–	1–5	25–50	10–25	25–50
	<i>Enterococcus faecalis</i>	NA	–	10–25	10–25	10–25	25–50
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5–10	NB	1–5	1–5	5–10	25–50
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	10–25	NB	1–5	10–25	10–25	25–50
	<i>Salmonella typhimurium</i>	NA	–	–	–	–	–
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	25–50	NB	1–5	5–10	5–10	10–25
	<i>Vibrio vulnificus</i>	NA	–	10–25	25–50	25–50	25–50

NA: No Activity; NB: Not Bactericidal; –: Not evaluated; MICs and MBCs are expressed in μ M.**Fig. 3.** Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* treated with 50 μ M of pterioicidin- α -COOH (A) or 50 μ M of pterioicidin- α -CONH₂ (B), or untreated (C).

CONH₂ by scanning electron microscopy (SEM) to study cell surface morphology. SEM observations of *Staphylococcus aureus* treated with the two forms of pterioicidin- α showed bacterial agglutination (Fig. 3-A1 and A2). In the presence of α -Pte-CONH₂, free bacteria were scarce (Fig. 3-B1), bacteria were agglomerated and surrounded by extracellular products (Fig. 3-B1 and B2).

3.4. Hemolytic activity

The hemolytic activity of the two peptide forms on human (h), sea bass (sb) and lesser-spotted dogfish (lsd) red blood cells is presented in Fig. 4. As expected, no hemolysis was observed in the negative control, while Triton-X 1% caused thorough hemolysis. α -Pte induced less hemolysis than α -Pte-CONH₂. Hemolytic activity of α -Pte depended on red blood cell origin. Sea bass red blood cells were more sensitive to α -Pte: 50% hemolysis was observed at 50 μ M, and 97% at 100 and 200 μ M. Only the 200 μ M concentration of α -Pte induced more than 60% hemolysis in the other red blood cells (hRBCs and lsdRBCs). As for α -Pte-CONH₂, it induced up to 90% hemolysis on all red blood cells from 50 μ M, whatever their origin.

3.5. Circular dichroism

The structural properties of α -Pte, α -Pte-CONH₂ were studied using

CD spectroscopy in water or in trifluoroethanol (TFE) 20%, 30% or 75%. A characteristic circular dichroism spectrum of α -helical peptides was observed with a high percentage of TFE (Fig. 5A). The α -helix percentage of each peptide (Fig. 5B) was calculated using the method proposed by Micsonai and collaborators [30]. In the absence of trifluoroethanol, the spectra of the two peptides were typical of a disordered structure. In trifluoroethanol 20%, α -Pte-CONH₂ appeared disordered, whereas α -Pte-CONH₂ showed an ordered structure with 7% α -helix content. Increasing the trifluoroethanol percentage induced greater helical structuring. In trifluoroethanol 30% and 75%, the ellipticities of both forms of pterioicidin- α decreased at 208 and 222 nm and increased at 190 nm, indicating stabilization of the α -helix content, with 15.1% and 27.1% for α -Pte, and 28.6% and 40.7% for α -Pte-CONH₂, respectively. These results demonstrate a greater ability of α -Pte-CONH₂ to form a helical structure than α -Pte in the same environment.

4. Discussion

No peptide related to piscidin had been described in a venomous fish before. Our results demonstrate for the first time the occurrence of an antimicrobial peptide related to piscidins in Scorpaenidae. This peptide was identified in lionfish skin in an amidated and a non-amidated form. Pterioicidin- α is encoded by the pterioicidin A precursor,

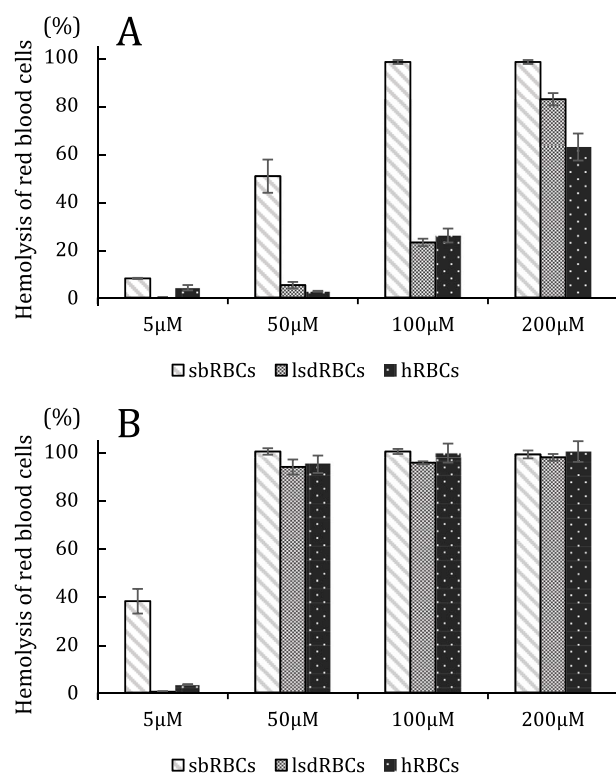


Fig. 4. Hemolysis assay. The hemolysis assay was performed with pterioicidin-α-COOH (A) or pterioicidin-α-CONH₂ (B) on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (sb), lesser-spotted dogfish, (*Scyliorhinus canicula*) (lsd) and human (*Homo sapiens*) (h) red blood cells (RBCs).

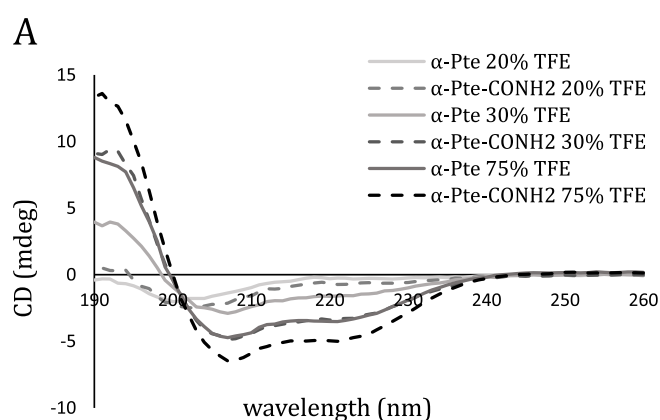


Figure 5B: Calculated helix contents based on the online BESTSEL software program

	% of α-helix content			
	water	20%TFE	30%TFE	75%TFE
α-Pte	-	0,1%	15,1%	27,1%
α-Pte-CONH ₂	-	7,1%	28,6%	40,7%

Fig. 5. Circular dichroism analysis. (A) Spectra obtained for pterioicidin-α-COOH (α-Pte) and pterioicidin-α-CONH₂ (α-Pte-CONH₂), in the presence of trifluoroethanol 20%, 30% or 75%. (B) Calculated helix contents based on the online BESTSEL software program developed by Micsonai et al. (2015).

and is organized similarly to other piscidin precursors. The presence of piscidins under two amidated and non-amidated forms as observed in lionfish was also observed in hybrid striped bass for piscidin-1 and piscidin-3. However, only the amidated forms of these piscidins were studied [3,4]. We synthesized the two amidated and non-amidated peptides to study the 2 forms of lionfish pterioicidin. Antibacterial

assays revealed that the amidated peptide had a broad activity spectrum against both Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria. Pterioicidin-α-CONH₂ or α-Pte-CONH₂ exhibited antibacterial activity with MICs close to those observed with other piscidins: it inhibited *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* growth with a MIC ranging between 1 and 5 μM, as observed for moronecidin [4]. α-Pte-CONH₂ inhibited *Aeromonas salmonicida* growth at concentrations ranging between 1 and 5 μM. It seemed more effective than pleurocidin, whose MIC on *A. salmonicida* ranged between 17.7 and 35 μM [1]. Chrysopsins inhibited *Vibrio vulnificus* growth at concentrations ranging between 2.5 and 10 μM [5], while pterioicidin-α-CONH₂ MICs ranged between 10 and 25 μM. We did not study α-Pte-CONH₂ resistance to salinity, but its activity against *Vibrio vulnificus* in a marine medium suggested that salt was not a constraint, as demonstrated for several piscidins including moronecidin, pleurocidins or more recently moroNC-NH₂ and moroPC-NH₂ [4,15,31]. Non-amidated pterioicidin-α had a narrower antibacterial spectrum, since it was only bacteriostatic against three bacteria, with higher MICs than amidated pterioicidin-α. A 1:1 mixture of the two peptides did not improve the effect on bacteria, suggesting that there was no synergistic effect. However, as no data are available about the ratios of the two forms in different lionfish tissues, we tested them with a 1:1 (v/v) ratio that may not have been optimal. Otherwise, scanning electronic microscopy observations were in accordance with antibacterial assay results: they demonstrated an agglutinating effect in the presence of the two forms of pterioicidin-α, and a lytic effect in the presence of the amidated form in less than two hours. Although these observations (agglutination and membrane destabilization) are similar to those described for human RNase6 [32], we cannot yet define the mechanism of action of pterioicidin-α. Besides, the hemolytic assay showed strong toxicity of the amidated form on all three types of red blood cells, with a higher effect on sea bass RBCs. On the other hand, the non-amidated peptide also exhibited hemolytic activity, but at higher concentrations than the amidated peptide. The non-amidated form had a stronger hemolytic effect on sea bass RBCs, suggesting that red blood cell sensitivity depends on cell origin. These results show that it is important to test peptides on several types of erythrocytes, especially for prospective subsequent applications. Overall, the *in vitro* assays clearly demonstrated that the amidated peptide was much more active than the non-amidated peptide on prokaryotic and eukaryotic cells. This strongly suggests that C-terminal amidation increases the toxic effect of pterioicidin-α, as described for other peptides [21,33,34]. For some peptides or hormones, this modification is crucial for receptor binding and for activity [35,36]. Regarding pterioicidin-α, there is a difference of one positive charge between the two forms due to amidation. This difference may probably explain our results, due to better electrostatic interactions with the negatively charged bacterial cells. However, the difference in net charge alone is not sufficient to explain the different hemolysis results, as demonstrated by Strandberg and collaborators [21]. Helix stability appears to also have an incidence on biological activity such as antimicrobial or hemolytic activity [37,38]. α-helical conformation is a common feature to piscidins, including moronecidins, chrysopsins, pleurocidins [1,4,5,39]. Our circular dichroism results confirmed the α-helical conformation of pterioicidin-α in trifluoroethanol. Amidated pterioicidin-α exhibited a greater ability to form α-helix, regardless of the trifluoroethanol concentration. This difference in structure stability could explain why amidation induced a greater lytic effect. This process has been fully described for modelin-5 and maximin H5, for which lower antibacterial and hemolytic activity was correlated with a decrease of the α-helical conformation following de-amidation [19,20]. In fact, amidation seems to modify the whole structure of the peptide by stabilizing its helical conformation as well as its physico-chemical properties and by subsequently influencing its interactions with cell membranes. Finally, this raises questions about the presence of the non-amidated form and its usefulness. There is now evidence that amidated pterioicidin-α shares features with other piscidins. It probably acts in

host defense like other piscidins and antimicrobial peptides described in fish [39].

Acknowledgements

We thank Julien Pontin for technical help. Circular dichroism analyses were performed by the *Optics & Spectroscopy platform* (UPR 4301, CNRS, Orléans). We thank Sandrine Villette for CD analysis.

References

- [1] A.M. Cole, P. Weis, G. Diamond, Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 12008–12013, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.18.12008>.
- [2] R.T. Syvitski, I. Burton, N.R. Mattatall, S.E. Douglas, D.L. Jakeman, Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder †, *Biochemistry* 44 (2005) 7282–7293, <http://dx.doi.org/10.1021/bi0504005>.
- [3] U. Silphaduang, E.J. Noga, Peptide antibiotics in mast cells of fish, *Nature* 414 (2001) 268–269, <http://dx.doi.org/10.1038/35104690>.
- [4] X. Lauth, H. Shike, J.C. Burns, M.E. Westerman, V.E. Ostland, J.M. Carlberg, J.C. Van Olst, V. Nizet, S.W. Taylor, C. Shimizu, P. Bulet, Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5030–5039, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109173200>.
- [5] N. Iijima, N. Tanimoto, Y. Emoto, Y. Morita, K. Uematsu, T. Murakami, T. Nakai, Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 675–686, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03419.x>.
- [6] Z.-R. Zhuang, X.-D. Yang, X.-Z. Huang, H.-X. Gu, H.-Y. Wei, Y.-J. He, L. Deng, Three new piscidins from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): phylogeny, expression and functional characterization, *Fish Shellfish Immunol* 66 (2017) 240–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.011>.
- [7] U. Silphaduang, A. Colomi, E.J. Noga, Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish, *Dis. Aquat. Organ* 72 (2006) 241–252, <http://dx.doi.org/10.3354/dao072241>.
- [8] S.A. Salger, K.R. Cassidy, B.J. Reading, E.J. Noga, A diverse family of host-defense peptides (piscidins) exhibit specialized anti-bacterial and Anti-Protozoal activities in fishes, *PLoS One* 11 (2016) e0159423, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159423>.
- [9] E.J. Noga, U. Silphaduang, N.G. Park, J.K. Seo, J. Stephenson, S. Kozlowski, Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 152 (2009) 299–305, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.12.018>.
- [10] J. Corrales, I. Mulero, V. Mulero, E.J. Noga, Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish, *Dev. Comp. Immunol* 34 (2010) 331–343, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.004>.
- [11] S.A. Salger, B.J. Reading, D.A. Baltzegar, C.V. Sullivan, E.J. Noga, Molecular characterization of two isoforms of piscidin 4 from the hybrid striped bass (*Morone chrysops*?? *Morone saxatilis*), *Fish Shellfish Immunol* 30 (2011) 420–424, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.009>.
- [12] I. Letunic, P. Bork, 20 years of the SMART protein domain annotation resource, *Nucleic Acids Res* (2017), <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx922>.
- [13] I. Letunic, T. Doerks, P. Bork, SMART: recent updates, new developments and status in 2015, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015), <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku949>.
- [14] J.S. Bae, J.M. Jung, C.M. An, J.W. Kim, S.D. Hwang, M.G. Kwon, M.A. Park, M.C. Kim, C. Il Park, Piscidin: antimicrobial peptide of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, *Fish Shellfish Immunol* 51 (2016) 136–142, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.010>.
- [15] S.C. Shin, I.H. Ahn, D.H. Ahn, Y.M. Lee, J. Lee, J.H. Lee, H.-W. Kim, H. Park, Characterization of two antimicrobial peptides from antarctic fishes (*Notothenia coriiceps* and *Parachaenichthys charcoti*), *PLoS One* 12 (2017) e0170821, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170821>.
- [16] K.-C. Peng, S.-H. Lee, A.-L. Hour, C.-Y. Pan, L.-H. Lee, J.-Y. Chen, Five different piscidins from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions, *PLoS One* 7 (2012), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050263>.
- [17] B.J. Sun, H.X. Xie, Y. Song, P. Nie, Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins, *J. Fish Dis* 30 (2007) 335–343, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00789.x>.
- [18] S.R. Dennison, M. Mura, F. Harris, L.H.G. Morton, A. Zvelindovsky, D.A. Phoenix, The role of C-terminal amidation in the membrane interactions of the anionic antimicrobial peptide, maximin H5, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* 1848 (2015) 1111–1118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.01.014>.
- [19] S.R. Dennison, F. Harris, T. Bhatt, J. Singh, D.A. Phoenix, The effect of C-terminal amidation on the efficacy and selectivity of antimicrobial and anticancer peptides, *Mol. Cell. Biochem.* 332 (2009) 43–50, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-009-0172-8>.
- [20] S.R. Dennison, D.A. Phoenix, Influence of C-terminal amidation on the efficacy of modelin-5, *Biochemistry* 50 (2011) 1514–1523, <http://dx.doi.org/10.1021/bi101687t>.
- [21] E. Strandberg, D. Tiltak, M. Ieronimo, N. Kanithasen, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic α -helical peptides, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 717–728, <http://dx.doi.org/10.1351/pac200779040717>.
- [22] E.Y. Chekmenev, B.S. Vollmar, K.T. Forseth, M.N. Manion, S.M. Jones, T.J. Wagner, R.M. Endicott, B.P. Kyriss, L.M. Homem, M. Pate, J. He, J. Raines, P.L. Gor, W.W. Brey, D.J. Mitchell, A.J. Auman, M.J. Ellard-ivey, J. Blazyk, M. Cotten, Investigating molecular recognition and biological function at interfaces using piscidins, antimicrobial peptides from fish, 1758 (2006) 1359–1372, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2006.03.034>.
- [23] V. Cornet, J. Henry, E. Corre, G. Le Corguille, B. Zanuttini, C. Zatylny-Gaudin, Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation, *J. Proteomics* 108 (2014) 209–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.019>.
- [24] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (2014) 2114–2120, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [25] M.G. Grabherr, B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, A. Regev, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nat. Biotechnol* 29 (2011) 644–652, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- [26] B.J. Haas, A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P.D. Blood, J. Bowden, M.B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M.D. Macmanes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C.N. Dewey, R. Henschel, R.D. Leduc, N. Friedman, A. Regev, De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis, *Nat. Protoc* 8 (2013) 1494–1512, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.
- [27] R.D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E.L.L. Sonnhammer, J. Tate, M. Punta, Pfam: the protein families database, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014), <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1223>.
- [28] T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat. Methods* 8 (2011) 785–786, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- [29] C. Hetru, P. Bulet, Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates, *Methods Mol. Biol.* 78 (1997) 35–49, <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-408-9:35>.
- [30] A. Micsonai, F. Wien, L. Kerna, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E3095–E3103, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- [31] A. Patrzykat, J.W. Gallant, J.-K. Seo, J. Pytyk, S.E. Douglas, Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes, *Antimicrob. Agents Chemother* 47 (2003) 2464–2470, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.8.2464-2470.2003>.
- [32] D. Pulido, M. Moussaoui, D. Andreu, M.V. Nogués, M. Torrent, E. Boix, Antimicrobial action and cell agglutination by the eosinophil cationic protein are modulated by the cell wall lipopolysaccharide structure, *Antimicrob. Agents Chemother* 56 (2012) 2378–2385, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06107-11>.
- [33] H.C. Chen, J.H. Brown, J.L. Morell, C.M. Huang, Synthetic magainin analogs with improved antimicrobial activity, *Febs Lett.* 236 (1988) 462–466.
- [34] Z. Oren, Y. Shai, A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*, *Eur. J. Biochem.* 237 (1996) 303–310.
- [35] D.J. Merkler, C-Terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity, *Enzyme Microb. Technol* 16 (1994) 450–456, [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90014-0](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)90014-0).
- [36] B.A. Eipper, D.A. Stoffers, R.E. Mains, The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation, *Annu. Rev. Neurosci* 15 (1992) 57–85, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.000421>.
- [37] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 55 (2000) 4–30 doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1 < 4::AID-BIP30 > 3.0.CO;2-M.
- [38] A. Giangaspero, L. Sandri, A. Tossi, Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5589–5600.
- [39] J.A. Masso-Silva, G. Diamond, Antimicrobial peptides from fish, *Pharmaceuticals* 7 (2014), <http://dx.doi.org/10.3390/ph7030265>.

3. Identification de deux nouveaux précurseurs apparentés aux piscidines chez le poisson-lion, Pterois volitans : les pteroidicidines B et C

Baptiste Houyvet^{a,d}, Yolande Bouchon-Navaro^b, Claude Bouchon^b, Erwan Corre^c, Céline Zatylny-Gaudin^{a,*}

^aNormandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France

^bUniversité des Antilles, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UNICAEN, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Labex Corail, Campus de Fouillol, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

^cPlateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (UPMC-CNRS), F-29688 Roscoff, France

^dSATMAR, Société ATLantique de MARiculture, 50760 Gatteville-Phare, France

*Corresponding author

E-mail: celine.gaudin@unicaen.fr

Résumé

L'étude *in silico* menée à partir des données transcriptomiques du poisson-lion a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs transcrits codant pour des PAMs dont trois transcrits codant pour des peptides apparentés aux piscidines : les pteroidicidines A, B et C. Les pteroidicine B et la pteroidicine C sont des précurseurs de longueurs respectives de 70 et 76 acides aminés dont le peptide signal prédit serait long de 22 résidus. Ces précurseurs ont notamment été identifiés grâce aux fortes homologies de séquence au niveau du peptide signal. Parallèlement, si l'approche peptidomique menée sur des extraits de peau a révélé la présence de la pteroidicine- α issu du précurseur A sous deux formes amidée et non amidée, elle n'a pas permis de détecter les formes matures des autres pteroidicidines issus des précurseurs B et C. N'ayant pas pu obtenir de données peptidiques concernant les peptides matures de ces deux derniers précurseurs, huit séquences ont été sélectionnées comme potentiels candidats. Certains de ces peptides de formes longues sont actifs à des CMI's comprises entre 1 et 5 μ M contre des pathogènes humains comme *listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* ou des pathogènes d'organismes marins comme *Aeromonas salmonicida*. A l'inverse de la pteroidicine α , ces

pteroïcides β et γ antibactériennes n'induisent pas d'hémolyse sur les érythrocytes humains. De plus, les résultats de dichroïsme circulaire montre que les pteroïcides β et γ se structurent faiblement en hélice- α en présence de TFE et cela indépendamment de la longueur des peptides.

3.1. Introduction

Parmi les peptides antimicrobiens retrouvés dans les premières lignes de défense immunitaire chez les poissons, on retrouve les peptides apparentés aux piscidines. Il s'agit d'une famille de peptides antimicrobiens décrite uniquement chez les poissons et qui semble donc être spécifique aux poissons. De récentes études suggèrent que les piscidines sont largement distribuées au sein des téléostéens au regard du nombre de peptides identifiés et du nombre d'espèces où ces peptides ont été identifiés (Patrzykat et al. 2003; Silphaduang et al. 2006; Salger et al. 2016). Il s'agit visiblement d'une famille de PAMs importante chez les poissons, d'autant plus que chez certaines espèces, il est possible de rencontrer plusieurs piscidines de type différent. C'est le cas notamment du tilapia, *Oreochromis niloticus* (Peng et al. 2012), du poisson plat, *pleuronectes americanus* (Douglas et al. 2003c), du mérou à tâches oranges, *Epinephelus coioides* (Zhuang et al. 2017) ou encore du bar hybride rayé (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) (Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002; Salger et al. 2011, 2016). Le bar hybride ne compte pas moins de 9 piscidines. Ce nombre correspond à la somme des piscidines issues de chacune des deux espèces parents (Salger et al. 2016). Salger et collaborateurs (2016) ont récemment proposé une classification des différentes piscidines du bar hybride en 3 classes selon leur taille, leur position phylogénétique et leur fonction. Brièvement, la classe I regroupe les piscidines de petite taille (22 aa) qui sont actives principalement sur les bactéries. La classe III compte les piscidines les plus longues (55 aa) qui sont actives majoritairement sur des protozoaires. Enfin la classe II comprend les piscidines de taille intermédiaire (44 à 46 aa), qui associent à la fois des propriétés antibactériennes et anti-protozoaires moins prononcées par rapport aux classes précédentes. Cette dernière classe pourrait jouer un rôle plus polyvalent (Salger et al. 2016). Récemment la famille des piscidines s'est élargie avec l'identification de la première piscidine chez le poisson-lion, *Pterois volitans* : la pteroïcine α issu du précurseur pteroïcine A (Houyvet et al. 2018). Une analyse *in silico* plus approfondie du transcriptome de *Pterois volitans*, a permis de mettre en évidence deux autres précurseurs B et C codant pour d'autres pteroïcides.

Cette étude porte sur l'analyse de ces deux précurseurs pterioïcidine B et C chez *Pterois volitans*. Elle associe également les études fonctionnelles et structurales menées à partir de peptides synthétiques issus de ces deux précurseurs, l'approche peptidomique n'ayant pas permis d'identifier les formes natives de ces deux précurseurs.

3.2. Matériels et méthodes

2.2.1 Matériel biologique

Les poisson-lion utilisés dans cette étude ont été capturés par chasse sous-marine au harpon pendant la période d'échantillonnage 2015-2016. Les épines dorsales et les nageoires pelviennes ont été prélevées sur 10 individus et conservées dans du RNA later (SIGMA aldrich) ou une solution d'acide acétique à 3%.

2.2.2 Analyse in silico du transcriptome de *Pterois volitans*

Deux transcriptomes illumina ont été obtenus à partir des épines dorsales et des nageoires pelviennes chez le poisson-lion (Houyvet et al. 2018). Ils comptent au total respectivement 8,117,178 et 8,471,617 reads dont la longueur maximale est de 150 pb. L'ensemble de ces reads a été déposé dans un service d'archivage de séquences de reads « SRA » sous les numéros d'accessions SRR5141017 et SRR5141018. L'assemblage du transcriptome a été réalisé sans génome de référence grâce à l'assembleur *de novo* Trinity (version 2.0.6), en utilisant les paramètres par défaut (Grabherr et al. 2011). La prédiction des protéines est réalisée en utilisant TransDecoder (Haas et al. 2013) qui est une fonction de trinity. L'annotation par homologie de séquence est réalisée par blastp des peptides prédits par TransDecoder et blastx des transcripts assemblés en utilisant la base de données Uniprot-Swissprot (version 2015-06). La recherche de domaines de protéines est réalisée avec hmmscan de hmmer v.3.1bl contre la base de données Pfam (Finn et al., 2014, version 29.0). Le software disponible en ligne signalP v4.1 (Petersen et al. 2011) a été utilisé pour la prédiction des peptides signaux. Enfin, l'annotation par fonction du transcriptome a été réalisée grâce à la fonction trinotate pipeline² décrite par Haas et collaborateurs (2013). L'annotation n'ayant pas permis de détecter toutes les piscidines, une recherche a été réalisée à partir du logiciel Peptraq développé pour rechercher des motifs spécifiques à partir de bases de données transcriptomique ou génomique (Zatylny-Gaudin et al. 2016). La stratégie développée pour rechercher des piscidines consiste à utiliser les homologues de séquences observées au niveau du peptide signal des précurseurs codant pour les piscidines. Ces homologues de séquences ont été décrites

ultérieurement (Douglas et al. 2003c; Yang et al. 2016) et sont présentées dans la figure 25 de ce chapitre et ont permis de travailler sur les motifs FLVL et MAEPG. Par la suite, les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant CLC Main Workbench6 (CLC BIO).

2.2.3 Recherche des formes matures des pterocidines β et γ .

Afin d'identifier la présence des peptides matures issus des précurseurs B et C, une approche peptidomique a été réalisée à partir de la peau comme décrit par Houyvet et al (2018).

2.2.4 Sélection et synthèse des peptides à partir des pterocidines B et C

Huit peptides ont été sélectionnés à partir des précurseurs des pterocidines B et C. Pour chacun d'eux les 20 premiers acides aminés situés après le site de clivage du peptide signal constituent les peptides parents, ce sont les peptides les plus longs. Ces peptides ont ensuite été déclinés en 3 formes tronquées de 17, 13 et 10 acides aminés selon les sites de clivage monobasiques potentiels voir tableau 8. Les propriétés physico-chimiques incluant la charge, l'hydrophobicité, la masse molaire de chacun de ces peptides ont été déterminées avec le logiciel disponible en ligne APD database (Wang and Wang 2004).

Tableau 8. Propriétés physico-chimiques des peptides sélectionnés à partir des pterocidines B et C.

Peptide	Séquence en AA	Nb d'AA	PM(Da)	Charge net	Hydrophobicité
β -Pte20	F F K R L K N A F K S A R Q A W R D Y K	20	2561	6	40%
β -Pte17	F F K R L K N A F K S A R Q A W R	17	2155	6	47%
β -Pte13	F F K R L K N A F K S A R	13	1613	5	46%
β -Pte10	F F K R L K N A F K	10	1299	4	50%
γ -Pte20	F F R H L K S L W K G A K A A F R G A R	20	2348	6	50%
γ -Pte17	F F R H L K S L W K G A K A A F R	17	2063	5	52%
γ -Pte13	F F R H L K S L W K G A K	13	1618	4	46%
γ -Pte10	F F R H L K S L W K	10	1362	3	50%

Séquence en AA : Séquence en acides aminés ; Nb d'AA : le nombre d'acides aminés ; PM : Poids moléculaire

2.2.5 Tests antibactériens

L'activité antibactérienne des peptides β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, β -Pte₁₃ et β -Pte₁₀ issus de la pterocidines B et γ -Pte₂₀, γ -Pte₁₇, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀ issus de la pterocidine C a été évaluée sur plusieurs bactéries présentées dans la [tableau 9](#). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée selon le tests d'inhibition de croissance en milieu liquide selon le protocole établi par (Hetru and Bulet 1997). Brièvement, 10 μ L de solution peptidique sont ajoutés à 100 μ L de suspension bactérienne et incubés en microplaques 96 puits. La solution bactérienne est diluée au 1/1000 de DO (DO₆₀₀) dans du milieu de culture appauvrie. Les milieux de cultures de test utilisés pour chacune des bactéries sont reportés dans le [tableau 9](#). La croissance bactérienne est évaluée par mesure de densité optique à 595nm après 16 heures d'incubation à 30°C ou 20°C pour les bactéries marines. Les CMIs sont exprimées en μ M selon un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] est la dernière concentration pour laquelle une pousse bactérienne est observée et [b] la concentration

Tableau 9. Souches bactériennes utilisées dans cette étude avec leur milieu de culture associé.

	Bacterie	Origine	Milieu de culture	Milieu de tests
Gram- positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 110871	BHI	PBHI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 76.117	LB	PB
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53.1 56	Col	Col
Gram- négative	<i>Escherichia coli</i>	CIP 54 .8T	LB	PB
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 103446	TPCS	TPCS
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CIP 103209T	TPCS	TPCS
	<i>Vibrio vulnificus</i>	CIP 109783	MB	SPB

CIP: Collection of « Institut Pasteur MB: Marine Broth (Conda): 40.20 g/L, pH 7.6 SPB (Saline Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 15 g/L, pH 7.2 LB: (Luria-Bertani): peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.5 PB (Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH7.4 BHI: Brain Heart Infusion (BD): 37 g/L, pH 7.4 PBHI Poor Brain Heart Infusion (BD): 18.5 g/L, peptone 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, pH 7.4 TSB: Trypticasein Soy Broth (Conda): 40 g/L, pH 7.3 Col: Columbia broth (Conda) 35g/L, pH 7.4.

pour laquelle la

croissance bactérienne a été totalement inhibée. Les CMBs sont exprimées en μ M selon un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] est la dernière concentration pour laquelle une pousse bactérienne est observée et [b] la concentration pour laquelle 100% des bactéries ont été tuées.

2.2.6 Tests hémolytiques

L'activité hémolytique des peptides β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, β -Pte₁₃ et β -Pte₁₀ issus de la pterocidines B et γ -Pte₂₀, γ -Pte₁₇, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀ issus de la pterocidine C a été évaluée sur des érythrocytes humains. Les érythrocytes sont rincés deux fois dans du PBS, puis dilués afin d'obtenir une solution à 1% d'érythrocytes. 90 μ L de solution érythrocytaire sont incubés avec 90 μ L de solution peptidique à des concentrations comprises de 5 μ M à 200 μ M. L'incubation est faite sans agitation pendant une heure à 37°C. Le pourcentage d'hémolyse est finalement déterminé par mesure de densité optique à 415 nm. L'expérience est réalisée en triplicats. Les contrôles 0% d'hémolyse (blanc) et 100% d'hémolyse sont déterminés respectivement en PBS ou Triton X-100 1%.

2.2.7 Etude structurale par dichroïsme circulaire

Les propriétés structurales des peptides β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, β -Pte₁₃ et β -Pte₁₀ issus de la pterocidines B et γ -Pte₂₀, γ -Pte₁₇, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀ issus de la pterocidine C ont été évaluées par dichroïsme circulaire. Les peptides ont été étudiés à une concentration de 0,1 mg/mL dilué dans du tampon PBS ou dans 35% et 75% de trifluoroéthanol (TFE). Les spectres CD ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre JASCO J810 dans une cellule de 1mm de long. L'analyse des spectres CD obtenus ainsi que le contenu en hélice sont réalisés par la méthode développée par [Micsonai et collaborateurs \(2015\)](#) et le logiciel BESTSEL disponible en ligne.

3.3. Résultats et discussion

La recherche *in silico* menée à partir des données transcriptomiques de peau de poisson-lion a permis d'identifier deux nouveaux précurseurs de piscidines : pterocidines B et C. Les motifs FLVL et MAEPG utilisés avec le logiciel « peptraq » sont suffisamment sélectifs pour permettre l'identification de nouveaux précurseurs de piscidines, confirmant ainsi la forte homologie de séquence au niveau du peptide signal. Cette recherche *in silico* avec peptraq révèle également les limites de l'annotation par BLAST et l'utilité d'un tel logiciel pour des recherches ciblées. Elle peut constituer un moyen rapide pour identifier de nouveaux PAMs chez d'autres espèces proches et notamment de nouvelles piscidines, dans la mesure où l'on dispose de bases de données génomiques ou transcriptomiques. L'étude des pterocidines B et C montre que la séquence correspondant au peptide signal partage au minimum 77% d'identité avec celles des autres piscidines indiquées [figure 26](#). La pterocidine C présente au niveau de sa séquence un % d'identité élevé (>55%) avec les piscidines-4 de *morone saxatilis*, de *morone chrysops* ou d'*Epinepleus coides* [figure 26.B](#). Alors que la pterocidine B semble plus proche de la piscidine-7 de

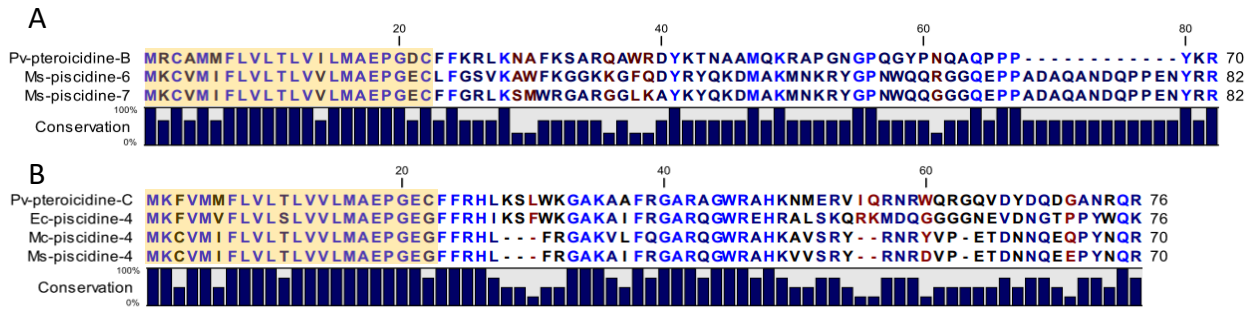


Fig 26. (A) Alignement de la pterioicidine B de *Pterois volitans*, Pv-pterioicidine-B avec la piscidine 6 de *Morone saxatilis*, Ms-piscidine-6 ([APQ32043.1](#)) et la piscidine-7 de *Morone saxatilis*, Ms-piscidine-7 ([APQ32054.1](#)). (B) Alignement de la pterioicidine C de pterois volitans, Pv-pterioicidine-C avec les piscidines 4 d'*Epinephelus coioides*, Ec-piscidine-4 ([AKA60777.2](#)), de *Morone saxatilis*, Ms-piscidine-4 ([APQ32049.1](#)) et de *Morone chrysops*, Mc-piscidine-4 ([ADP37959.1](#)).

morone saxatilis avec 48% d'identité [figure 26.A](#) . N'ayant pas pu détecter les formes matures des peptides issus des pterioicidines B et C par une approche peptidomique, 8 séquences faisant suite au peptide signal correspondant à des formes plus ou moins longues (10 à 20AA) ont été synthétisés. Il s'agit des peptides β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, β -Pte₁₃ et β -Pte₁₀ issues de la pterioicidine B et γ -Pte₂₀, γ -Pte₁₇, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀ issues de la pterioicidine C. Ces deux séries de peptides sont très proches notamment au niveau de leur longueur en acides aminés mais également par leurs propriétés physico-chimiques voir [tableau 8](#). L'hydrophobicité des peptides est comprise entre 40 et 50% et la charge nette varie de +3 à +6, ce qui couramment observé pour des PAMs cationiques ([Adem Bahar et al. 2013](#)). L'ensemble des CMI et des CMBs sont reportées dans la [tableau 10](#). Les résultats montrent que tous les peptides sont capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli* avec des CMI différentes. Au regard des tests effectués, β -Pte₁₀ semble être le peptide le moins actif, inhibant uniquement la croissance d'*Escherichia coli* entre 25 et 50 μ M. β -Pte₁₃ qui est actif également uniquement sur *Escherichia coli*, a un effet bactériostatique entre 1-5 μ M et un effet bactéricide entre 10-25 μ M. Les deux peptides les plus courts issus de la pterioicidine C, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀, sont capable d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli* mais également celles d'*Aeromonas salmonicida* ([tableau 10](#)). Ces 4 peptides de 10 et 13 AA n'induisent pas d'hémolyse [figure 27](#). Les séquences les plus longues β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, γ -Pte₂₀ et γ -Pte₁₇ correspondent aux peptides les plus actives. Elles sont bactéricides sur l'ensemble des souches testées excepté sur *Enterococcus faecalis* dont la croissance est inhibée uniquement par γ -Pte₂₀ et γ -Pte₁₇ avec une CMI de 1 à 5 μ M. Si γ -Pte₂₀ et γ -Pte₁₇ révèlent un effet antibactérien semblable, ce n'est pas le cas de β -Pte₂₀ et β -Pte₁₇, ce dernier présentant souvent des CMI et des CMBs plus élevés que celles observées pour β -Pte₂₀. Concernant les activités hémolytiques, γ -Pte₂₀ et γ -Pte₁₇ sont les peptides les plus

hémolytiques à des concentrations élevées, respectivement 19% et 43% à 200 μ M, le peptide γ -Pte₁₇ étant le plus hémolytique. Les autres peptides et notamment les peptides les plus courts sont très faiblement hémolytiques ($\leq 10\%$ d'hémolyse) comme le montre la [figure 27](#). La structure tertiaire d'un peptide et notamment d'un PAM est importante puisqu'elle peut moduler ses activités antibactérienne et hémolytique ([Mura et al. 2016](#)). Afin de comprendre les différents résultats obtenus sur nos peptides, une analyse par dichroïsme circulaire a été réalisée sur les séquences de 13 à 20 acides aminés. Les résultats obtenus montrent une légère structuration en hélice α pour les formes les plus longues (β -Pte₂₀, β -Pte₁₇ et γ -Pte₂₀) avec 75% de Trifluoroéthanol [figure 28](#). Le TFE est un solvant permettant de mimer un environnement propice à la structuration en hélice α ,

Tableau 10. Activité antibactérienne des peptides synthétiques issus des précurseurs des pterocidines B et C.

Bactéries		Pterocidine-B							
		β -Pte ₂₀		β -Pte ₁₇		β -Pte ₁₃		β -Pte ₁₀	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Gram-positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	1-5	5-10	5-10	25-50	NA	-	NA	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-5	10-25	10-25	25-50	NA	-	NA	-
Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	1-5	5-10	1-5	1-5	1-5	10-25	25-50	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	10-25	10-25	10-25	10-25	NA	-	NA	-
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1-5	1-5	5-10	5-10	NA	-	NA	-
	<i>Vibrio vulnificus</i>	5-10	5-10	10-25	10-25	NA	-	NA	-

Bactéries		Pterocidine-C							
		γ -Pte ₂₀		γ -Pte ₁₇		γ -Pte ₁₃		γ -Pte ₁₀	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Gram-positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	1-5	5-10	1-5	5-10	NA	-	NA	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1-5	NA	1-5	NA	NA	-	NA	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-5	1-5	1-5	1-5	NA	-	NA	-
Gram-négative	<i>Escherichia coli</i>	1-5	1-5	1-5	10-25	10-25	10-25	25-50	25-50
	<i>Salmonella typhimurium</i>	5-10	5-10	5-10	5-10	NA	-	NA	-
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1-5	1-5	1-5	1-5	25-50	NA	25-50	NA
	<i>Vibrio vulnificus</i>	10-25	10-25	10-25	10-25	NA	-	NA	-

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimal Bactéricide ; NA : Non Actif ; - non déterminé.

mais il possède certaines limites (Myers et al. 1998; Roccatano et al. 2002). Un milieu recueillant les propriétés des membranes de bactéries aurait peut-être permis de visualiser une meilleure structuration en hélice.

Si les peptides β -Pte₂₀ et γ -Pte₂₀ possèdent un spectre d'activité antibactérienne large, proche de celui observé pour les piscidines (Masso-Silva and Diamond 2014), ces données

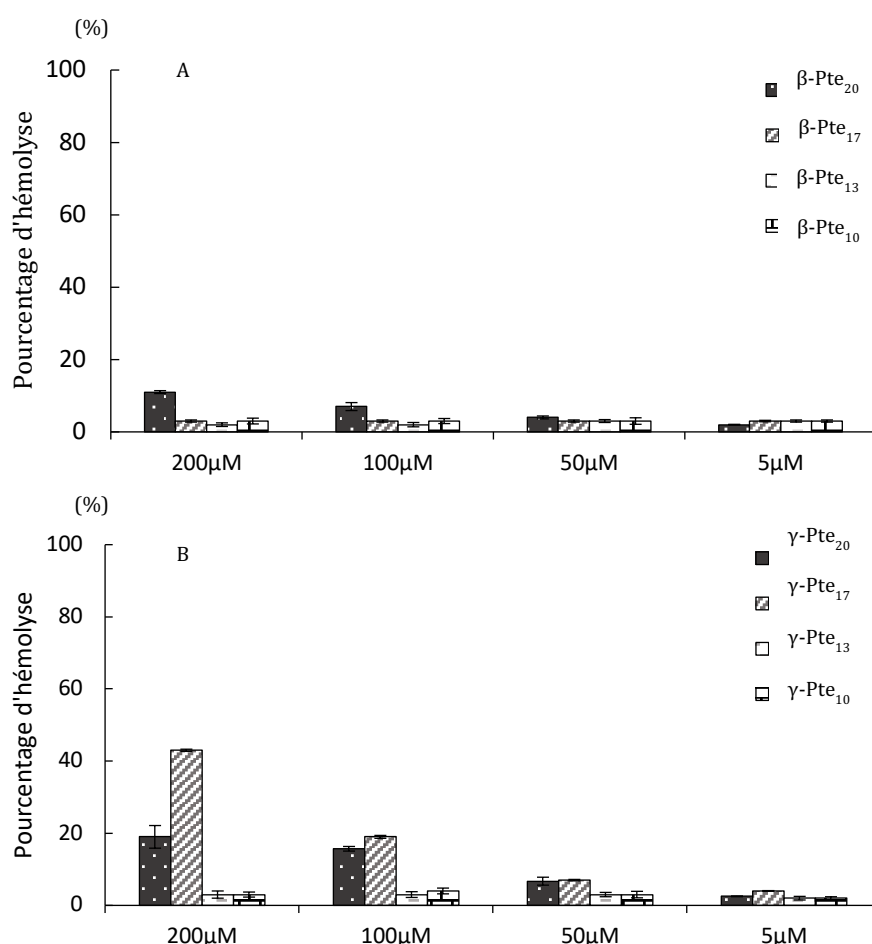


Fig 27. Activité hémolytique. Le pourcentage d'hémolyse des peptides synthétiques β -Pte₂₀, β -Pte₁₇, β -Pte₁₃ et β -Pte₁₀ issus du précurseur de la pterioïcidine B (A) et γ -Pte₂₀, γ -Pte₁₇, γ -Pte₁₃ et γ -Pte₁₀ du précurseur de la pterioïcidine C (B) a été évalué à différentes concentrations sur des érythrocytes humains.

ne permettent cependant pas de statuer sur leur réalité biologique. De plus, il n'est pas exclu que les formes natives des pterioïcides B et C soient des pterioïcides de grande taille à l'image des piscidines 4, 5, 6 et 7 du bar hybride (Salger et al. 2016) et comme pourrait le suggérer les alignements figure 26. Ces peptides de plus grande taille étant plus difficilement identifiables en spectrométrie de masse cela pourrait également expliquer en partie l'absence de détection lors de l'approche peptidomique. Comme le suggèrent les alignements en figure 26, les trois pterioïcides du poisson-lion semblent correspondre à

différentes classes de piscidines comme cela a été décrit pour les piscidines du bar hybride (Salger et al. 2016). Pour confirmer, il est nécessaire de caractériser toutes les formes matures endogènes des pterocidines.

Cette étude montre que les peptides issus de la partie N-terminale de ces pterocidines peuvent générer des peptides antibactériens. C'est le cas de nombreux autres précurseurs de piscidines dont les formes natives n'ont pas été caractérisées mais qui sont néanmoins

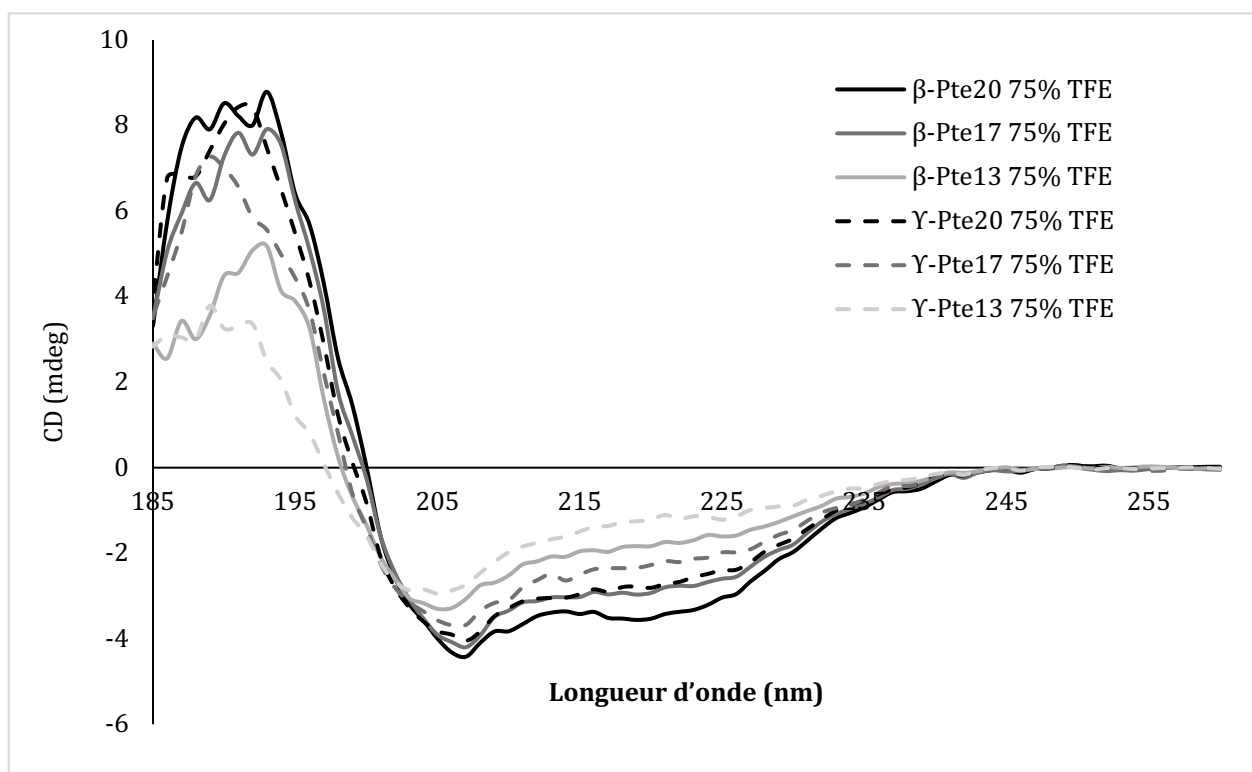


Fig 28. Analyse de Dichroïsme circulaire. Suivi par dichroïsme circulaire de la structuration des peptides synthétiques issus du précurseur de la pterocidine B et du précurseur de la pterocidine C en présence de 75% de trifluoroéthanol (TFE).

très actives contre divers pathogènes lors de tests *in vitro* (Niu et al., 2013; Peng et al., 2012; Ruangsri et al., 2012). Dans le cas de longues piscidines, s'agit-il d'une adaptation évolutive qui permet aux piscidines même sous forme tronquée de générer des PAMs à l'image des PAMs dérivés de l'histone (Hirsch 1990) ? Enfin ces peptides sont intéressants du fait qu'ils n'induisent pas d'hémolyse aux concentrations pour lesquelles ils inhibent et sont bactéricides contre les bactéries testées. Cela s'explique très probablement par leur faible capacité à se structurer en hélice- α (Tossi et al. 2000) et par ailleurs cela soulève des questions quant au mode d'action de ces peptides, qu'il serait intéressant de déterminer.

3.4. Conclusion

Deux nouveaux précurseurs pterocidines B et C ont été identifiés à partir d'une analyse *in silico* utilisant des motifs conservés au sein de la séquence codant pour le

peptide signal des précurseurs de piscidines. La découverte de ces deux précurseurs chez le poisson lion montre que ce dernier comporte trois catégories de piscidines à l'image de ce qui a été observé chez d'autres téléostéens. A partir des deux pterocidines B et C, huit peptides de 10 à 20 acides aminés ont été synthétisés. Les tests fonctionnels montrent que quel que soit le précurseur d'origine les formes les plus longues sont les plus actives sur les différentes bactéries testées. Ces peptides antibactériens sur des souches pathogènes et non hémolytiques pourraient constituer une alternative aux antibiotiques.

Remerciements

Les analyses en dichroïsme circulaire ont été réalisées par la plateforme de spectroscopie optique du centre de biophysique moléculaire (UPR 4301, CNRS, Orléans). Nous tenons à remercier Sandrine Villette pour la réalisation des analyses CD.

4. Discussion pterocidines

Dans cette étude, nous avons caractérisé 3 nouveaux précurseurs codant pour des peptides apparentés aux piscidines chez le poisson lion, *Pterois volitans* (figure 25). Comme il a été décrit précédemment pour l'ensemble des précurseurs caractérisés (figure 23), la séquence correspondant au peptide signal est très conservée entre les 3 précurseurs des pterocidines, la séquence correspondant aux PAMs à l'inverse est très différente, le seul point commun étant la phénylalanine du côté N-terminale.

```
Pv-PTE-A MKCIALFLVLSMVVLM AEPGEAFIHHTIIGGLFHVGKSIHDLIRGKNRDMAEQQELERAFDRERAF
Pv-PTE-B MRCAMMFLVLTILVILMAEPGDCFFKRLKNAFKSARQAWRDYKTNAAMQKRAPGNPGQGYPNQAQPPPYKR
Pv-PTE-C MKFVMMFLVLTILVVLMAEPGECFFRHLKSLWKGAFAFRGARAGWRAHKNMERVIQRNRWQRGQVDYDQDGANRQR
```

Figure 25 : Alignement des précurseurs de pterocidines du *Pterois volitans*, le peptide signal est encadré en jaune.

L'analyse phylogénétique de l'ensemble de ces précurseurs identifiés chez le poisson-lion est représentée par un cladogramme circulaire (figure 30). Cette analyse semble montrer que les précurseurs du poisson-lion pourraient être classées de la même manière que les piscidines du bar hybride (Salger et al. 2016). Cette analyse regroupe le précurseur de la pterocidine A avec ceux de la moronecidine (piscidine 1) et de la piscidine 3 du bar hybride (Silphaduang and Noga 2001; Salger et al. 2016), ce qui est tout à fait cohérent au vu des propriétés structurales de l' α -Pte. La pterocidine C proche des piscidines 4 du bar hybride (figure 24) apparaît lors de l'analyse associée aux piscidines de la classe II (Scott

A Salger et al., 2016). Enfin, la pteroïcidine B proche des piscidines 6 et 7 (figure 24) semble appartenir à la classe III (Scott A Salger et al., 2016). L'identification des formes natives des pteroïcidines B et C pourrait conforter cette analyse phylogénétique.

En ce qui concerne les PAMs issus de ces 3 précurseurs, seule la pteroïcidine α a été détectée par spectrométrie de masse sous deux formes amidée et non amidée. Cette pteroïcidine α d'un point de vue séquence et activité est très proche de la moronecidine, identifiée chez le bar hybride (Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002). L'amidation de la pteroïcidine α comme de la moronecidine (Silphaduang and Noga 2001) peut ne pas avoir lieu générant ainsi deux formes endogènes qui au vu de leurs activités différentes pourraient avoir chacune un rôle différent à jouer.

Les formes natives des autres piscidines issues des précurseurs pteroïcidine B et C n'ont pas été détectées. Cela suggère qu'il puisse s'agir de peptides de grande taille à l'image des piscidines 4, 6 et 7 de bar hybride (Scott A Salger et al., 2016). Néanmoins, il n'est pas exclu que ces pteroïcidines puissent être exprimées seulement après une stimulation bactérienne, à l'image de certaines piscidines du tilapia, *Oreochromis niloticus* (Peng et al. 2012). Par ailleurs, les formes courtes que nous avons étudiées, nous ont permis de mettre en évidence l'importance de la région carboxy-terminale des piscidines. Nous voyons en effet une perte d'activité qui est corrélée avec la taille. Plus la région C-terminale est réduite, moins les peptides sont antibactériens. Cela s'observe pour les pteroïcidines β et γ . Par ailleurs, l'amidation du côté C-terminal de l' α -Pte conditionne également son activité antibactérienne. L'étude structurale en dichroïsme circulaire de ces différentes pteroïcidines montre par ailleurs que la structuration en hélice- α n'est pas nécessaire pour l'activité antibactérienne des pteroïcidines ce qui pose des interrogations sur leur mode d'action. Enfin, malgré l'absence de détection des formes endogènes, les peptides β -Pte et γ -Pte sont néanmoins de bon antibactériens.

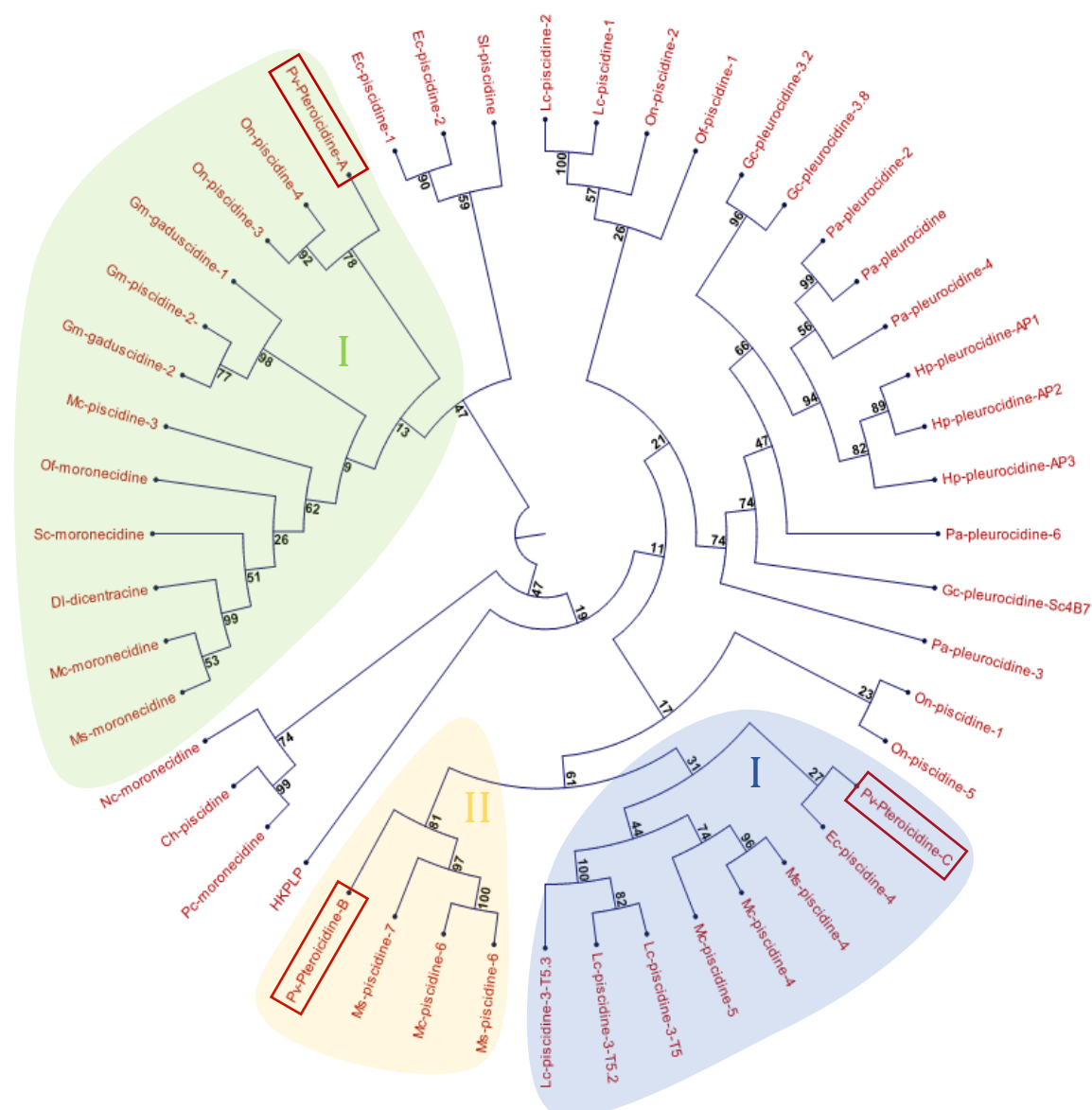


Figure 30 : Etude de la relation phylogénétique des pterocidines de *Pterois volitans* avec les autres piscidines. L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la méthode du neighbor-joining. Les résultats sont présentés sous la forme d'un cladogramme circulaire. L'intervalle de confiance a été évalué avec la méthode de bootstrap avec 1000 simulations. Les valeurs obtenues sont en pourcentage et sont indiquées sur le schéma. L'analyse a été réalisée avec les séquences dont le détail est disponible dans la **table 1 en annexe**. Les pterocidines A, B et C sont encadrées en rouge. La classification proposée par [Salger et collaborateurs \(2016\)](#) étendue aux piscidines les plus proches est indiquée par les couleurs suivante: vert (**classe I**), bleu (**classe II**) et jaune (**classe III**).

Leur mode d'action et également sur la fonction biologique de l' α -Pte. Enfin, à travers cette étude, malgré l'absence de détections des formes endogènes, les peptides β -Pte et γ -Pte sont néanmoins révélés comme de très bon antibactériens. Cela soulève une question concernant les piscidines en général et notamment au vu de toutes les piscidines étudiées qui n'ont pas été détectées de manière endogène : Existe-t-il un mécanisme ou une

adaptation de cette famille de PAMs qui permettrait aux piscidines même clivées de rester antibactériennes pour lutter contre les infections ?

D. Discussion

L'approche transcriptomique menée chez *Pterois volitans* a permis d'identifier 7 transcrits codant pour différents PAMs : β -défensine, hepcidine, LEAP-2, NK-lysine et 3 pterocidines. C'est la première fois que de tels peptides sont identifiés chez un téléostéen venimeux. C'est également le premier poisson où il a été mis en évidence l'ensemble des familles de PAMs décrites chez les téléostéens ([Masso-Silva and Diamond 2014](#)) à l'exception de celle des cathélicidines. L'analyse en spectrométrie de masse a démontré la présence de deux peptides issus de ces transcrits dans les extraits de peau associée aux épines. Il s'agit de la β -défensine et de la pterocidine- α , issue du précurseur pterocidine A.

Il est possible que ces peptides soient exprimés et libérés de manière constitutive au niveau des tissus. Pour les autres peptides qui n'ont pas été détectés par spectrométrie de masse, il est fort probable qu'ils soient faiblement concentrés dans les tissus ou libérés de manière inductible suite à une infection. C'est ce qui est notamment observé pour les cathélicidines ([Chang et al. 2006](#)) et les défensines ([Falco et al. 2008](#); [Casadei et al. 2009](#)) chez la truite, *Oncorhynchus mykiss*. La rtCATH_2 est exprimée de manière constitutive au niveau des branchies, des reins et de la rate tandis que la rtCATH_1 n'apparaît dans ces mêmes tissus seulement en réponse à la présence d'*A. salmonicida* ([Chang et al. 2006](#)). En ce qui concerne les défensines, si les β -défensines omDB-3 et 4 sont exprimées de manière constitutive dans les branchies, omDB-1 est exprimée uniquement suite à une infection par *Y. ruckeri* ([Casadei et al. 2009](#)) cette dernière induisant également une surpression d'omDB-3.

Associés à la peau et notamment aux épines, les PAMs identifiés pourraient assurer chez le poisson lion, une protection contre les infections notamment lors des envenimations.

En effet au cours des envenimations, le poisson-lion pique son éventuel prédateur pour se défendre, ce qui provoque des lésions cutanées au niveau de l'épine utilisée. Dans les venins associés à la défense et sécrétés au niveau de la peau, il n'est pas rare de retrouver de nombreux PAMs comme chez les grenouilles. En effet, chez *Xenopus laevis* l'étude de la peau a permis de caractériser les mangainines 1 et 2 (Zasloff 1987), les peptides PGLa et XPF (Soravia et al. 1988), PGLA-H (Hou et al. 2011) et récemment, les peptides XLAsp-P1 (Li et al. 2016) et XLAsp-P2 (Zhang et al. 2017). Au niveau de la peau de *Rana esculenta* de nombreux PAMs sont également répertoriés comme les brevenines, les esculentines, les caerulines (Simmaco et al. 1990; Ali et al. 2003) ou encore les Ranacyclines (Mangoni et al. 2003).

Par ailleurs, la forte toxicité observée sur les érythrocytes pour l' α -Pte pourrait suggérer un autre rôle de ce PAM chez le poisson lion au cours de l'envenimation par exemple. Ce peptide pourrait participer directement à l'action du venin par son effet cytotoxique comme cela a été décrit pour l'hadrurine, un PAMs présent dans le venin du scorpion *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios et al., 2000), la melittine issue du venin d'abeille *Apis mellifera* (Fennell et al. 1968), la crabroline du frelon *Vespa crabro* (Argiolas and Pisano 1984) ou encore les lycotoxines de l'araignée *Lycosa carolinensis* (Yan and Adams 1998).

Ce chapitre s'est focalisé essentiellement sur l'étude fonctionnelle des peptides de structure simple sans cystéines. Elle nous a permis d'identifier six peptides antibactériens. Deux d'entre eux, non hémolytiques pourraient avoir un potentiel en aquaculture dans la mesure où ils s'avèreraient non toxique sur les organismes marins.

Chapitre II : Identification de PAMs chez la seiche, *Sepia officinalis*

A. Introduction

1. Présentation du modèle *Sepia officinalis*

La seiche, *Sepia officinalis* est une espèce d'intérêt économique pour la Région Normandie. En chalutage ou avec des casiers, 4 000 à 7000 tonnes sont capturées par an par les pêcheurs normands ce qui représente le tiers des captures françaises. A la fois, mystérieux et fascinant ce modèle semelpare à durée de vie courte (<2ans) très présent sur nos côtes mérite amplement l'attention que nous lui portons depuis plusieurs années. Si les premières études menées sur ce modèle ont porté sur le cycle de vie (Medhioub 1986; Boucaud-Camou et al. 1991), la reproduction (Henry et al. 1997, 1999; Hanlon et al. 1999; Zatylny et al. 2000a, 2002, Bernay et al. 2004, 2005, 2006a; Enault et al. 2012), la dynamique des populations (Robin et al. 2014) ou encore sur le comportement (Dickel et al. 2013) et notamment le comportement prédateur (Duval et al. 1984; Cornet et al. 2014), ces dernières années des travaux se sont focalisés sur la pérennité de cette espèce notamment *via* ses modalités de défense (Cornet 2015a, b).

1.1. Classification

La seiche *Sepia officinalis* fait partie des Céphalopodes, l'une des 8 classes décrites chez les Mollusques Figure 31. Les Céphalopodes regroupent quant à eux 4 sous-classes : 1) les



Figure 31 : Photographies de *Sepia officinalis*. (www.marlin.ac.uk)

Ammonoidea (†) et 2) *Belemnoida* (†) disparus au Crétacé-Paléocène ; 3) les *Nautiloidea* ayant conservé des caractères primitifs comme la coquille externe et 4) les *Coleoidea* qui se caractérisent par une coquille interne, régressée ou absente chez les octopodes figure 32. Les Coleoïdés regroupent les pieuvres (*Octopoda*) majoritairement benthiques, les calmars (*Teuthoidea*) pélagiques et les seiches (*Sepioidea*) necto-benthiques.

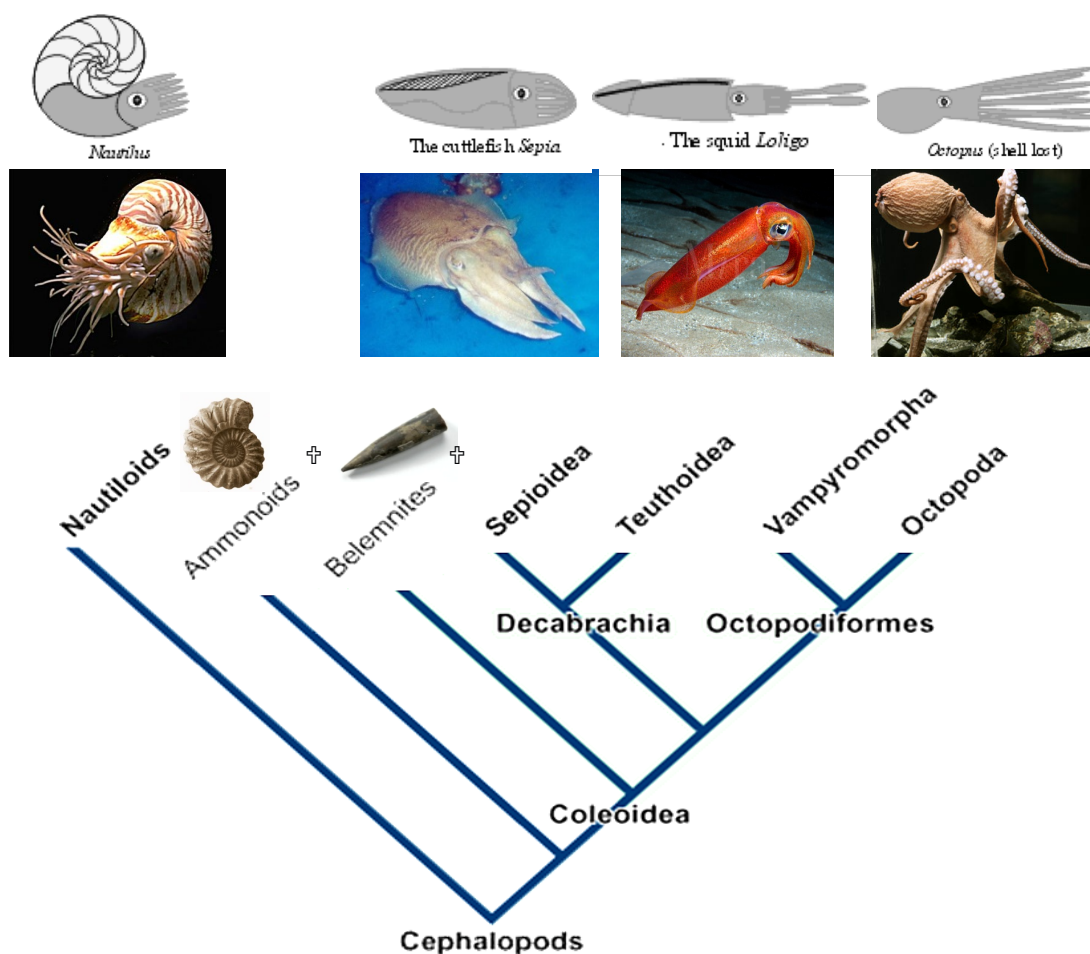


Figure 32 : Arbre phylogénétique replaçant les différents taxons des céphalopodes. D'après [Ruppert, Fox et Barnes, 2004](#).

1.2. Caractéristiques et mode de vie

Chez les Céphalopodes, ce qui signifie littéralement « tête sur les pieds », la tête, l'appareil brachial et l'entonnoir forment une unité morphologique particulière appelée céphalopodium ([Roper 1990](#)). L'appareil brachial des *Coleoidea* se compose de 8 ou 10 bras (8 bras + 2 tentacules préhenseurs), ce qui permet la distinction entre les Octobranchia (pieuvres) et les Decabrachia (calmars et des seiches). Les deux tentacules préhenseurs sont utiles notamment pour la capture des proies. Elles sont extensibles et comme les autres bras, elles sont munies de ventouses qui permettent d'agripper les proies.

La seiche est un prédateur qui se nourrit de crabes, de poissons osseux, de mollusques et de crevettes ([Guerra 2006](#)). Deux techniques de chasses sont décrites chez ce modèle. La première utilisant les tentacules préhenseurs est adaptée pour la capture de proies

mobiles comme les poissons ou les crevettes (Messenger 1968). La seconde technique consiste à se placer au-dessus de la proie pour la saisir et l'immobiliser avec l'ensemble de ses bras, cette technique appelée « coiffe » s'applique principalement pour les crabes (Duval et al. 1984). À l'aide de son bec (mandibules de configuration prognathe), la seiche mord ses proies et injecte sa salive paralysante. Produite par les glandes salivaires postérieures (GSP), la salive est acheminée par le canal salivaire jusqu'aux papilles salivaires situées au niveau de la mandibule inférieure comme illustré par la figure 33. La paralysie induite peut être réversible au bout de 15 minutes sur le crabe vert, *Carcinus maenas* comme cela a été montré avec les extraits peptidiques de GSP (Cornet et al. 2014). La caractérisation du protéome des GSP a été effectuée par des approches transcriptomiques et protéomiques (Cornet et al. 2014). Au sein des GSP, Cornet et collaborateurs (2014) ont identifié plusieurs catégories de protéines comprenant deux toxines : une céphalotoxine et une CRISP « Cysteine Rich Secreted Protein ». La So-céphalotoxine d'environ 100kDa existe sous deux isoformes semblables à la céphalotoxine de *Sepia esculenta* dont l'activité paralysante a été observée sur les crabes, *Potamon dehaani* (Ueda et al. 2008). La So-CRISP d'environ 25kDa est très proche des toxines CRISP neurotoxiques décrites chez les reptiles venimeux (Nobile et al. 1994, 1996, Yamazaki et al. 2002b, a, Wang et al. 2005, 2006). Des enzymes ont également été identifiées comme des peptidases, la phospholipase A2 connue pour participer à l'action du venin comme chez l'abeille (Mollay and Kreil 1974) ou la chitinase qui facilite la digestion des exosquelettes de crabes ou de crevettes. Au côté de ces protéines impliquées dans la prédation, d'autres protéines associées au système immunitaire ont été caractérisées au sein des GSP comme des LBP « Lipopolysaccharide Binding Proteins », une BPI « Bactericidal Permeability Increasing proteins » ou le lysozyme pouvant

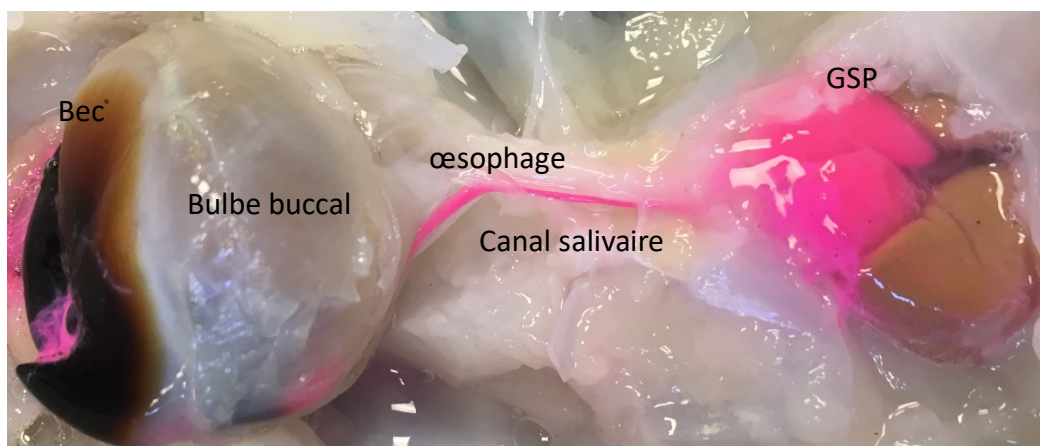


Figure 33 : photographie de la dissection de la partie antérieure de la seiche : Observation du canal salivaire reliant la glandes salivaires postérieures à la papille salivaire après injection d'acrylique et ablation de la masse supra-oesophagienne.

permettre une protection vis à vie des pathogènes ; [Cornet et collaborateurs \(2014\)](#) ayant mis en évidence une activité antibactérienne à partir d'extraits de GSP.

Dans le chapitre I, l'appareil venimeux présenté chez *Pterois volitans* a été décrit comme un système de défense. Chez *Sepia officinalis*, le venin est associé à la prédation, ce qui semble être une similitude chez les protostomiens venimeux au regard de la [figure 34](#), alors que chez les deutérostomiens aquatiques les appareils venimeux décrits ont un rôle dans la défense. Quelques exceptions subsistent chez les hexapodes comme les vespidae, chez les squamates avec les serpents, ou chez quelques rares mammifères venimeux comme le monotrème. La seiche n'utilise pas son venin pour se défendre mais elle possède d'autres atouts pour échapper à ses prédateurs.

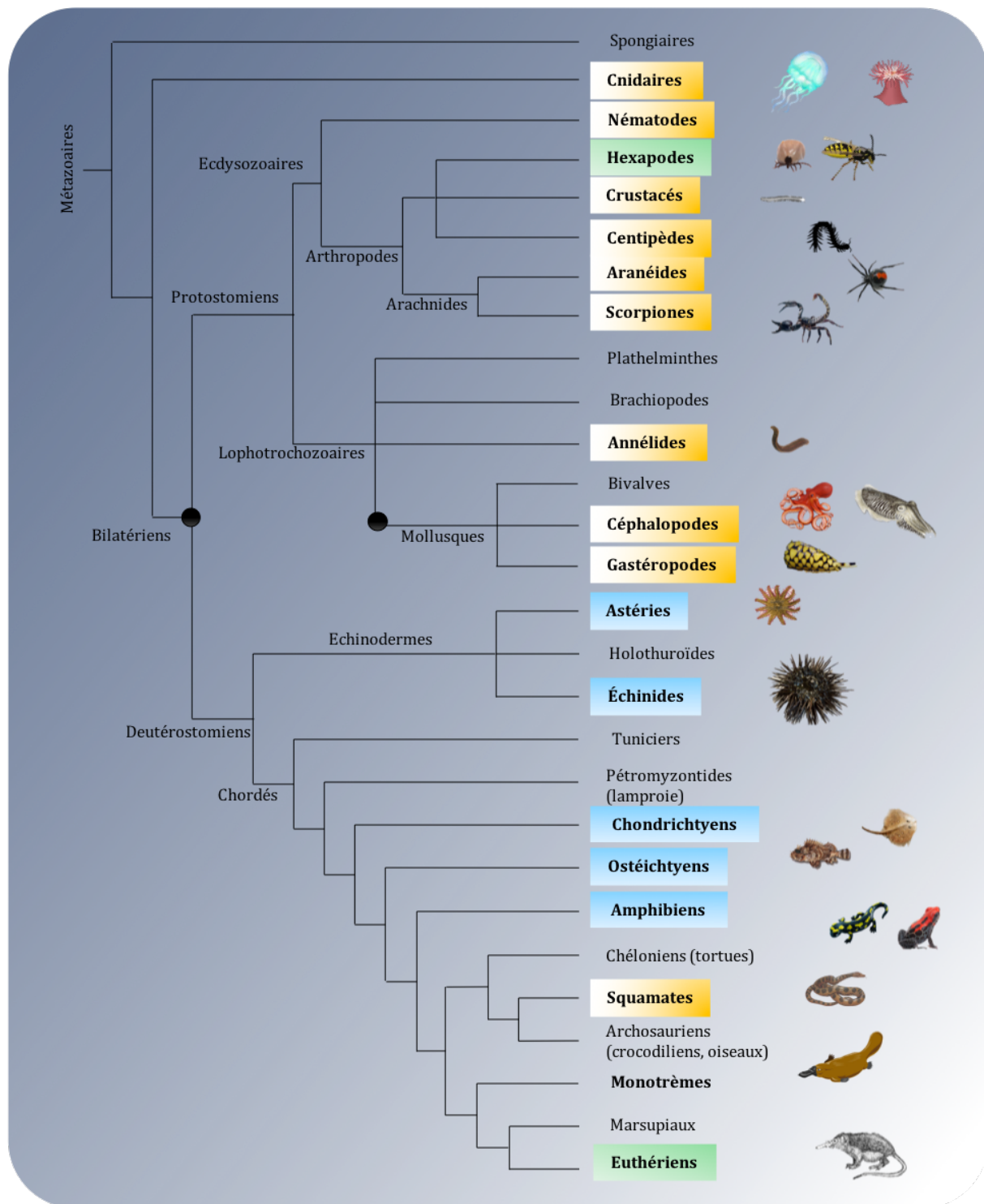


Figure 34 : Arbre phylogénétique représentant les principaux embranchements du règne animal, dont ceux possédant des espèces venimeuses. En noir, les groupes d'espèces ne présentant pas d'espèces venimeuses ; en **jaune**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la prédation ; en **bleu**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la défense ; en **vert**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la prédation et/ou pour la défense. (d'après Casewell et al., 2012).

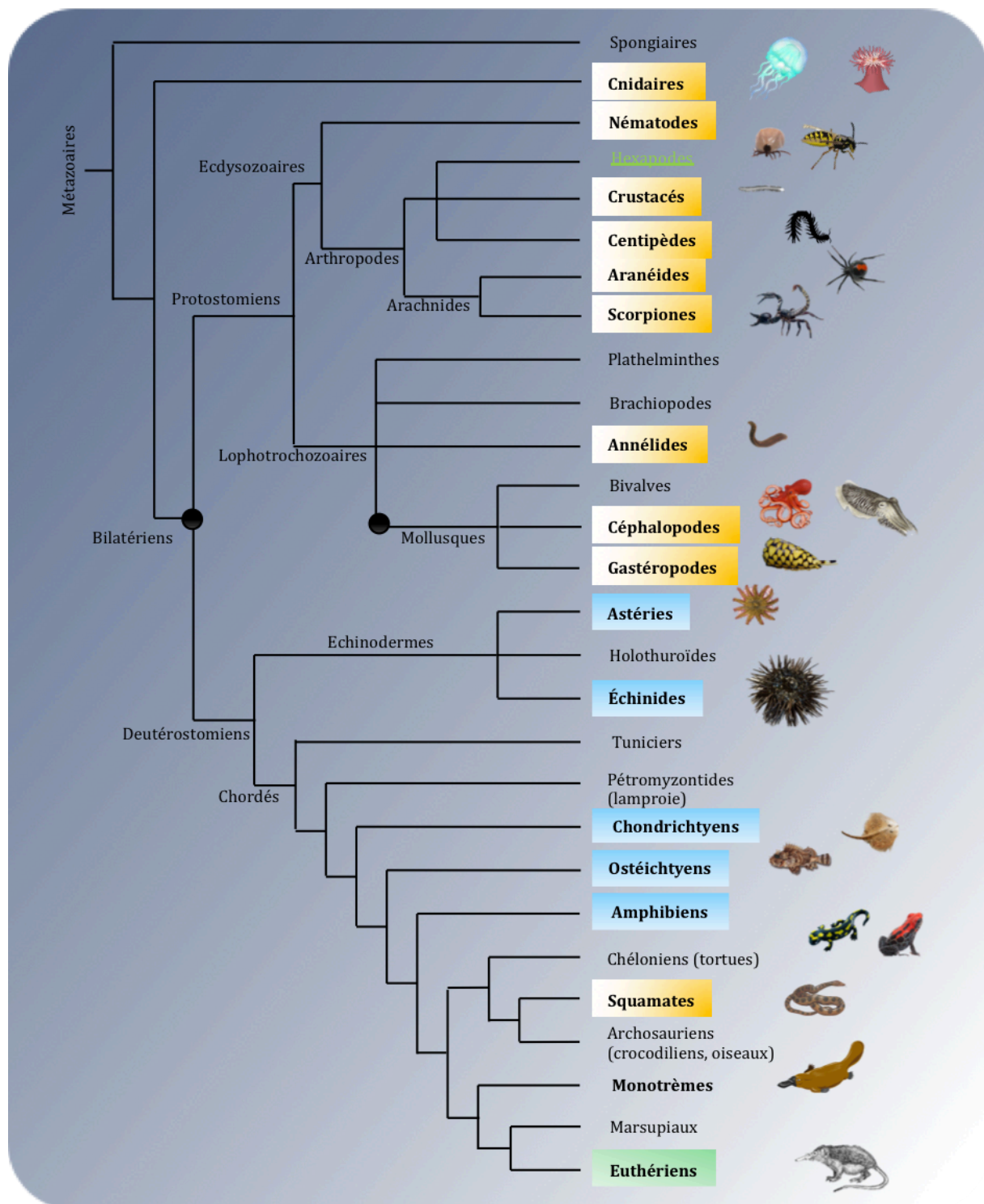


Figure 34 : Arbre phylogénétique représentant les principaux embranchements du règne animal, dont ceux possédant des espèces venimeuses. En noir, les groupes d'espèces ne présentant pas d'espèces venimeuses ; en **jaune**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la prédation ; en **bleu**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la défense ; en **vert**, les groupes présentant des espèces ayant un venin pour la prédation et/ou pour la défense, d'après [Casewell et al., 2012](#).

Avec la réduction ou la disparition de la coquille, on observe chez les céphalopodes et chez *Sepia officinalis* un appareil locomoteur unique au sein du règne animal. Il repose sur le manteau et l'entonnoir et permet à l'animal de se propulser par réaction comme nous pouvons le voir sur la [Figure 35](#). Face au prédateur, la seiche peut s'échapper très rapidement. Souvent cette fuite est associée à la projection d'encre afin de se dissimuler et éviter l'attaque du prédateur ([Derby 2014](#)). A côté, la seiche comme les autres céphalopodes peut également se cacher en se camouflant dans son environnement, les céphalopodes sont capables de se fondre dans le décor en modifiant à la fois leur forme et leur couleur ([Osorio et al. 2017](#)). D'une part, Les céphalopodes modifient leur corps ainsi que la texture de leur peau grâce aux muscles et aux forces hydrostatiques pour ainsi mimer une algue par exemple [figure 36.A](#). D'autre part, le changement de couleur est assuré par les iridophores, les leucophores et surtout les organes chromatophores qui associent des cellules à pigments (chromatophores) et un système neuromusculaire ([Messenger 2001](#)). Parmi les chromatophores, on retrouve les mélanophores contenant la mélanine. Ce pigment brun-noir participe à la composition de l'encre et de la capsule

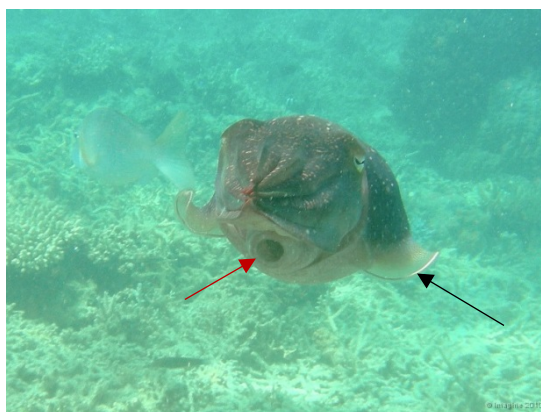


Figure 35 : Illustration de l'appareil locomoteur par propulsion à réaction de la seiche. Nous pouvons observer l'entonnoir bien ouvert projetant l'eau. Photo tirée d'une banque d'images disponible avec le lien suivant : <http://pguiraudou.free.fr/>. La flèche rouge indique l'entonnoir et la flèche noire la nageoire de la seiche.



Figure 36 : Illustration des compétences de camouflage des céphalopodes. Elles reposent sur des modifications au niveau de la texture de la peau et de sa couleur. (A) une seiche camouflée, (B) la même seiche envoyant des signaux de communication intra et interspécifique. D'après [Osorio et al., 2017](#).

des œufs de seiche *S. officinalis* où il jouerait un rôle dans la photo protection ([Solano Id 2017](#)).

La seiche et les Céphalopodes en général, sont des Mollusques et des protostomiens très évolués. Ceux-ci sont de redoutables prédateurs, capables de s'adapter à leur environnement et de se camoufler. Ils ont également des facultés cognitives remarquables leur permettant l'apprentissage et la mémorisation ([Messenger 2001](#)). Leur système nerveux repose sur un système nerveux centralisé protégé par une enveloppe cartilagineuse et un système périphérique comprenant des axones géants ; l'ensemble étant associé à des structures sensorielles perfectionnées comme les yeux proches de ceux des vertébrés.

1.3. Cycle de vie de la seiche : une espèce migratrice et semelpare

Les céphalopodes, y compris la seiche sont des organismes exclusivement marins. La seiche *Sepia officinalis* est abondante en Mer du Nord, en Manche, en Atlantique Est ainsi qu'en Méditerranée [figure 37](#). C'est une espèce migratrice et semelpare, son cycle biologique a fait l'objet de plusieurs études ([Medhioub 1986](#); [Boucaud-Camou and E., Boismery 1991](#); [Boucaud-Camou et al. 1991](#)). L'ensemble de ce cycle se déroule sur une période de 2 années en Manche comme l'illustre la [figure 38](#). C'est durant l'été, lorsque les températures sont favorables et les proies abondantes que les juvéniles naissent sur les côtes Normandes. A l'automne, les jeunes seiches entament leur première migration vers des aires d'hivernage situées plus en profondeur en Manche Ouest. Entre 60 et 70 mètres, la température de l'eau est plus élevée que sur les côtes et plus clémente. Les seiches restent dans ces aires d'hivernage de novembre à février, aucun développement sexuel

n'est observé durant cette période. Au printemps, lorsque les températures augmentent, les seiches encore immatures regagnent les côtes pour s'y nourrir et pour poursuivre leur développement tout au long de l'été. Dès septembre les mâles sont sexuellement matures tandis que les femelles présentent une maturation sexuelle plus lente et sont bloquées en prévitellogenèse. A l'approche de l'hiver, les seiches effectuent leur seconde migration, les femelles ont débuté leur maturation sexuelle qui se poursuivra pendant les 6 prochains mois. A leur second printemps, les seiches femelles sont sexuellement matures et regagnent les côtes avec les mâles pour se reproduire.

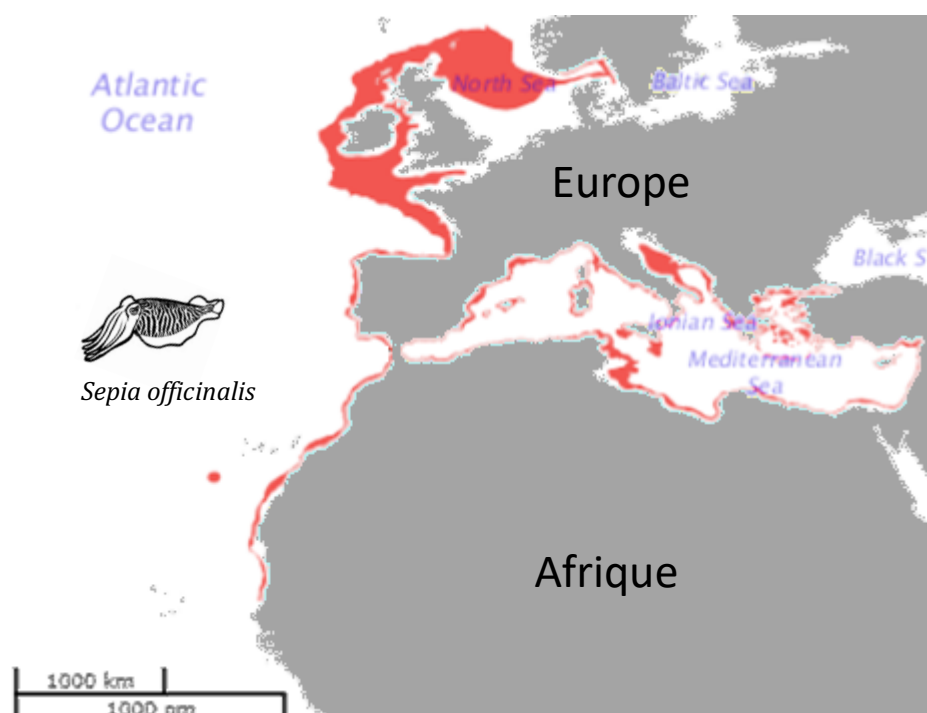


Figure 37 : Distribution géographique de la seiche *Sepia officinalis*. D'après les données de la FAO <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>.

Espèces gonochoriques, les géniteurs se retrouvent pour s'accoupler sous l'influence de phéromones libérées notamment par les œufs fraîchement pondus (Boal et al. 2010; Enault 2012). L'accouplement de la seiche a également fait l'objet de nombreuses études (Adamo and Hanlon 1996; Hanlon et al. 1999; Adamo et al. 2000). Selon Hanlon et collaborateurs (1999) l'accouplement se divise en 4 étapes. La première étant l'initiation, Le mâle par l'un de ses bras ventraux manipule la femelle de façon qu'ils se placent tous deux dans la position dite « tête-à-tête » comme illustré dans la figure 38.6. De manière plus prononcée que chez le poisson-lion, le mâle est très facilement identifiable de la femelle par son « pattern » de couleur particulier associant des bandes noires et blanches très marquées au niveau du manteau et des bras ventraux, figure 39. L'étape suivante est

le nettoyage, le mâle avec son entonnoir projette de l'eau dans la cavité buccale de la femelle pour retirer les spermatophores d'autres prétendants. Il transfère alors ces spermatophores dans la cavité palléale de la femelle grâce à son pénis. Enfin, il propulse à nouveau de l'eau avec une faible intensité pour permettre le stockage des spermatanges (réservoir à permatozoïdes) dans les réceptacles séminaux de la poche buccale femelle et l'évacuation des étuis vides des spermatophores.



Figure 38 : Cycle biologique de la seiche commune, *Sepia officinalis* en Manche. **1.** Naissance des juvéniles sur les côtes normandes ; **2.** Migration des jeunes seiches dans les aires d'hivernage ; **3.** Au printemps, Les seiches immatures retournent le long des côtes Normandes ; **4.** A 14 mois, les seiches entament leur 2^{ème} migration hivernale ; **5.** Alors que les mâles sont déjà matures, les femelles entrent en prévitellogénèse, elles seront matures au printemps de leur 2^{ème} année ; **6.** A leur retour sur les côtes les géniteurs se retrouvent pour s'accoupler ; **7.** Les femelles pondent leurs œufs **8.** Après la période de reproduction, les géniteurs meurent.

L'accouplement initie la ponte chez la femelle. Cette ponte est régulée par différents facteurs notamment des facteurs ovariens tels que la sepovotropine (Zatylny et al. 2000a), les SepCRP (*Sepia* Capsule Releasing Peptides) (Bernay et al. 2005) ou les OJPs (Ovarian Jelly-Peptides) (Bernay et al. 2006a). Les neuropeptides participent également au contrôle de la ponte chez la seiche comme les peptides apparentés au FMRFa (Henry et al. 1999) ou les peptides apparentés à l'APGWamide, aux CCAPs (Crustacean CardioActive Peptides) au SCP (Small Cardioactive Peptide) ou au FLGamide (Zatylny-Gaudin et al. 2016; Marvin et al. 2001; Henry et al. 1997; Endress et al. in press). Parallèlement, il y a des phéromones libérées par les œufs dans le milieu comme le peptide ILME (Zatylny et al. 2000a) ou les sex pheromones (Enault 2012). La femelle, sous l'influence de ces régulateurs, libère ses œufs un par un environ toutes les 3 à 4 minutes. Les ovocytes sont fécondés dans la cavité buccale par les spermatozoïdes préalablement déposés par le mâle grâce à l'intervention d'un peptide « sperm attractant » (Zatylny et al. 2002). Les œufs sont accrochés soigneusement avec les bras sur un support immergé. Une seiche pond en moyenne 600 œufs en milieu naturel. En captivité, en milieu protégé, une femelle bien alimentée peut pondre jusqu'à 3000 œufs (Forsythe et al. 1994). Ces œufs sous forme de grappes se développeront sans protection parentale jusqu'à la fin de l'été. Après la reproduction, les géniteurs meurent d'épuisement, laissant comme seule trace de leur passage, leur os retrouvés parfois en abondance sur les plages Normandes Figure 38.7.

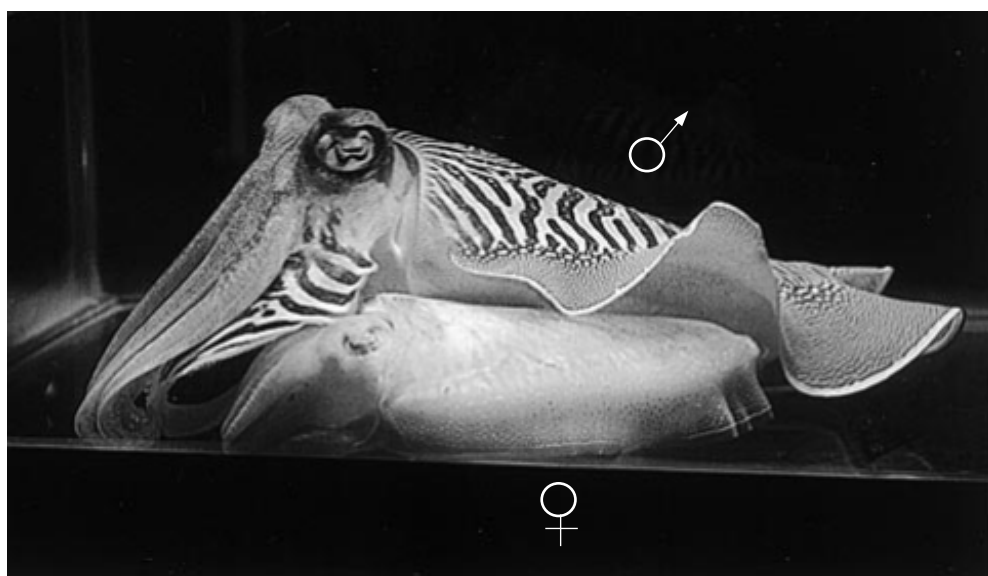


Figure 39 : Illustration des « patterns de couleur » très contrastés entre mâle et femelle lors de l'accouplement. Photo issue des travaux de Boal et collaborateurs (1999).

2. Les Céphalopodes face aux infections

2.1. Etat de l'art sur les maladies décrites chez les céphalopodes

Les Céphalopodes, comme la seiche *Sepia officinalis*, malgré leur durée de vie courte sont présents dans les océans depuis des millions d'années. Ils semblent traverser les époques sans être affectés. Les rares cas de pathologies répertoriés sont liés au mode de vie en captivité et à la fin de vie. [Castellanos-Martínez and Gestal \(2013\)](#) ont réalisé un travail de synthèse portant sur les pathogènes recensés chez différentes espèces de Céphalopodes. Les infections observées sont souvent liées à des blessures au moment de la capture ou à des ulcérations qui apparaissent après de longues périodes de captivité. Très généralement, au niveau de ses infections des bactéries à Gram négatif sont identifiées comme *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Pseudomonas stutzeri*, et *Aeromonas caviae* au niveau des ulcères d'*Octopus joubini* ou *Vibrio parahaemolyticus*, *V. damsela*, et *P. stutzeri* isolés à partir des ulcères d'*O. briareus* ([Hanlon et al. 1984](#)). [Ford et Collaborateurs \(1986\)](#) indiquent également que les bactéries du genre *Aeromonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Vibrio sp.* et *Flexibacter*. sont présentes au niveau du manteau du calmar *Loliguncula brevis* sain sauvage ou en captivité et que seuls *V. alginolyticus*, *Vibrio metschnikovii*, *Aeromonas sp.*, et *Pseudomonas sp.* sont observés dans des cas d'ulcères. Chez les seiches, le seul pathogène décrit correspond à *V. alginolyticus*, retrouvé dans 62% des necropsies réalisés sur différentes espèces de seiches incluant *S. apama*, *S. pharaonis* et *S. officinalis* ([Sangster and Smolowitz 2003](#)).

A côtés des bactéries, l'un des pathogènes les plus important est un parasite du genre *Aggregata* ([Castellanos-Martínez et al. 2014](#)). Il s'agit d'un protozoaire qui affecte le tractus digestif et qui impacte l'assimilation des nutriments ([Castellanos-Martínez and Gestal 2013](#)). Ce parasite est transmis aux céphalopodes par la consommation de crustacés, ces derniers constituant des hôtes intermédiaires indispensables au développement des coccidies ([Castellanos-Martínez et al. 2014](#)). Ces parasites sont décrits comme étant exclusifs aux espèces *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis* en Espagne ([Pascual et al. 1996a](#)). Si les pathologies induites par ces protozoaires ne sont pas fatales, ils affaiblissent suffisamment l'hôte pour qu'il soit vulnérable à d'autres facteurs biotiques ou abiotiques ([Pascual et al. 2007](#)).

Il existe d'autres parasites chez les Céphalopodes appartenant à l'embranchement des plathelminthes comme les cestodes et trématodes ou à l'embranchement des némathelminthes mais aucun d'entre eux n'a été décrit comme néfaste pour la seiche *Sepia officinalis*. Ce n'est pas le cas des crustacés du genre *Pennella* capables d'affecter à la fois *O. vulgaris* et *S. Officinalis* (Pascual et al. 1996b). Si un certain nombre d'études portent sur la présence de quelques pathogènes chez les céphalopodes, il n'y a cependant à ce jour aucune maladie réellement décrite notamment chez les seiches.

2.2. Le système immunitaire chez les céphalopodes

Les Céphalopodes possèdent un système immunitaire inné, ils n'ont pas de système immunitaire adaptatif comme les téléostéens. Chez ces espèces, Il n'y a donc pas d'effecteurs immunitaires équivalents aux lymphocytes B et T ainsi qu'aux immunoglobulines et aux récepteurs aux cellules T. Cela dit, ces espèces comme d'autres invertébrés apparus il y a plusieurs millions d'années, sont encore présentes aujourd'hui, ce qui signifie que le système immunitaire inné seul est suffisamment efficace pour les protéger des infections. Afin d'interagir avec les microorganismes, reconnaître, éliminer les pathogènes et réparer les dommages, le système immunitaire inné repose sur une réponse cellulaire et une réponse humorale (Iwanaga and Lee 2005) semblables à celles décrites chez les poissons. Les céphalopodes, se distinguent des autres mollusques et des invertébrés en général par leur système circulatoire clos (Roper 1990). Initialement, un seul type d'hémocyte était décrit chez *O. vulgaris* and *E. cirrhosa*. Récemment par des analyses en cytométrie de flux, Troncone et Collaborateurs (2015) ont mis en évidence 3 populations d'hémocytes chez *O. vulgaris* incluant des cellules de type hémocytoblastes, des hyalinocytes et des granulocytes. Chez *Sepia officinalis*, une seule, la population de granulocytes, semble présente Le Pabic et collaborateurs (2014). Les hémocytes chez les céphalopodes sont produits par le corps blanc, une masse blanche située de chaque côté du système nerveux central à proximité des yeux (Claes 1996). L'immunité chez les céphalopodes a fait récemment l'objet d'une revue par Castillo et collaborateurs (2015). Les hémocytes à l'aide d'opsonines sont capables de phagocyter les éléments étrangers comme des bactéries pathogènes, des levures ou autres débris. Ils assurent ensuite leur lyse soit par digestion enzymatique soit par stress oxydatif et libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'azote (RSN). Les hémocytes jouent également un rôle dans la protection et la réparation des lésions.

La reconnaissance d'éléments étrangers se fait par des molécules de reconnaissance des pathogènes ou PRR. Cette reconnaissance implique des voies de signalisation comme la voie Toll qui est une des voies les plus étudiées. Il y a une dizaine d'année, des molécules de signalisation (IRAK4, TRAF6, IKK/NEMO, IB et RelA/p65) ont été identifiées chez *Euprymna scolopes* (Goodson et al. 2005) à partir de données transcriptomiques issues de l'organe de lumière. Associés à des récepteurs TLR(Toll-like receptors) et à des gènes cibles, ces molécules constituent une voie de signalisation clé dans la réponse immunitaire mais également dans la mise en place de la symbiose entre *Euprymna* et *Vibrio fischeri* (Goodson et al. 2005). Cette même voie de signalisation NF- κ B a été mise en évidence au niveau des glandes nidamentaires accessoires associées à l'appareil reproducteur chez *Sepia officinalis* (Cornet et al. 2015a). Parmi les facteurs identifiés chez la seiche, on retrouve cinq récepteurs apparentés aux récepteurs Toll (TLRs), huit éléments de la cascade de phosphorylation tels que IRAK4, TRAF6, TRAF4 , et REL/NF- κ B, ainsi qu'un gène cible, l'oxyde nitrique synthase inductible.

En plus de tous ces éléments associés à la réponse immunitaire d'origine cellulaire, certaines molécules circulantes qui participent à la réponse humorale ont été identifiées chez les céphalopodes (Castillo et al. 2015). Il y a des molécules comme les lectines ou lectine-like qui possèdent des propriétés d'opsonisation ou d'agglutination (Castillo et al. 2015). Mais également des protéases comme le lysozyme qui possède une activité bactéricide comme décrit dans le chapitre précédent. Le lysozyme a été identifié chez un grand nombre d'espèces y compris chez *Sepia officinalis* au niveau des GSP (Cornet et al. 2014).

En plus des molécules solubles décrites précédemment, des effecteurs du système du complément ont été identifiés. Pour rappel, le système du complément intervient dans la détection d'éléments étrangers et participe à la cohésion entre système inné et adaptatif chez les vertébrés. Chez les invertébrés il y aurait un système « proto-complément ». Il serait moins complexe et reposerait sur 3 éléments : 1. Des molécules de reconnaissance type lectine 2. Une serine protéase capable de reconnaître la formation du complexe et activer le mécanisme d'élimination. 3. Une protéine C3-like, issue de la famille des protéines à Thioester, un effecteur qui se lie à l'élément étranger et permet son élimination (Castillo et al. 2015).

Enfin, concernant les peptides antimicrobiens, rares sont les molécules identifiées (Cornet et al. 2015b) contrairement à ce qui est décrit dans la littérature comme chez les poissons par exemple. Les quelques activités antibactériennes ou anti-oxydantes observées sont soit associées à l'encre (Saleh et al. 2015), aux œufs (Cornet et al. 2015b), ou à la peau (Ezquerria-Brauer et al. 2017) soit associées à des bactéries symbiotiques très présentes chez les céphalopodes (Pernice et al. 2007; Gromek et al. 2016). L'hémocyanine avec la galexine constituent les seules molécules antibactériennes connues à ce jour chez les céphalopodes (Castillo et al. 2015).

2.3. La peau chez les céphalopodes

Bien que des activités antibactériennes aient été décrites à partir d'extraits de peau de *Dosidicus gigas* (Ezquerria-Brauer et al. 2017), aucun PAM n'a été caractérisé jusqu'à présent chez les céphalopodes.

La peau se compose d'un épithélium glandulaire capable de sécréter du mucus. Cet épiderme repose sur le derme riche en fibres de collagène. Au niveau de ce derme, on retrouve les organes chromatophores responsables des changements de pattern de couleurs (Andouche and Bassaglia 2016). Sous ces organes chromatophores, se trouvent les iridophores responsable de l'iridescence en réfléchissant certaines longueurs d'ondes associés aux couleurs rose, bleue ou verte. Il y a par ailleurs les leucophores responsables de la couleur blanche. Le tout repose sur une couche musculaire (Figure 40 une coupe transversale de peau de seiche.)

La peau est capable de cicatriser après amputation d'un bras (Féral 1988; Shaw et al. 2016) ou après une chirurgie visant à enlever un granulome (Harms et al. 2006). les hémocytes lors de ces lésions sont recrutés de manière à éviter la perte d'hémolymph par coagulation et induisent le phénomène de réparation tissulaire (Féral 1988). Toutefois si au niveau de ces lésions des pathogènes sont associés comme *Vibrio tubiashii* (Bullock et al. 1987) ou des champignons du genre *cladosporium* (Harms et al 2006), les soins apportés ne sont que palliatifs.

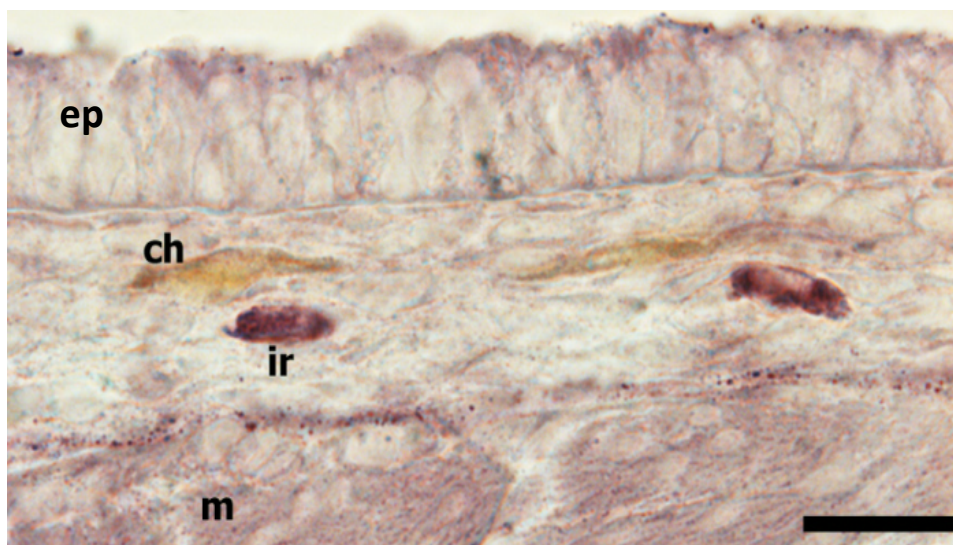


Figure 40 : Coupe transversale de la peau de seiche, *Sepia officinalis*. Ep : épithélium, ch : chromatophore, ir : irridophore, m : muscle. Echelle = 20µm. D'après [Andouche et al., 2016](#).

La peau des céphalopodes secrète du mucus à l'image de celle des poissons ou des amphibiens. L'apparition de lésions au niveau cutané s'accompagne souvent d'une présence accrue de mucus ([Castellanos-Martínez and Gestal 2013](#)). Toutefois une seule étude histochimique porte sur cette sécrétion chez les paralarves d'*O.vulgaris* mettant en évidence la présence entre autres de glycoprotéines et de glycanes sulfatés et non sulfatés ([Accogli et al. 2017](#)).

Même si la peau des céphalopodes est remarquable de par ces capacités de biomimétisme et ses capacités de cicatrisation en moins de 24 heures, tous les acteurs moléculaires restent cependant inconnus notamment ceux associés à la défense immunitaire.

3. Les Objectifs

Si les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire ont été clairement identifiées chez les céphalopodes et notamment chez le seiche *S. officinalis* ([Cornet et al., 2015a](#)) , de nombreux effecteurs ou mécanismes immunitaires demeurent incertains. L'objectif de ce chapitre est d'identifier des molécules antibactériennes chez *Sepia officinalis* par une approche classique à partir de la peau et par une approche originale utilisant les bases de données de PAMs et les transcriptomes disponibles chez *Sepia*.

B. Recherche de peptides antimicrobiens au niveau de la peau

1. Introduction

L'identification de peptides antimicrobiens chez un céphalopode constitue à l'heure actuelle un réel challenge. Il est par ailleurs délicat de prédire si les PAMs chez ces espèces partagent les mêmes caractéristiques que chez les autres modèles. Pour surmonter cet obstacle, l'objectif de cette étude est de mener une approche peptidomique classique. A l'inverse des travaux menés chez *Pterois volitans*, nous n'avons aucune donnée au sujet des PAMs chez la seiche. A partir d'un premier fractionnement par RP-HPLC d'extrait peptidique de peau, les fractions peptidiques présentant une activité antibactérienne sont ensuite analysées par spectrométrie de masse. L'activité antibactérienne des fractions est en fait mesurée à travers leur capacité à inhiber la croissance des bactéries testées. C'est une approche qui a su faire ces preuves et marqué l'histoire des peptides antimicrobiens puisqu'elle a permis l'identification de l'un des premiers PAM, la Gramicidine par [Hotchkiss & Dubos \(1940\)](#). L'activité antibactérienne de la gramicidine avait été observée un an avant par [Dubos & Cattaneo \(1939\)](#) à partir d'une culture de *Bacillus brevis*. Il s'agit d'un pentadécapetide composé d'acides aminés de configuration D et L ([Sarges and Witkop 1965](#)). Par la suite cette approche expérimentale s'est révélée fructueuse pour la découverte de nombreux PAMs. Nous pouvons citer l'exemple de la Melittine ([Fennell et al. 1968b](#)) isolée à partir du venin d'abeille, la Buforine I identifiée à partir des sécrétions de peau de grenouille ([Park et al. 1996](#)) ou encore la moronecidine ([Silphaduang and Noga 2001](#); [Lauth et al. 2002](#)) isolée à partir de la peau et des branchies du bar. Depuis cette méthode est toujours indispensable et cela malgré les progrès technologiques. Cela se vérifie notamment chez les invertébrés marins puisqu'à l'heure actuelle, les PAMs identifiés chez des organismes marins tels que les cnidaires, les arthropodes, les mollusques, les annélides, les tuniciers ou les échinodermes ont été identifiés majoritairement après une purification en HPLC suivie d'une analyse en spectrométrie de masse, pour revue ([Sperstad et al. 2011](#)).

La peau de seiche est le tissu qui a été choisi pour la recherche de PAMs chez *S. officinalis*. Ce tissu joue le rôle de barrière physique entre l'organisme et le milieu extérieur aquatique, il assure probablement une protection chimique à l'image de ce qui a été décrit chez les téléostéens ([Rakers et al. 2013](#)). Chez les céphalopodes, il a également été observé une augmentation de la sécrétion de mucus après l'apparition de lésions ([Castellanos-](#)

[Martínez and Gestal 2013](#)) suggérant une libération accrue de molécules dont probablement des molécules antibactériennes Cette étude vise à identifier des PAMs associées à la peau chez *Sepia officinalis*.

2. Matériel et méthodes

L'ensemble de la méthodologie mise en place pour la recherche de PAMs chez *Sepia officinalis* est reprise dans la [figure 41](#).

2.1. Matériel biologique

Les seiches sont capturées en Baie de Seine par un chalutier professionnel « Père Daniel ». Les animaux sont stockés à la station marine du CREC « Centre de Recherches en Environnement Côtier » à Luc-sur-mer. Les seiches sont disposées dans des bassins d'une capacité de 1000L dans une salle thermorégulée à 17°C. Les bassins sont alimentés en eau de mer en circuit semi fermé.

2.2. Extraction peptidique

La peau est prélevée sur 3 seiches différentes au niveau de la partie dorsale et congelée directement à l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon. L'extrait peptidique est réalisé en milieu acide dans 0,1% de TFA (acide trifluoroacétique) avec un ratio 1 : 10 (v/v), pendant 1 heure à 4°C sous agitation. L'extrait est d'abord filtré à la toile à butter puis centrifugé 20 min à 20 000 g à 4°C. Une colonne SPE C18 (Waters) est utilisée pour dessaler et concentrer l'extrait peptidique. La fraction organique est éluée avec 80% d'ACN (acétonitrile) contenant 0,1% de TFA. Enfin l'échantillon est séché à l'aide d'un speedvac (Thermofisher scientifique)

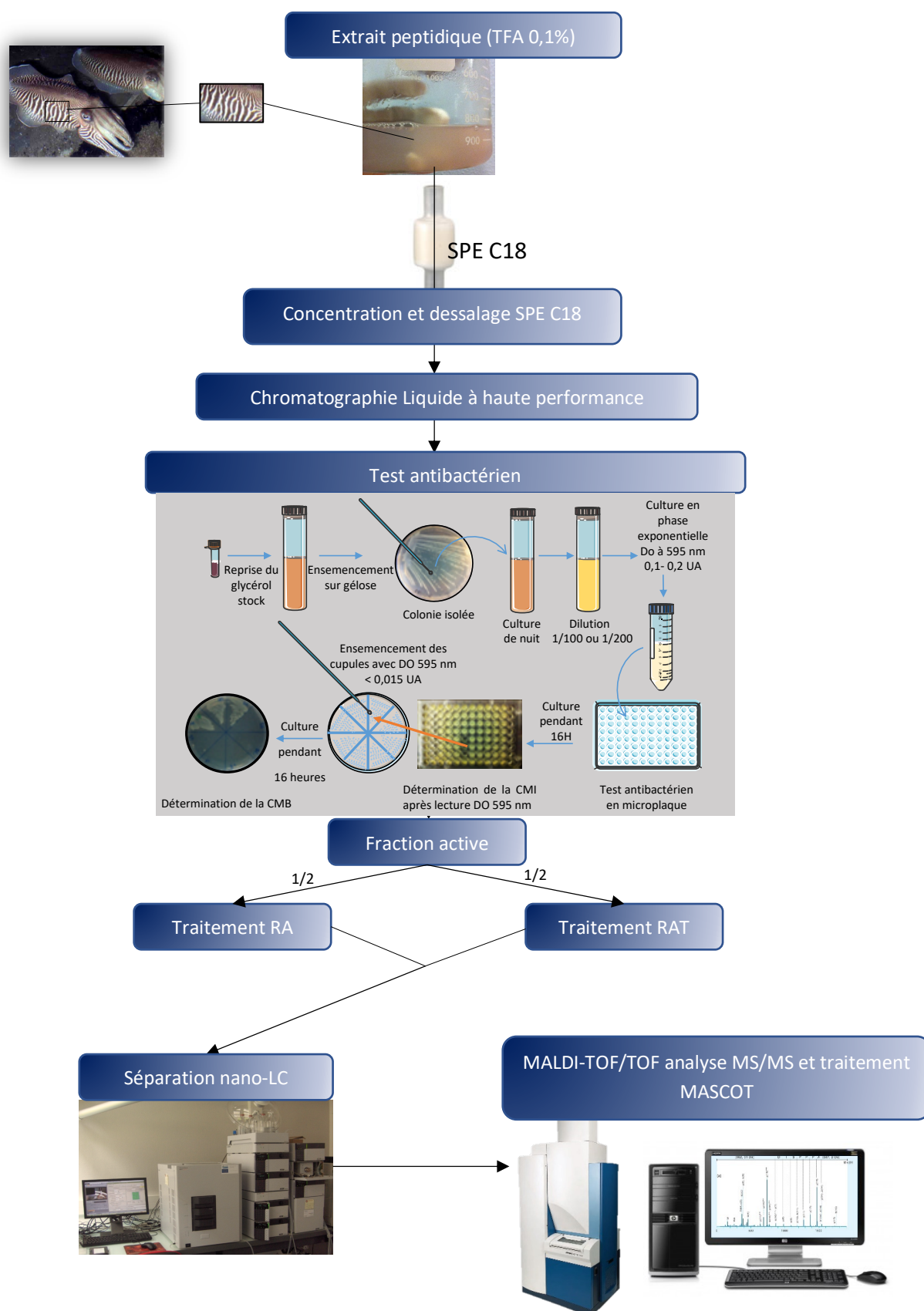


Figure 41 : Méthodologie suivie pour identifier des PAMs chez la seiche, *Sepia officinalis*. CMI : Concentration minimale inhibitrice, CMB, Concentration minimale bactéricide, DO : Densité optique, UA : Unité d'absorbance, LC : Chromatographie liquide, RA : Réduction alkylation, RAT : Réduction alkylation et digestion à la trypsine.

2.3. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Les analyses sont effectuées sur une chaîne VARIAN composée d'une pompe à gradient VARIAN-9012 et d'un détecteur UV-VIS VARIAN-9050. Les extraits peptidiques obtenus à partir de la peau sont injectés sur une colonne Nucleodur 300-5 C18 ec (250 mm x 4 µm) en condition initiale avec un tampon A contenant 0.1% de TFA. La séparation de l'échantillon a été effectuée avec un gradient linéaire de 2% de tampon B (80% d'ACN ; 0.1% de TFA) par minute de 0 à 90% de B et un débit de 1 ml/min. L'acquisition est gérée par le logiciel Masslynx. La liaison peptidique est détectée à 214 nm. Des fractions d'une minute sont collectées automatiquement avec un carrousel (BioRAD 2110 fraction collector). La fraction antibactérienne 34-35 détectée a ensuite été séparée lors d'une seconde étape de purification en condition initiale à 25mM d'Acétate d'ammonium avec gradient linéaire de 2% de tampon C (80% d'ACN ; AcONH₄ 25 mM) par minute de 0 à 20% de C puis un gradient de 1% de tampon C de 20% à 60% de C, avec un débit de 1mL.min⁻¹. A l'issue des séparations en HPLC, les fractions sont séchées au speedvac, et stockées à 4°C.

2.4. Test Antibactérien

La souche bactérienne AQ 3-22 (Une souche appartenant au clade des *Vibrios* fournie par la SATMAR) conservée à -80°C dans des cryotubes (Tube billes Cryosystème Protec) est remise en suspension dans le milieu de culture Marine Broth (Conda). A l'aide d'une anse d'ensemencement la souche est étalée sur milieu gélosé de Marine Broth (Agar : 15g.L⁻¹) de façon à obtenir des colonies isolées. Une colonie est ensuite prélevée et incubée dans du marine broth liquide et placée une suit sous agitation à 25 °C. La culture de nuit est utilisée pour ensemencer au 1/100 et 1/200 du milieu liquide de façon à obtenir des cultures en phase exponentielle de croissance ($0,08 < DO_{600nm} < 0,2$).

Chacune des fractions d'HPLC est reprise dans 25µL d'eau ultrapure. Les fractions sont ensuite déposées en duplicat dans des microplaques 96 puits (NUNC), chaque puits reçoit donc 10µL de fraction. Les 5 µL restant seront utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le test antibactérien est effectué selon la méthode décrite par [Hetru et Bulet \(1997\)](#). La culture bactérienne en phase exponentielle est diluée au 1/1000 de DO dans le milieu de culture appauvri SPB « Saline Poor Broth » (peptone : 10g.L⁻¹ ; NaCl : 15g.L⁻¹). Cent microlitres de suspension bactérienne sont déposés dans chacun des puits. Par ailleurs, certains puits sont utilisés pour les témoins de croissance bactérienne (10 µL

d'eau stérile et 100 μL de suspension bactérienne), les témoins d'inhibition de croissance en présence d'oxytétracycline ($1\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) et des témoins de stérilité (10 μL d'eau stérile et 100 μL de SPB). Après 16H d'incubation à 20°C sous agitation (200 rpm), l'absorbance à 595 nm (mesure de turbidité) est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (model 680, BioRAD). La mesure d'absorbance permet de déterminer la croissance bactérienne dans chaque puits et donc d'identifier les fractions capables d'induire une inhibition de croissance. Cinq microlitres des fractions présentant une activité antibactérienne sont ensuite déposées sur des gélases et incubées à 25°C pendant 24h afin de déterminer si les fractions présentent une activité bactéricide ou non.

2.5. Réduction, alkylation et digestion trypsique

Les fractions antibactériennes ont subi une réduction et une alkylation. La moitié de chacune des fractions a ensuite subi une digestion par la trypsine. Les échantillons sont réduits par chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM contenant 25 mM de DTT. Puis, peptide/polypeptides ou petites protéines sont alkylées par incubation pendant 20 minutes à l'obscurité dans un tampon iodoacétamide 55mM. Ensuite, la moitié du volume de chaque échantillon a subi une digestion trypsique pendant une nuit à 37°C dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 6 ng.L^{-1} de trypsine. L'analyse en nano-LC-MS/MS a été réalisée sur l'ensemble de la fraction réunie composée à la fois de molécules réduites et alkylées et de molécules réduites alkylées et digérées.

2.6. Séparation en Nano-LC (Liquid-Chromatography)

Les fractions réduites, alkylées et partiellement digérées à la trypsine ont été séparées en chromatographie liquide à très faible débit, sur un système nano-LC (Prominence, Shimadzu). Les peptides issus de chaque fraction sont dans un premier temps concentrés sur une pré-colonne Zorbax C18 (5 x 0.3 mm ; Agilent Technologies) avant d'être séparés sur une colonne Zorbax C18 (150 x 75 μm , Agilent Technologies). Les phases mobiles sont composées d'un mélange EPPI/TFA (99.9%/0.1%, v/v) (Phase A) et d'un mélange ACN/TFA (99.9%/0.1%, v/v) (Phase B). L'échantillon est élué selon le gradient suivant : 2% de B pendant 5 min, augmentation de la quantité de B de 2% à 5% en 1 min, passage de 5 à 32% de B en 144 min puis de 32 à 70% en 10 min et enfin de 70 à 90% en 10 min avant le retour à 2% de B en 10 min. Le débit est fixé à 300 nl/min. Ce volume est mélangé avec une solution de matrice CHCA (Acide-cyano-4-hydroxy cinnamique à 5 mg/ml ;

EPPI/ACN/TFA (49.9%/50%/0.1%, v/v/v)) présentant un débit de 1.2 µl/min. Des fractions de 20 s sont déposées automatiquement sur une cible Opti-TOFTM384 spots par un robot AccuSpot (Shimadzu).

2.7. Analyse en spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées sur un instrument ABSciex 5800 équipé d'une source MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), d'un analyseur TOF TOF et d'un laser OptiBeam™. L'appareil est calibré, avec une précision supérieure à 50 ppm, avant chaque analyse avec un mélange de 5 peptides (des-Arg-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38)).

Les analyses sont réalisées en mode automatique avec les paramètres suivants :

- Les spectres MS sont acquis en mode réflecteur positif avec une intensité de laser de l'ordre de 3700 en sommant 1000 spectres indépendants (5 x 200) dans la gamme de masse 700 à 4000 m/z.
- Les spectres de fragmentation sont réalisés avec une intensité de laser de 4300, en mode MSMS réflecteur positif, en sommant 2500 spectres (10 x 250). L'air est utilisé en tant que gaz de collision.

La recherche en banque, pilotée par le logiciel Mascot 2.6.1 (Matrix Science), est réalisée sur la base des fragmentations obtenues en MSMS en utilisant une banque issue d'analyse transcriptomique de *Sepia officinalis* (352862 séquences). Les modifications « non fixes » sélectionnées pour l'identification sont les suivantes : amidation C-terminale et pyroglutamate N-terminal, oxydation et dioxydation des méthionines, carbamidométhylation des cystéines et acétylation des lysines. Le paramètre « no Trypsin » est sélectionné. L'erreur de masse est fixée, pour la MS et la MSMS, à 200 ppm et 0.6 Da respectivement.

2.8. Traitement Bio-informatique

Les résultats d'identification MASCOT sont transférés dans le logiciel IRMA ([Dupierris et al. 2009](#)) Ils sont filtrés sur la base d'un seuil de significativité <0.05 et l'élimination des protéines redondantes en fonction des mêmes ensembles et sous-ensembles de peptides. Chaque séquence peptidique est ensuite vérifiée manuellement afin de valider ou non les

propositions faites par les alignements MASCOT. Les séquences ne présentant pas une correspondance satisfaisante sont éliminées.

3. Résultats

Le chromatogramme visible dans la [figure 42.A](#) illustre le profil peptidique UV obtenu à partir de l'échantillon de peau de seiche. Les 35 fractions de la 4ème à la 38ème minute ont été testées sur la souche AQ 3-22. Parmi ces 35 fractions, deux d'entre elles ont inhibé la croissance bactérienne de la souche AQ 3-22. Il s'agit des fractions consécutives 34 et 35 dont les temps de rétentions respectifs sont 34 et 35 minutes éluées entre 54.4 et 56%

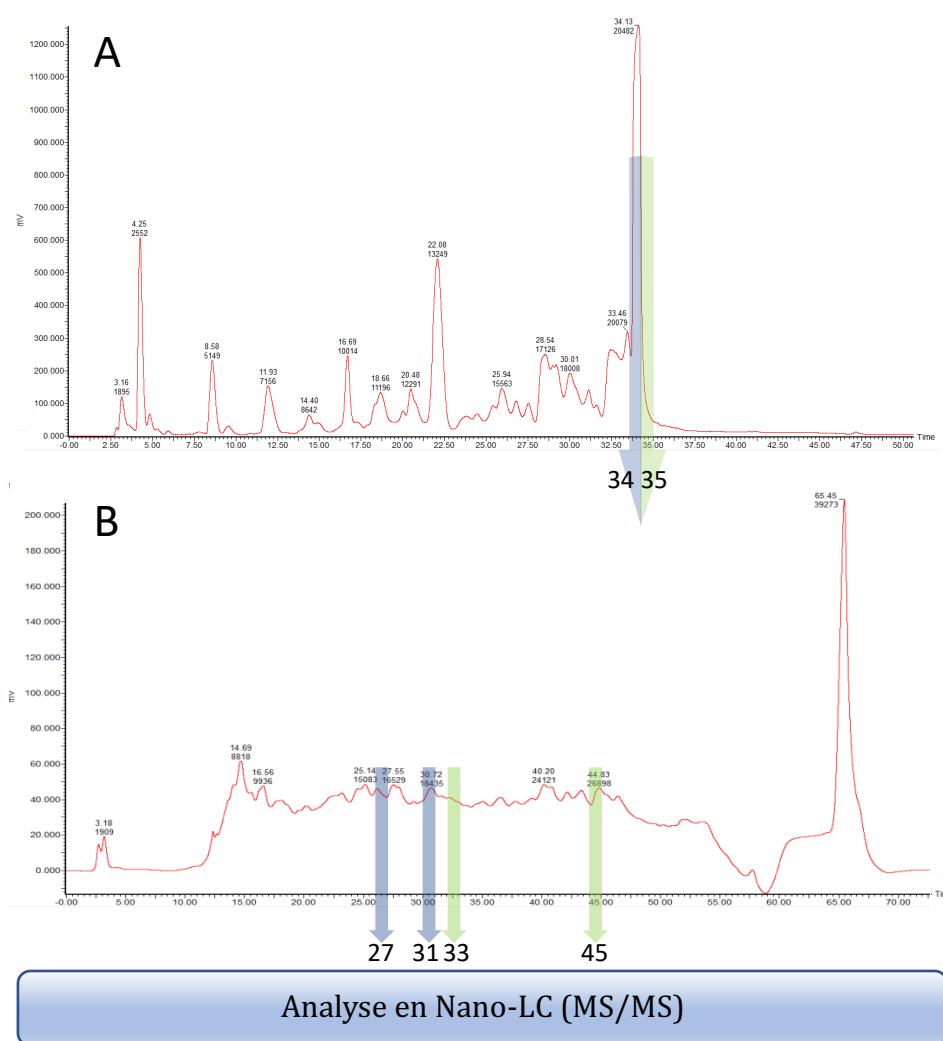


Figure 42. Chromatogrammes UV (214 nm) obtenus à partir d'un extrait peptidique de peau de seiche. (A) Chromatogramme de la 1^{ère} étape de séparation (B) Chromatogramme UV de la 2^{ème} étape de séparation des fractions antibactériennes 35 et 36. Les flèches bleues représentent les fractions antibactériennes bactéricides et les flèches vertes les fractions antibactériennes bactériostatiques.

d'ACN. Par ailleurs, le dépôt sur gélose de ces deux fractions a permis de mettre en

évidence un effet bactéricide pour la fraction 34 et un effet bactériostatique pour la fraction 35. Au vue de la complexité des deux fractions, l'analyse en spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier le ou les peptides responsables de l'activité antibactérienne. Une seconde étape de purification en HPLC a été réalisée à partir des fractions 33, 34 et 35 réunies [figure 42.B](#). Les fractions de la minute 12 à la minute 68 ont été testées sur la souche AQ 3-22. A l'issue de ce test, quatre fractions ont inhibé la croissance bactérienne : les fractions 27, 31, 33 et 45 éluées respectivement avec 29.6, 40.8, 42.4 et 52% d'ACN. Les fractions 27 et 31 après avoir été déposées sur du milieu de culture gélosé se sont révélées bactéricides, fractions 33 et 45 étant bactériostatiques. Les analyses en spectrométrie de masse de chacune des fractions ont permis de détecter un nombre très important de peptides différents, pour la fraction 27 607 peptides, la fraction 31 490 peptides, la fraction 33 11 peptides et la fraction 45 639. L'analyse globale de ces peptides révèle qu'ils sont issus de 348 précurseurs différents. La majorité de ces peptides sont issus de protéines de structure comme la tubuline, la myosine ou l'actine, d'enzymes comme la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, des sous-unités de l'ATP synthase, la topoisomérase... [Tableau 11](#). Un peptide issu de l'histone H2b a été identifié dans la fraction 45 et plusieurs peptides issus de l'hémocyanine ont été caractérisés au niveau des fractions 27, 31 et 45, [Figure 43](#).

Tableau 11. exemple de précurseurs protéiques contenant les peptides détectés dans les fractions actives par les analyses en spectrométrie de masse.

PF31	PF33	PF45	PF27	Précurseurs protéiques
X	X	X	X	actine I
X			X	actine II
X		X	X	hémocyanine sous-unité 3
X			X	alpha tubuline 2
X		X	X	hémocyanine subunit 2
X			X	hémocyanin subunit 1
X		X		glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
X				elav protéine (elav2 gène)
X		X	X	unknown
X			X	aminopeptidase
X				peroxiredoxin 5
X				calpaine-B-like
X		X		troponine C
X		X	X	unknown
X				phosphoglycérate kinase 1
X				DAZ-associated protein 2
X		X		argininosuccinate synthase
X				malate déshydrogénase
X				small nuclear ribonucléoprotéine
X		X		peptidyl prolyl cis trans isomérase A (PPIA)
X			X	mannose-6-phosphate isomérase-like
X				ATP synthase
X				baculoviral IAP repeat-containing
X				phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
X				prolyl 4-hydroxylase subunit beta (P4hb)
X				protein lingerer-like
X				polyadenylate-binding protein
X				14-3-3 protein epsilon
X				disks large homolog 2-like
X			X	peptidyl-prolyl cis-trans isomérase
X		X		MAPK-interacting and spindle-stabilizing
X				protéasome sous-unité beta type-6
X				glucose-6-phosphate isomérase
X				eukaryotic translation initiation
X				retinal déshydrogénase 1
X				tubuline
X				péroxirédoxin 1
X			X	Histone H2B
X				pyruvate kinase PKM-like
X			X	troponine C type 1
X				copine 4 (CPNE4)
X				NADH-cytochrome b5 reductase 3
X	X			dynéine cytoplasmique1
X	X			septine-1-like
X				topoisomérase

4. Discussion

Cette approche classique a permis de mettre en évidence des molécules antibactériennes au niveau de la peau, capables d'inhiber ou de tuer la souche AQ 3-22. La complexité des échantillons n'a pas permis de déterminer le ou les peptides d'intérêt.

Toutefois, les peptides issus de l'histone H2B ainsi que de l'hémocyanine pourraient constituer des candidats intéressants **Figure 43**. En effet, de nombreux peptides issus des

```
>TR62360|c9_g11_i1 histone H2B [Sepia officinalis]  
KKKRRKRKESYSIYIKVMQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDLFERIASESSRLAHYSKRSTISSREVQTAVRLLL  
PGELAKHAVSEGTKAVTKYTSNK  
  
TR57344|c6_g1_i2 actine II [Sepia officinalis]  
MDDEVAALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPPSIVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI  
VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRITG  
IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRIDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFDQ  
EMQTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERERAPEAMFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS  
GGSTMFPGIADRMQKEISALAPATMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF  
  
>ABD47515.1 hémocyanine sous-unité 1 [Sepia officinalis]  
MRHLNHLPLLYLTLVILTFWMSGLDVTYVGKLRKNVDTLSDHEILNLQIALLRNMQDDEGATGYQAISAYHGEPADC  
KAADGSQIVC.....INRGSPIGVPYW.....AAFHGSTKWCPSPDAAQKYACCHHGMATFPWHRLTL.....NFENGL  
RRNGYSGGIPYWDWTRPIE.....VVQFEQALHRHGATVGVPYWDWTPMKEVPHLLTSEKYTDPTFGVETFNPENH  
GHLSFISPETMTTRDVSEHLFEQPALGKQTLFNNILLALEQTDYCDFEVQFEIVHNAIHSWLGGKEIYSLNHLH  
YAADPAFYLLHHSNVDR...  
  
>TR59330|c1_g1_i2 hémocyanine sous-unité 2 [Sepia officinalis]  
VDRLSLQEVNSLVHALKRMQKDRSSDGFESIASFHALPPLCPNPTAKHRYACCLHGMATFPQWHRLYVVQFEQSL  
NRHGATVGVPYWDWTPMKEVPHLLTSEKYTDPTFGVETFNPFNHGHLSFISPETMTGRDVSEHLFEQPALGKQ  
WLFNNILLALEQTDYCDFEVQFEIVHNAIHTWLGGKEIYSLNHLHYAADPAFYLLHHSNVDRLLWVWQELQKFRG  
FSAYESNCAIELMSQPLKPFSSFGAPYNLNPMTTKYSKPSDVSFYKEHFHYEYDMLMNGMSIAQLESYIRQEKQK  
DRVFAGFLLEGFGSSATATFQICPDSGDCHEGSHESVLGGSAMPWAFDRLYKMEITDILHDMKLNFDSTHTIKT  
KVVAQNGTELPESILPEATIIIRIPSSHDLEVAIPLNRIIRDINSLETRDVQNLMSALKRLKDDSDFGFQTIAS  
YHGSLLCPTPDAPQYACCLHGMPTFPWHHRVYLLHFEEAMRRHGASVAIPYWDWSMPSSHLPALLGDAAYDAWT  
DSVIENPFLRGYIKQEDTYTVRDIQQELFHLSEGGKESTLFKKAMLMFEQEDYCDFEVQFEVIHNSIHYLIGGHQ  
KYAMSSLVYSSFDVPFVYVHSMVDRLWAIWQDLQYRKLPHNKAYCALDEMSPMPKPFIWESNPNPATRAVSTPN  
KLDFDKSLGYNNDLDFHGMDDTAHLEAAIKKQKQKDRVFAGFLLHGIKTSADVHLKVCNAADCHEAGVVFLGGE  
TEMPWHFDRNYKMDITDVLHEMHIPMEALFEHDSKIHLVEIQSVGDGAILDSHSLPTPSLIYAPAKGLVSGHIED  
HDTETLIRKNVNSLSPSEIKNLRDALVAVQADKSGNGYQKIASYHGMPLSCHYPNGTAFACQHGMTFPHWHRL  
YMKQMEDAMKAKGAKIGIPYWDWTTTFSHLPFLVTEPKNNPFHHGYIDVADTKTTRNPRQLEDDPEQGDQSFFY  
RQIAFALEQRDFCDFEIQFEMGHNAIHSWVGGSSPYGMSTLHYTSYDPLFYLLHHSNTDRIWAIWQALQKYRGLPY  
NSANCEINKLKKPMPFSSDDNPNEVTKAHSTGTSFDYHELNYEYDNLNFHGMTIPQLEVHLNKIQEKDRVEAG  
FLLRAIGQSADVNFDICRKDGECKFGGTECVLGGQHEMAWAFDRLFLYDISRTLLQLRLDAHDDFDVKVTIMGID  
GKSLPTLLPPTILFKPGTGTQLTR
```

```
> TR59330|c1_g4_i2 hémocyanine sous-unité 3 [Sepia officinalis]  
...NFENGLRRNGY...PYWDW...VVQFEQALHRHGAIVGVPYW...WDWTTAFSSLPALLVTDTKNNPEHHAHIDVANTDT  
TREPRPQLFEDPEQGDQSFFYRQIAFALEQTDFCDFEIQFEIGHNAIHSWVGGSSPYGMSTLHYTSYDPLFYLLH  
SNTDRIWAVWQALQKYRGLPYNSANCEINKLKKKLMPFSSEENHNVEKHAHSTGFKSFDYHQLHYDYDNLNFHGM  
TIPQLDNHLKKYQEKDRVFAGFLLRTIGQSADVNFVCRKDGKCTFGGTFAILGGQHEMFWAFDRLFLYDISKSL
```

Figure 43 : Illustration de peptides repositionnés au sein de leur précurseur respectif qui ont été détectés par les analyses en spectrométrie de masse à partir des fractions HPLC actives. Les peptides choisis pour l'illustration appartiennent à l'une des 3 sous-unités de l'hémocyanine, de l'histone H2B ou de l'actine II.

histones possèdent une activité antibactérienne comme la buforine isolé chez le crapaud *Bufo bufo* (Park et al. 1996). Chez les poissons, ces peptides issus de l'histone sont d'ailleurs considérés comme une catégorie de PAMs à part entière (Masso-Silva and Diamond 2014).

Chez les céphalopodes, l'hémocyanine a été décrite pour ses fonctions dans la défense immunitaire (Castillo et al. 2015). Des études plus anciennes avaient montré, en se reposant sur des techniques d'immunohistochimie la présence et la synthèse d'hémocyanine au niveau des cœurs branchiaux chez *S. officinalis*, *L. brevis*, *Eledone moschata* et *Octopus vulgaris* (Beuerlein et al. 2002; Castillo et al. 2015) et dans la glande de l'intestin moyen chez *Nautilus pompilius* (Ruth et al. 1999). Kremer et collaborateurs (2014) ont montré que l'hémocyanine avait un effet antibactérien sur plusieurs de souches bactériennes à gram négatif ou positif, a bactérie la plus sensible étant *V. azureus*. L'hémocyanine chez *E. scolopes* semblerait jouer un rôle dans la respiration mais

Tableau 12. potentiel antibactérien selon CAMP des peptides issus de l'hémocyanine et de l'histone H2B de *Sepia officinalis*.

Séquences testées	SVM	Probabilité	RF	ANN	Probabilité	DA	Probabilité
FERIAESSRLAHY	NAMP	0.024	NAMP	NAMP	0.111	NAMP	0.134
VIDNGSGMCKAGF	NAMP	0.259	AMP	NAMP	0.428	NAMP	0.107
AGDDAPRAVF	NAMP	0.030	AMP	NAMP	0.3585	NAMP	0.000
PSIVGRPR	NAMP	0.050	NAMP	NAMP	0.387	NAMP	0.000
HQGVMMVGMGQKDS	NAMP	0.000	NAMP	NAMP	0.113	NAMP	0.184
YVGDEAQSKRGITLK	NAMP	0.053	NAMP	NAMP	0.1735	NAMP	0.246
GIVTNWDDMEKIW	NAMP	0.009	NAMP	NAMP	0.248	NAMP	0.402
RVAPEEHPVLL	NAMP	0.001	NAMP	NAMP	0.2515	NAMP	0.014
YALPHAILRL	AMP	0.586	AMP	NAMP	0.4765	NAMP	0.151
ELPDGQVITIGNERF	NAMP	0.012	NAMP	NAMP	0.249	NAMP	0.373
LRNMQDDEGATGY	NAMP	0.001	NAMP	NAMP	0.0705	NAMP	0.026
HGEPADCKAADGSQIVC	NAMP	0.014	NAMP	NAMP	0.1815	NAMP	0.224
INRGSPIGVPY	NAMP	0.290	AMP	NAMP	0.255	NAMP	0.267
NFENGLRRNGYS	NAMP	0.025	AMP	NAMP	0.2235	NAMP	0.105
GGIPYWDWTRPIE	NAMP	0.005	NAMP	NAMP	0.288	NAMP	0.148
SEKYTDPTGVETFPNF	NAMP	0.089	NAMP	NAMP	0.076	NAMP	0.210
VVQFEQSLNRHGATVGVPYWD	NAMP	0.039	NAMP	NAMP	0.0425	NAMP	0.069
VETFPNPNHGHLS	NAMP	0.073	NAMP	NAMP	0.0175	NAMP	0.097
ATFQICPDSDGDCHEGSHF	NAMP	0.272	NAMP	NAMP	0.086	NAMP	0.119
YKMEITDILHDMK	NAMP	0.006	NAMP	NAMP	0.083	NAMP	0.009
IRKNVNSLSPSEIKNLRDAL	NAMP	0.293	NAMP	NAMP	0.4395	AMP	0.504
VAVQADKSGNGYQKIASY	AMP	0.761	NAMP	NAMP	0.33	AMP	0.503
VTFFPHWH	NAMP	0.003	NAMP	NAMP	0.3105	NAMP	0.011
YMKQMEDAMKAKGAKIGIPYWD	NAMP	0.028	NAMP	NAMP	0.2925	NAMP	0.060
VTEPKNNPFHHGYI	NAMP	0.123	NAMP	NAMP	0.0175	NAMP	0.136
DVADTKTTRNPRQLF	NAMP	0.249	NAMP	NAMP	0.159	NAMP	0.019
EMGHNAHSW	NAMP	0.001	NAMP	NAMP	0.3835	NAMP	0.078
NKIQEKDRVF	NAMP	0.003	NAMP	NAMP	0.2905	NAMP	0.007
RAIGQSADNVF	NAMP	0.038	NAMP	NAMP	0.1605	NAMP	0.151
DICRKDGECKFGGTF	NAMP	0.091	AMP	NAMP	0.2985	NAMP	0.009
NFENGLRRNGY	NAMP	0.073	AMP	NAMP	0.2045	NAMP	0.122
YVVQFEQALH	NAMP	0.002	NAMP	NAMP	0.2805	NAMP	0.133
LVTDTKNPNF	NAMP	0.012	NAMP	NAMP	0.2935	NAMP	0.125

NAMP : non prédit pour être antibactérien, AMP : probabilité pour être antibactérien, SVM : Support vector machine, RF : Random forest, ANN : artificial neural network, DA : Discriminant analysis. Probabilité : valeur comprise entre 0 et 1, dont 1 est la valeur maximale attribuée.

également dans la mise en place ou le maintien de la symbiose avec *V. fisheri*. (Kremer et

al. 2014). Chez les crevettes Pénéides, l'hémocyanine peut être à l'origine de PAMs comme le PvHCT aux propriétés antifongiques (Destoumieux-Garzón et al. 2001). Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure l'existence de molécules antibactériennes atypiques ou des peptides tout à fait originaux au niveau de la peau de la seiche. Enfin, Le potentiel antibactérien des peptides appartenant à l'hémocyanine et à l'histone H2B a été testé avec l'utilitaire proposé par CAMP (Hanif Waghu et al. 2016). Les prédictions n'ont pas permis de mettre en évidence de peptides ayant un potentiel antibactériens [Tableau 12](#). Pour ces raisons une autre approche permettant d'identifier des PAMs chez la seiche, *Sepia officinalis* a été menée.

C. Recherche de PAMs chez *Sepia officinalis* : étude *in silico*

1. Introduction

Des difficultés ont été rencontrées pour identifier des PAMs au niveau de la peau de *Sepia officinalis* par des approches peptidiques classiques. Cette difficulté est assez courante chez les organismes marins invertébrés (Sperstad et al. 2011), elle peut s'expliquer par la complexité des échantillons ou par la faible quantité de peptides présents. Cela a été observé notamment pour la Dolastatine 10. Cent kilos de lièvre de mer ont été nécessaires pour obtenir 3mg de ce peptide.(Pettit et al. 1987). L'identification de PAMs à partir de la peau d'un invertébré marin constitue encore un challenge à relever, la majorité des PAMs découverts chez les invertébrés marins ayant été obtenu à partir de l'hémolymphe, de fluides coelomiques ou d'hémocytes ou coelomocytes (Sperstad et al. 2011).

Une alternative à cette approche classique est d'isoler et de séquencer les ADNc présentant des homologies avec des transcrits codant pour des PAMs bien caractérisés chez d'autres espèces. Cela fut efficace notamment pour identifier les pleurocidines (Patrzykat et al. 2003) ou les défensines chez les poissons (Masso-Silva and Diamond 2014). Toutefois, cela limite le champ de recherche à des PAMs ou des familles de PAMs bien connus. Pour une espèce appartenant aux Céphalopodes, la tâche apparaît d'autant plus ardue qu'aucun PAM n'a été découvert à l'heure actuelle au sein de ce taxon.

La recherche de PAMs peut se faire par des approches *in silico*, en utilisant des outils comme BLAST (Basic Alignment Search Tool), ce qui constitue une alternative de plus en plus prise (Fedders and Leippe 2008; Sharma et al. 2015; Gautam et al. 2016). Cependant, un tel outil reste inefficace pour rechercher des PAMs chez *Sepia officinalis*.

Aucune séquence issue du transcriptome de *Sepia officinalis* ne présente d'homologies avec des PAMs connus chez d'autres organismes. L'utilisation des motifs communs aux peptides d'une même famille de PAMs n'a pas permis par ailleurs l'identification de PAMs, ces motifs pouvant être associées aux cystéines dans le cas de défensines ou de séquences de 4 à 5 acides aminés bien conservées comme cela a été le cas pour identifier les pterocidines B et C. Afin d'obtenir un nombre de candidats importants pour permettre un transfert en éclosion, nous avons adopté une autre stratégie visant à rechercher dans la base de données de seiche des séquences pouvant avoir un potentiel antibactérien sans avoir une véritable réalité physiologique. Cette stratégie reposant sur deux faits : 1) la possibilité de créer des PAMs comme cela a été démontré pour le peptide K4 (Duval et al. 2009) et 2) l'existence de PAMs générés à partir de protéines de structure comme l'histone (Hirsch 1958). Afin de déterminer les candidats potentiels, nous avons exploité les bases de données dédiées aux PAMs en particulier APD (Antimicrobial database) (Hanif Waghu et al. 2016) et CAMP (Collection Of Antimicrobial Peptide) (Wang et al. 2016). APD répertorie uniquement les PAMs validés expérimentalement et identifiés majoritairement à partir d'organismes issus du règne animal. CAMP est une base de données plus généraliste, regroupant des PAMs validés ou non validés expérimentalement, associant plusieurs outils dont une application permettant d'évaluer le potentiel antibactérien d'une séquence (Hanif Waghu et al. 2016). Ces deux bases de données constituent le point de départ pour notre recherche de PAMs chez la seiche.

2. Méthode

Dans un premier temps nous avons déterminé des critères de sélection à partir des PAMs répertoriés dans APD en ciblant particulièrement les PAMs entre 11 et 25 Acides aminés sans cystéine. La majorité des PAMs se situe dans cette gamme de longueur (41% à partir des données APD). Par ailleurs nous nous sommes focalisés sur les PAMs dépourvus de cystéine de manière à éviter des obstacles par rapport à leur configuration tridimensionnelle. A partir de cette liste de peptides comprenant 811 séquences (annexe tableau 2), nous avons analysé les séquences afin de déterminer la présence de tel ou tel acide aminé et/ou la présence de motifs récurrents.

Sur les 811 PAMs sans cystéine, nous avons observé la présence récurrente d'acides aminés hydrophobes dont particulièrement la leucine (15.8%), l'isoleucine (8.8%) et l'alanine (8.6%), la présence de la Glycine (11.5%) et la présence d'acide aminé basique

comme la lysine (11,2%). Ces acides aminés sont souvent associés à un autre acide aminé de manière à constituer un doublet récurrent comme VI, KA, FL, GL, KL LK, LL qui sont présent dans au moins 10% des 811 peptides (annexe tableau 2).

A l'aide de ces données, nous avons exploré les données transcriptomiques de *Sepia officinalis* en utilisant Peptraq. Il s'agit d'un logiciel développé en interne au sein de notre équipe permettant de rechercher à partir d'une base de données génomiques transcriptomiques ou protéiques des séquences particulières en fonction de critères structuraux comme la taille, la charge, la richesse en AA, ou des motifs particuliers...

Nous avons ainsi sélectionné une centaine de séquences ou peptides candidats selon le cahier des charges suivant:

- Entre 15 et 25 AA
- Sans cystéine
- Avec un ou deux motifs comprenant:
 - ❖ Soit un ou deux acide(s) aminé(s) hydrophobe(s) (VI, KA, FL, GL, KL LK, LL) retrouvés dans plus de 10% des 811 PAMS analysés
 - ❖ Soit une succession d'au moins 2 acides basiques (K,R)
 - ❖ Soit des motifs retrouvés au sein de piscidines IF, FI, HI

L'ensemble de ces peptides a été analysé sur CAMP à partir de l'utilitaire de prédiction et 12 peptides ont retenu notre attention (tableau 13) et ont fait l'objet d'une synthèse pour une validation sur des tests antibactériens, Pipeline figure 44. Parmi ces peptides, nous avons sélectionné neuf séquences prédites comme antimicrobiennes, deux séquences potentiellement non antimicrobiennes et 1 séquence avec des prédictions mitigées.

Tableau 12. Selected peptides from cuttlish database

Name	Sequence	Residues number	Molecular weight	Total hydrophobic ratio	Total net charge	CAMP prediction
FI ₁₆	FIFHIIRFFNFRVFRI	16	2173	68%	3	AMP
KG ₁₇	KIFDAEILLNGKRKGLG	17	1873	41%	2	AMP
FK ₁₉	FIKIFHHIFKGNPKFSIK	19	2309	47%	4	AMP
KT ₁₉	KIRFTRTVSRLLKAALAST	19	2132	47%	5	AMP
AT ₂₀	AKAFKKAFEKLAAVVPFGGT	20	2081	55%	3	AMP
FD ₂₀	FFHHIFDPQIKSGLLVSMYD	20	2388	45%	-1	NAMP
GT ₂₀	GKSNKPALTLIQARILKHKT	20	2218	35%	5	AMP
VA ₂₀	VILTRFRFLNRIVEPLLKKA	20	2428	55%	4	AMP
GR ₂₁	GSTSFHLYNKWFAVKRRRKR	21	2651	33%	7	AMP

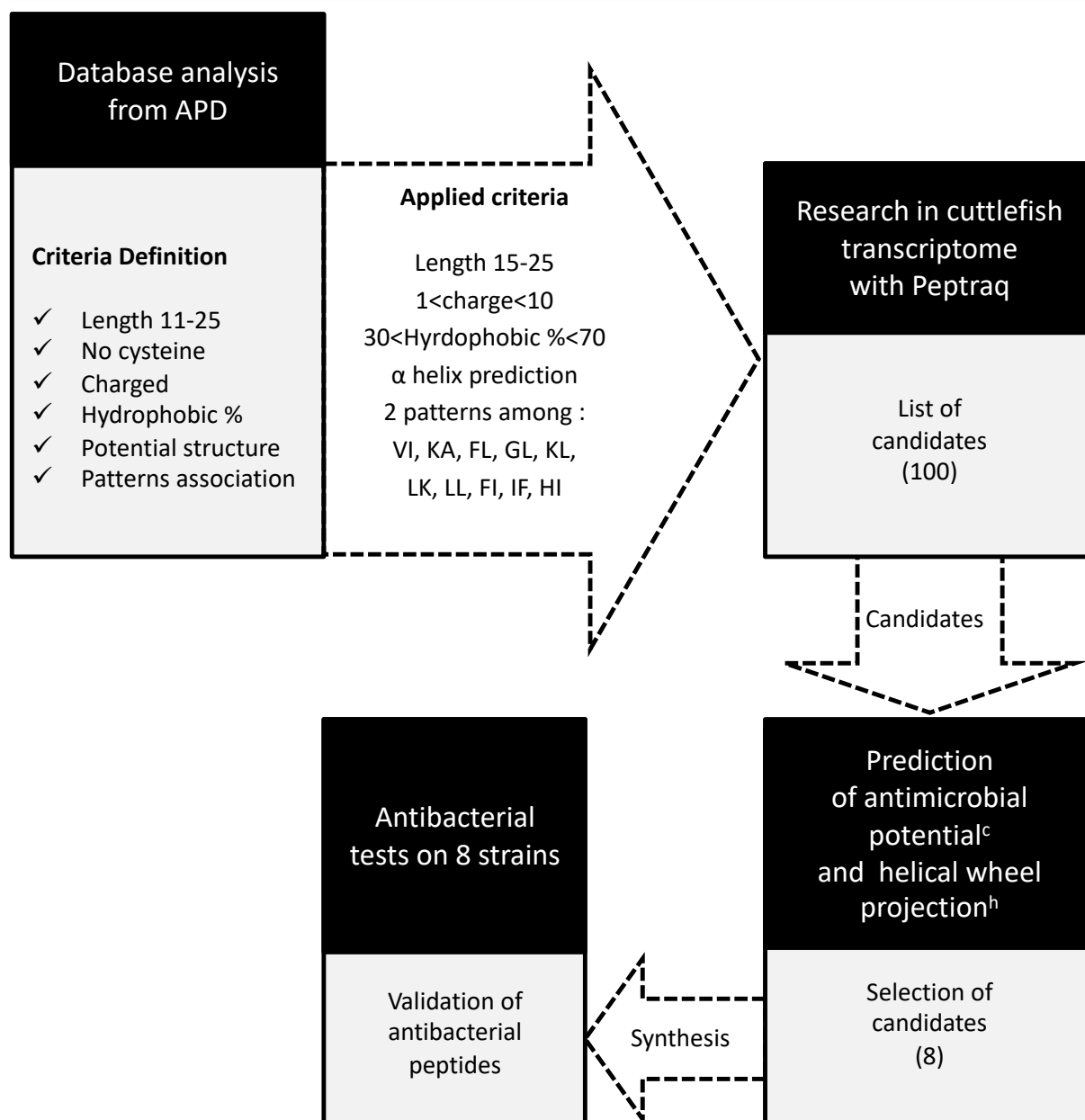


Fig. 44 Pipeline of the global methodology used to select potentials antibacterial peptides in the cuttlefish transcriptome. ^cCAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>), ^hHeliquist (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/>).

3. Résultats

L'intégralité des résultats n'est pas présentée dans cette partie, certaines séquences devant rester confidentielles.

3.1. « Design » de Peptides antimicrobiens chez *Sepia officinalis*

Cette partie porte sur 9 des peptides sélectionnés FI₁₆, KG₁₇, FK₁₉, KT₁₉, AT₂₀, FD₂₀, GT₂₀, VA₂₀, GR₂₁.

Les résultats ont été intégrés dans une publication en cours de soumission dans la revue internationale "Amino acids ". Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

Aucun peptide antimicrobien (PAM) n'a été identifié, à ce jour, chez un céphalopode ni par une approche classique, ni par l'annotation par BLAST de transcriptomes ou de génomes disponibles. Afin de disposer de nouveaux antimicrobiens, nous avons recherché dans le transcriptome de la seiche des séquences potentiellement antibactériennes. A partir des bases de données APD, nous avons analysé tous les PAMs de 11 à 25 AA sans cystéine ce qui nous a permis d'établir des critères de choix. Ces derniers (taille, charge, hydrophobicité, richesse en acides aminées, présence de motifs récurrents) ont été utilisés pour mener une recherche ciblée à l'aide de Peptraq sur la base de données de *S. officinalis*. Parmi une centaine de séquences obtenues à l'issue de cette recherche, 9 peptides ont été synthétisés, huit de ces peptides étant potentiellement antimicrobien selon l'utilitaire de prédiction de CAMP. Ces peptides de 16 à 21 acides aminés ont une charge nette allant de 2 à 7 et avec une structuration possible en hélice α . Si certaines séquences sélectionnées ne présentent aucune homologie avec des peptides connus, certaines présentent des similitudes avec l'extrémité N-terminale des piscidines ou avec le BMAP-27 issu de la cathélicidine de *Bos taurus*. A l'issue des tests réalisés sur 8 bactéries à Gram négatif ou positif, seuls deux peptides KT₁₉ et GR₂₁, se sont révélés antibactérien sur l'ensemble des souches testées avec des CMI <10 μ M sur *Escherichia coli* et *Bacillus megaterium*. Trois autres peptides FK₁₉, FD₂₀ et VA₂₀ ont montré des activités ciblées sur une ou deux souches à de fortes concentrations. Sur des érythrocytes humains, les peptides KT₁₉ et GR₂₁ ont présenté moins de 10% d'hémolyse pour des concentrations >100 μ M. Des effets hémolytiques ont été observés pour les peptides FK₁₉ et VA₂₀, FK₁₉ induisant plus de 40% d'hémolyse à partir de 50 μ M. Bien que cette étude ait permis d'identifier de nouveau antibactérien, elle met en évidence les limites des outils de prédiction.

Design of antimicrobial peptides from a cuttlefish database

Baptiste Houyvet^{a,d}, Bruno Zanuttini^b, Erwan Corre^c, Gildas Le Corguille, Joël Henry^a, Céline Zatylny-Gaudin^{a*}

^aNormandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France

^bNormandie Univ, UNICAEN, GREYC, UMR CNRS 6072, F-14032 Caen, France.

^cUPMC, CNRS, FR2424, ABiMS, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

^dSATMAR, Société ATLantique de MARiculture, Gatteville, France

***Corresponding author:** C. Zatylny-Gaudin

E-mail address: celine.gaudin@unicaen.fr

Tel.: +33 2 31 56 55 96; fax: +33 2 31 56 53 46.

Keywords

Antimicrobial peptides, Design, *Sepia officinalis*, Transcriptome, Predictive tools

Abstract

No antimicrobial peptide has been identified in cephalopods to date. Annotation of transcriptomes or genomes using Basic Local Alignment Search Tool failed to yield any from sequence identities. Therefore we searched for antimicrobial sequences in the cuttlefish (*Sepia officinalis*) database by *in silico* analysis of a transcriptomic database. Using an original approach based on the analysis of cysteine-free antimicrobial peptides selected from our Antimicrobial Peptide Database (APD3), the online prediction tool of the Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP_{R3}), and a homemade software program, we identified potential antibacterial sequences. Nine peptides less than 25 amino acids long were synthesized. The hydrophobic content of all nine of them ranged from 30 to 70%, and they could form alpha-helices. Three peptides possessed similarities with piscidins, one with BMAP-27, and five were totally new. Their antibacterial activity was evaluated on eight bacteria including the aquatic pathogens *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas salmonicida*, or human pathogens such as *Salmonella typhimurium*, *Listeria*

monocytogenes, or *Staphylococcus aureus*. Despite the prediction of an antimicrobial potential for eight of the peptides, only two— GR₂₁ and KT₁₉— inhibited more than one bacterial strain with minimal inhibitory concentrations below 25 µM. Some sequences like VA₂₀ and FK₁₉ were hemolytic, while GR₂₁ induced less than 10% of hemolysis on human blood cells at a concentration of 200 µM. GR₂₁ was the only peptide derived from a precursor with a signal peptide, suggesting a real role in cuttlefish immune defense.

I. Introduction

In 1940, gramicidin, the first antimicrobial peptide (AMP) was discovered, isolated from *Bacillus brevis* (Dubos and Cattaneo 1939; Hotchkiss and Dubos 1940). Since then the search for AMPs has kept on, year after year. AMPs are key components of the immune system of plants and animals. (Zasloff 2002; Boman 2003; Hancock and Sahl 2006). These peptides act rapidly against a large range of targets including bacteria, fungi, viruses, and parasites; some of them are more efficient than antibiotics (Yeaman 2003; Boman 2003). There is a large diversity of AMPs. Most of them are cationic, amphipathic, and between 10 and 40 amino acids long. The smallest of them are the anionic dipeptide Gageotetrin A from a marine bacterium (*Bacillus subtilis*) (Tareq et al. 2014) and Peptide F3 isolated from kefir (Miao et al. 2016). They adopt different secondary structures, e.g. α -helices as in cecropin (Hultmark et al. 1980) or o magainin (Zasloff 1987), β -sheets as in hepcidin (Lauth et al. 2005), or combined α -helices and β -sheets as in human β -defensin 2 (Harder et al. 1997; Hoover et al. 2000). Some are extended peptides without a secondary structure, like proline-rich peptide PR39 (Agerberth et al. 1991). Although AMPs are produced by living organisms, whether constitutively or induced by infection, recent research has focused on synthetic peptides, which can derive from natural peptides to improve their activity, stability, and/or selectivity (Chen et al. 1988; Carmona et al. 2013; Mura et al. 2016). Some of them are *de novo* peptides like K4 (Duval et al. 2009). In parallel with the significant and consistent increase of the number of available antimicrobial peptides, online databases have been set up. Specific databases include AMPs associated to one AMP family such as defensins (Seebah et al. 2007) (<http://defensins.bii.a-star.edu.sg>) or peptaibols (Whitmore and Wallace 2004) (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml>), or AMPs from one given kingdom such as bactibase (Hammami et al. 2010) (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>). Generalist databases have also been developed, associating statistical tools or prediction

tools such as the “Antimicrobial Peptide Database” APD (Wang and Wang 2004), recently updated (Wang et al. 2016) and the “Collection of Anti-Microbial Peptides” CAMP (Thomas et al. 2010). All these databases represent a considerable resource that we utilize to identify new AMPs from an atypical animal in which no AMP has ever been discovered. In Cephalopods, especially in cuttlefish (*Sepia officinalis*), there is a knowledge gap about immune components (Castillo et al. 2015). However, the study performed by Cornet and collaborators (2015a) led to the identification of several signaling components from the NF- κ B pathway. Besides, no humoral effector has been identified yet in this clade. Annotation of available transcriptomes or of the *Octopus bimaculoides* genome using BLAST did not yield any AMPs from sequence identities.

In this context, we developed an *in silico* approach to identify new AMP candidates from the cuttlefish transcriptome and to overcome the difficulties related to the classical method using animals. This article describes the methodological approach we applied, based on the cuttlefish transcriptome including more than 61,900 transcripts involved in secretion of neurotoxic saliva (Cornet et al. 2014), egg case formation (Cornet et al. 2015b), the immune system associated to accessory nidamental glands (Cornet et al. 2015a), and the neuro-endocrine system (Zatylny-Gaudin et al. 2016).

II. Materials and methods

2.1 Peptide design

The methodology used in this study is illustrated by the pipeline in figure 44. For the first step, we used APD (Wang et al. 2016), which mainly includes natural peptides, to determine selection criteria. We analysed 811 cysteine-free AMPs (Online resource 1), 11 to 25 residues long, potentially able to form an alpha-helix structure or no such structure at all; these features were compatible with chemical synthesis. From these 811 AMPs (table 2 supplementary data) annexe including AMPs identified in Mollusks, Arthropods, Tunicates, Fish, Amphibians, Reptiles and Mammals, we used the occurrence of certain amino acids or certain associations of amino acids as a search criterion through the cuttlefish database (Sequences are available from Genbank under Bioproject PRJNA242869 and Biosample accession No: SAMN02709769.) in peptraq. Peptraq is a homemade software program developed to perform *in silico* analyses of large batches of genomic, transcriptomic, or proteomic data based on structural criteria (peptide size, occurrence of certain amino acids, number or percentage of certain amino acids,

occurrence of consensus sequences, net electrical charge of precursors or peptides). It previously allowed us to identify the cuttlefish neuropeptidome (Zatylny-Gaudin et al. 2016). We evaluated the antibacterial potential of the selected cuttlefish sequences using available tools in the CAMP database website (Hanif Waghu et al. 2016) (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/prediction.php>). The following four algorithms were selected: Support Vector Machine (SVM), Random Forests (RF), Artificial Neural Network (ANN), and Discriminant Analysis (DA). To complete the sequence analysis, we determined the net charge, total hydrophobic ratio and molecular weight of each predictive structure using APD (Wang et al. 2016) (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php). The helical wheel projection diagrams were predicted using Heliquist (Gautier et al. 2008) (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>).

2.2 Peptide synthesis

Nine selected peptides (eight potential antimicrobial peptides and one peptide without potential antimicrobial activity) were synthesized by GENECAST (Dudelange, Luxembourg) with > 97% overall purity.

2.3 Antimicrobial assays

The minimal growth inhibitory concentrations (MICs) of the peptides were evaluated on several bacteria described in table 14. They were determined in triplicate by liquid growth inhibition assays (Hetru and Bulet 1997). Briefly, 10 µl of peptide solution were incubated in microtiter plates with 100 µl of a bacterial suspension at a starting optical

Table 14. Bacterial strains and media used to determine MICs and MBCs

	Bacteria	Origin	Culture medium	Test medium
Gram-positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 110871	BHI	PBHI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 76.117	LB	PB
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53.1 56	Col	Col
	<i>Bacillus megaterium</i>	CIP 51.17	LB	PB
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	CIP 54.8T	LB	PB
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 103446	TSB	TSB
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CIP 103209T	TSB	TSB
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	CIP 109819	MB	SPB

CIP: Collection of « Institut Pasteur MB: Marine Broth (Conda): 40.20 g/L, pH 7.6 SPB (Saline Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 15 g/L, pH 7.2 LB: (Luria-Bertani): peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.5 PB (Poor Broth): peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH7.4 BHI: Brain Heart Infusion (BD): 37 g/L, pH 7.4 PBHI Poor Brain Heart Infusion (BD): 18.5 g/L, peptone 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, pH 7.4 TSB: Trypticasein Soy Broth (Conda): 40 g/L, pH 7.3 Col: Columbia broth (Conda) 35g/L, pH 7.4.

density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.001 in poor-broth nutrient medium according to [table 14](#). Bacterial growth was evaluated by measuring optical density at 595 nm after 16-h incubation at 30°C (20°C for marine bacteria). The different peptide concentrations were tested at 10 µM, 50 µM, 100 µM, and 250 µM. MICs were expressed in µM as an [a] - [b] concentration interval, where [a] was the last concentration with microbial growth and [b] was the first concentration with 100% growth inhibition. MBCs (minimal bactericidal concentrations) were expressed in µM as an [a] - [b] concentration interval, where [a] was the last concentration with microbial growth and [b] was the first concentration that killed 100% of the bacteria.

2.4 Hemolytic activity

Hemolytic activity was determined as described by [\(Duval et al. 2009\)](#). Briefly, human red blood cells (hRBCs) were washed twice in PBS, and then diluted to obtain a solution of 1% of erythrocytes. Ninety µl of the solution were incubated with 90 µl of different peptide concentrations ranging from 10 µM to 250 µM, dissolved in PBS buffer for 1 h at 37°C. Finally, hemolysis was determined by measuring the optical density of the supernatant at 415 nm. Zero hemolysis (blank) and 100% hemolysis were determined in PBS buffer and 1% Triton X-100, respectively.

III. Results & Discussion

The 811 AMPs extracted from the APD included frog AMPs like magainins [\(Zasloff 1987\)](#), temporins [\(Simmaco et al. 1996\)](#), aureins [\(Rozek et al. 2000\)](#), and maximins [\(Lee et al. 2005\)](#), venomous arthropod AMPs like eumenitin [\(Konno et al. 2006\)](#), mastoporans [\(Čeřovský et al. 2008\)](#), snail AMPs [\(Dolashka et al. 2011\)](#), styelins tunicate AMPs [\(Lee et al. 1997\)](#), fish AMPs like piscidins [\(Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002\)](#), or histone-derived peptides [\(Robinette et al. 1998\)](#), and also a few synthetic peptides like CM15, a hybrid of cecropin and melittin [\(Andreu et al. 1992\)](#), or *de novo* peptides like K4 [\(Duval et al. 2009\)](#). All these peptides represented more than 27% of the APD and 65% of the peptides between 11 and 25 residues long; all AMPs of this length, whether containing cysteine(s) or not, corresponded to 40% of the APD peptides. The amino acids most present in the 811 sequences were glycine and hydrophobic residues, particularly leucine, isoleucine, alanine and phenylalanine. The majority of peptides were cationic, and lysine was the most frequent charged residue. These physico-chemical properties including hydrophobicity of amino acid residues as well as the charge largely influence antibacterial

activity (Zelezetsky and Tossi 2006; Grau-Campistany et al. 2015). Very often, i.e. in more than 10% of the 811 sequences, these amino acids associated with hydrophobicity or charge made up recurring patterns like KA, GL, KL, LK, LL, or VI.

We selected sequences from the peptraq cuttlefish database, using four main structural criteria: (1) a size ranging from 11 to 25 residues; (2) a positive charge; (3) richness in leucine, isoleucine, alanine, glycine or lysine; and (4) the presence of two recurrent patterns among KA, GL, KL, LK, LL, VI or FI, IF, HI and IH; i.e. common patterns to piscidins and temporins. We selected 100 sequences combining these three criteria from the cuttlefish transcriptome, and evaluated their antimicrobial potential with CAMP algorithms. Eight sequences were validated (Table 15), and a negative sequence (FD₂₀)

Table 15. Peptides selected from the cuttlefish database

Name	Length (AA)	Sequence	MM ¹	HR ¹	Prediction of α -helices and NBH ¹	Charge ¹	Prediction for Antimicrobial Peptide			
							SVM	RFC	ANN	DAC
KG ₁₇	17	KIFDAEILLNGKRKGLG	1872.23	41%	Yes-5	2	0.795	0.606	AMP	0.794
FK ₁₉	20	FIKIFHHIFKGNPKFSIIK	2314.83	47%	Yes-6	4	0.969	0.85	AMP	0.996
KT ₁₉	20	KIRFTRTVSRLKAAALAST	2132.57	47%	Yes-7	5	0.768	0.787	AMP	0.964
AT ₂₀	20	AKAFKKAFEKLAADVPPFGGT	2080.48	55%	Yes-5	3	0.817	0.749	AMP	0.974
GT ₂₀	20	GKSNKPALTIQARILKHKT	2217.67	35%	Yes-6	5	0.945	0.6805	AMP	0.939
VA ₂₀	20	VILTRFRFLNRIVEPLLKKA	2427.02	55%	Yes-8	4	0.823	0.8025	AMP	0.994
GR ₂₁	21	GSTSFHLYNKWFVAKRRRKR	2651.11	33%	Yes-4	7	0.932	0.792	AMP	0.961
FD ₂₀	20	FFHHIFDPQIKSGLLVSMYD	2394.78	45%	Yes- 7	-1	0.081	0.024	NAMP	0.124

MM : molecular mass ; HR : hydrophobic ratio ; NBH : number of residues in the same hydrophobic surface ; SVM Support Vector Machine classifier ; RFC : Random Forest Classifier ; ANN : Artificial Neural Network ; DAC Discriminant Analysis Classifier. ¹ Parameters and prediction from APD, ² Prediction evaluated form algorithms of CAMP, AMP Anti-Microbial Peptide, NAMP No Anti-Microbial Peptide.

was added as a control.

Sequences were between 16 and 21 amino acid residues long. FI₁₆ was the shortest peptide, and GR₂₁ the longest. Molecular weights ranged from 1872.23 (AT₂₀) to 2651.11 (GR₂₁). Total hydrophobic ratios ranged between 33% and 68%, and total net charges from +2 (KG₁₇) to +7 (GR₂₁). We evaluated the antimicrobial potential of the eight cationic peptides FI₁₆, KG₁₇, FK₁₉, KT₁₉, AT₂₀, GT₂₀, VA₂₀ and GR₂₁ with the four CAMP algorithms (Table 15).

The anionic peptide FD₂₀ was synthesized as a non-antimicrobial control. All sequences were able to form alpha helices and possessed between 4 and 8 residues on the same hydrophobic surface according to the APD prediction (Table 15). We used Heliquet to calculate helix properties. Figure 45 shows the helical wheel projection of the cationic

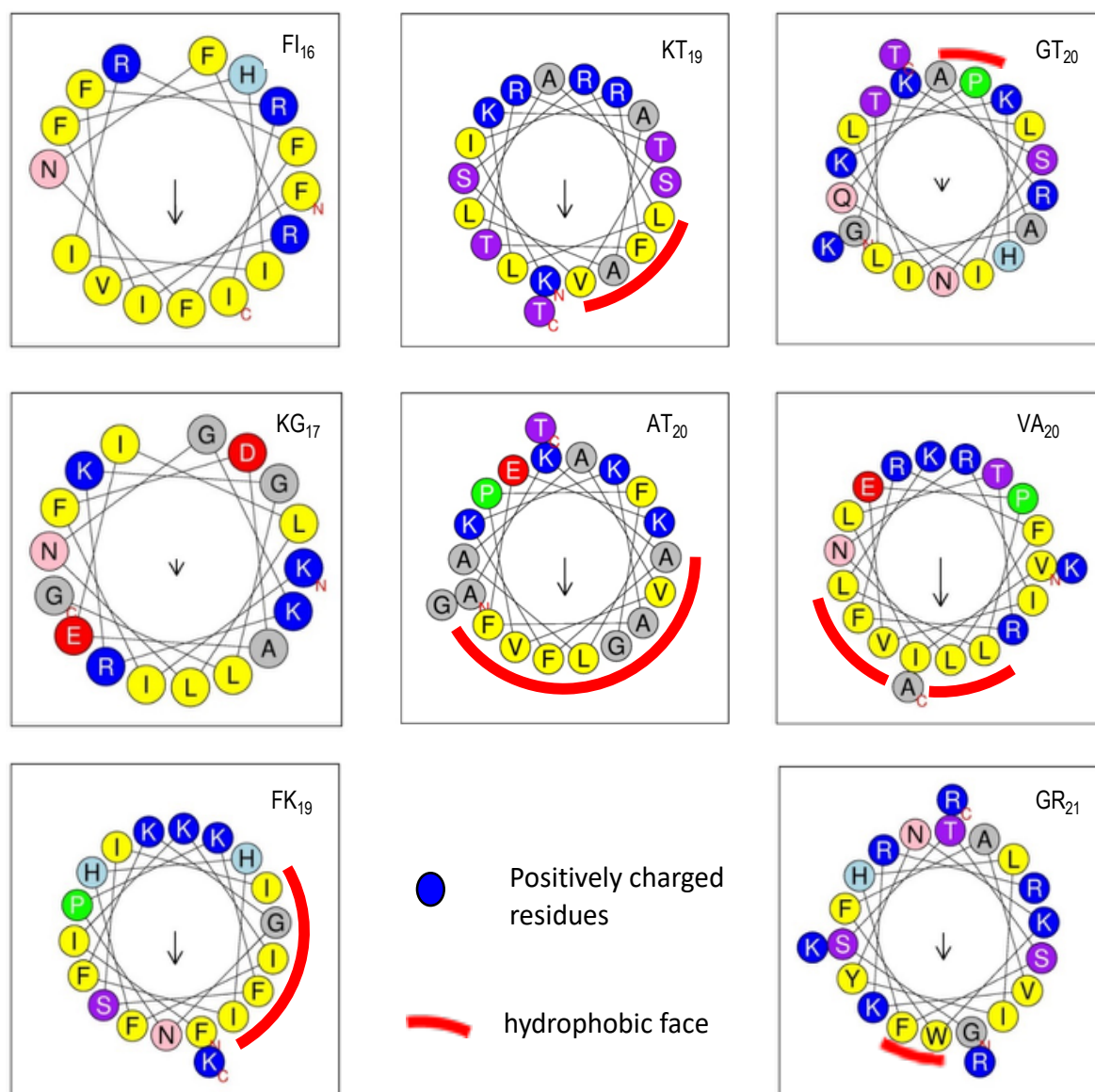


Fig. 45 Helical wheel diagram of FI₁₆, KG₁₇, FK₁₉, KT₁₉, AT₂₀, FD₂₀, GT₂₀, VA₂₀ and GR₂₁ peptides.

The helical wheel projections were performed using online program of the HeliQuest: <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>. The yellow color represents hydrophobic amino acids, blue color represents the basic residues, green color, red for acidic residues and purple for polar amino acids.

peptides. In this conformation, some of the peptides revealed a hydrophobic face that differed from the APD prediction. Only AT₂₀, VA₂₀, FK₁₉ and for KT₁₉ seemed to adopt an amphiphilic α -helix. A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) from CAMP revealed similarities between three sequences and piscidins: FI₁₆ displayed similarities with epinecidin-1 of *Epinephelus coioides* (Lin et al. 2009), and FK₁₉ and FD₂₀ with moronecidin of *Siniperca chuatsi* (Sun et al. 2007) (figure 46). The acquisition of these three peptides met our peptraq criteria (FI, IF, HI and IH) and validated our methodology. Another sequence revealed local alignment of AT₂₀ with BMAP-27 derived from cathelicidin of *Bos*

Taurus (Skerlavaj et al. 1996) (figure 46). The other sequences KG₁₇, KT₁₉, VA₂₀, GT₂₀ and GR₂₁ shared no homology with known peptides.

The antibacterial assays were performed on 8 bacteria including both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table 14). Some were human pathogens like *Listeria monocytogenes* (Marquis et al. 2015) and *Staphylococcus aureus* (Lowy 1998), while others such as *Vibrio alginolyticus* or *Aeromonas salmonicida* are pathogenic for aquatic organisms (Sangster and Smolowitz 2003; Menanteau-Ledouble et al. 2016). Out of the

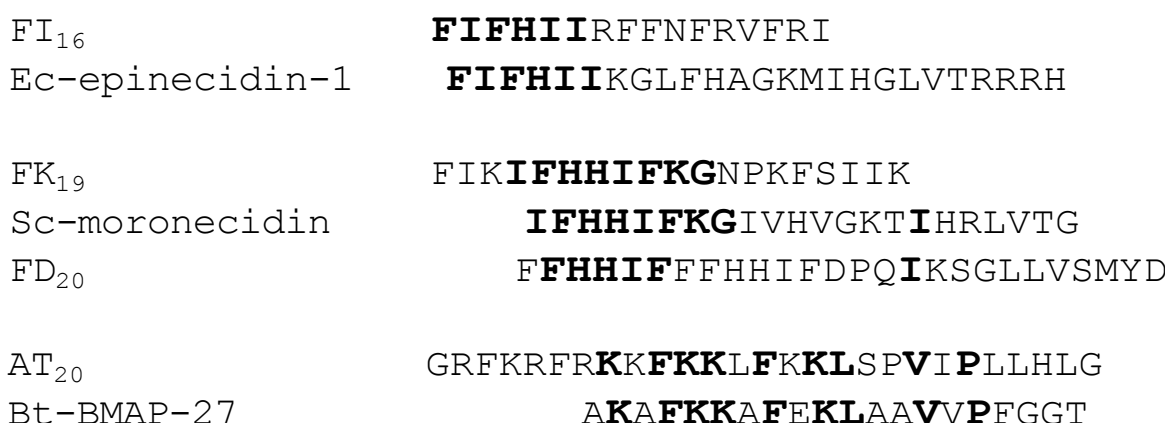


Fig. 46 Alignment of selected sequences. FI₁₆ with Epinecidin-1 of *Epinephelus coioides* (Q6JWQ9), FK₁₉ and FD₂₀ and moronecidin of *Siniperca chuatsi* (Q2VWH5), and AT₂₀ with the antimicrobial peptide BMAP-27 derived from cathelicidin of *Bos taurus* (P54228).

nine peptides, five inhibited the growth of at least one bacterial strain, often at high concentrations (Table 16). This was the case for FK₁₉ and the anionic FD₂₀ which inhibited *Escherichia coli* up to 150 µM and *Enterococcus faecalis* between 100-150 µM, respectively. Neither was bactericidal. Besides, VA₂₀ inhibited the two bacteria *Bacillus megaterium* and *Escherichia coli* at 100 µM and 25-50 µM, respectively. It was otherwise bactericidal on the two strains at 100 µM. Finally, KT₁₉ and GR₂₁ were the most active

Table 16. Antibacterial activity of synthetic peptides

peptide	Gram-positive								Gram-negative							
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella thyphimurium</i>		<i>Vibrio alginolyticus</i>		<i>Aeromonas salmonicida</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
FI ₁₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KG ₁₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK ₁₉	-	-	-	-	-	-	-	-	≥150	NB	-	-	-	-	-	-
KT ₁₉	≥50	≥50	1-10	1-10	100-150	NB	10-25	25-50	1-10	1-10	75-100	75-100	10-25	25-50	10-25	10-25
AT ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FD ₂₀	-	-	-	-	100-150	NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VA ₂₀	-	-	≥100	≥100	-	-	-	-	25-50	≥100	-	-	-	-	-	-
GR ₂₁	10-25	10-25	1-10	1-10	75-100	100-150	5-10	10-25	1-10	1-10	≥50	≥50	-	-	≤5	≥50

MIC: Minimal Inhibition Concentration ; MBC: Minimal Bactericidal Concentration ; - : No Activity ; NB : Not bactericidal.

antibacterial peptides: they inhibited all bacteria, except *Vibrio alginolyticus* that was not sensitive to GR₂₁. Both peptides showed low MICs and MBCs under 25 µM on several strains including *Aeromonas salmonicida*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, and *Staphylococcus aureus*. They both had a broad antibacterial activity spectrum, while the spectrum of other active peptides was narrower. Although Strandberg and collaborators (2015) demonstrated the influence of hydrophobic residues on the antibacterial activity of manganine-2, the most hydrophobic sequence FI₁₆ as well as AT₂₀ did not appear to have any antibacterial activity despite their similarities with antimicrobial peptides like epinecidin-1 or BMAP 27.

We evaluated hemolytic activity against human red blood cells. Results are reported in figure 47. No hemolytic activity was induced by any of the peptides at a low concentration of 5 µM, but hemolysis occurred when concentrations increased. At 50 µM, GR₂₁ and FI₁₆ induced less than 5% of hemolysis, while VA₂₀ and FK₁₉ induced 10% and 43% hemolysis, respectively. At 100 µM, KT₁₉ induced slight hemolysis (<10%), and 21% at 200 µM. Finally, the most hemolytic peptide was FK₁₉: it caused more than 50% of hemolysis from 100 µM. FK₁₉ has a conserved pattern (FHHIFXG) in common with moronecidins, in particular with moronecidin of *Morone saxatilis*, which are hemolytic on sheep and human red blood cells (Lauth et al. 2002). This pattern therefore appears to be involved in interactions with eukaryotic membranes.

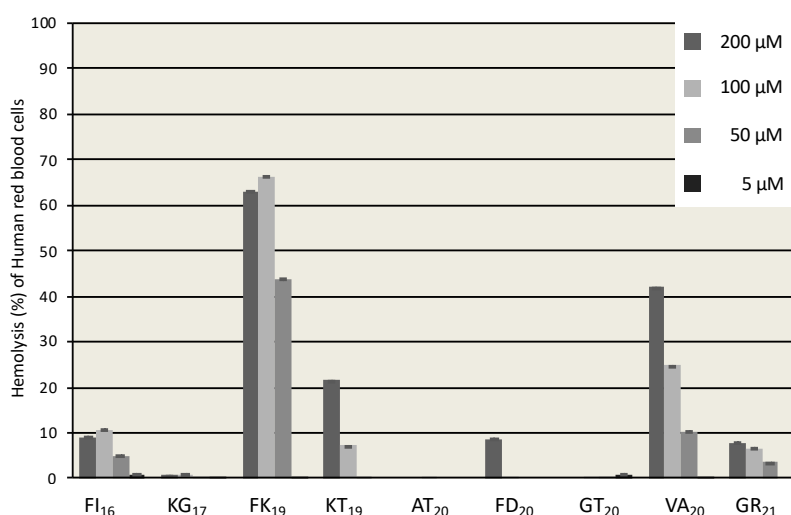


Fig. 47 Hemolytic assay. The hemolytic activity of all the nine peptides was evaluate using human red blood cells (hRBCs).

Besides, KT₁₉ and GR₂₁ were the antibacterial peptides with the largest activity spectrum both on Gram-negative and Gram-positive bacteria. They were also the two most cationic peptides. GR₂₁ was strongly active while it was the least hydrophobic peptide and the most cationic one, supporting the important role of the electrical charge for antibacterial

activity. Most AMPs are usually cationic (Hancock and Lehrer 1998; Hancock and Diamond 2000), and many of them are involved in host defense (Brown and Hancock 2006). GR₂₁ was the only peptide selected from a precursor with a signal peptide, suggesting a physiological role of this peptide in cuttlefish immune defense. Nevertheless, peptides do not necessarily have to be positively charged to be active, as confirmed by the existence of anionic AMPs (Lai et al. 2007; Lai and Gallo 2009).

The strategy developed in this study allowed us to design antimicrobial peptides from a cuttlefish database. Only four of the eight designed peptides had *in vitro* antibacterial properties despite the potential antimicrobial activity predicted by all four CAMP algorithms. Predicting the antibacterial potential of peptides remains difficult, taking into account the hydrophobicity and the net charge which condition antibacterial activity. Studies about the use of predictive tools such as CAMP are scarce. Sharma and collaborators (2015) carried out an in-depth study to compare two antibacterial predictive tools, CAMP versus DBAASP (Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides: <https://dbaasp.org/home>) to target *Acinetobacter baumannii* (Sharma et al. 2015). Nevertheless, their study focused on peptides already described to be antibacterial. In the present study, we tried to design new AMPs from a database that did not contain known AMPs. Our results also show that predictive tools are not 100% efficient. For peptides like FI₁₆, KG₁₇, GT₂₀ and AT₂₀ predicted to be antibacterial, *in vitro* tests on eight bacteria failed to validate this potential. Nevertheless, they might act against other targets like fungi or protozoa. On the contrary, FD₂₀, though not strongly active, inhibited the growth of one bacterium while it had not been predicted to have antibacterial activity. The same was observed for peptide histatin-8: although it is a human antibacterial peptide (Vila-Farres et al. 2012), it was not predicted to be antibacterial (Sharma et al. 2015).

Otherwise, the present study shows how complex it is to decipher what is exactly needed for a peptide to be antibacterial. Using tools such as Heliquist is interesting to visualize the spatial arrangement of the different peptides. The common feature between our most active peptides is the clear segregation of the hydrophobic moiety from the cationic core as compared to the other peptides. Balancing peptide hydrophobicity and charge distribution is probably a determining factor of *in vitro* activity of AMPs.

To conclude, the methodology developed in this study allowed us to design two new antibacterial peptides that have a large spectrum of antibacterial activity but do not induce hemolysis. Furthermore, their MICs and MBCs are low for some strains, which renders them more selective for these sensitive strains. It would be interesting to further study these two peptides to investigate their mode of action. As regards peptide GR₂₁, which comes from a precursor with a signal peptide upstream of the antibacterial sequence, it would be interesting to study its biological function in cuttlefish to confirm its involvement in immunity. This approach also represents an alternative to classic methods such as purification from peptide extracts which needs animal material and is labor-intensive.

Acknowledgments

We are thankful to the “Région Basse-Normandie” for funding this work through the ACTISEP program in collaboration with Blandine Diss and Emilie Vetois from the SATMAR “Société Atlantique de Mariculture”.

We thanks EFS (Etablissement Français du sang) for human blood sample.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Informed consent

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval of the final version of the manuscript.

Ethical statement

The article does not contain any studies in patients by any of the authors. This article contains studies with human or animal subjects that are all approved of by the Ethics Committee.

3.2. Résultats des peptides WK₂₀, KY₁₅, GK₁₆

Les 3 peptides ont démontré leur pouvoir antibactérien sur plusieurs des souches testées. Leurs CMI et CMBs sont reportés dans le [tableau 17](#).

Tous les 3 sont actifs et bactéricides sur des bactéries à Gram-négatifs comme à Gram-positifs. WK₂₀ et GK₁₆ sont bactéricides sur *L.monocytogenes* pour une concentration comprise entre 50-75µM et KY₁₅ entre 5-10µM. KY₁₅ est par ailleurs actifs sur presque toutes les souches testées pour des concentrations parfois inférieures à 5µM et pouvant atteindre les 75µM.

Enfin, les 3 peptides se sont révélés actifs sur les *Vibrios* pathogènes d'organismes marins et en particulier sur *V.splendidus* dont les CMI et CMBs sont comprises entre 5µM et 25µM. Par ailleurs, WK₂₀ s'est montré plus efficace sur cette souche puisqu'il est bactéricide pour une concentration inférieure à 5µM. Les deux autres inhibent *V.splendidus* entre 5 et 10 µM et sont bactéricides entre 10 et 25µM.

Tableau 17. CMI et CMBs des peptides WK₂₀, GK₁₆ et KY₁₅.

Bactéries		WK20		GK16		KY15	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Gram-positive	<i>S.aureus</i>	10-25	10-25	-	-	≤5	5-10
	<i>B.megaterium</i>	-	-	10-100	10-100	≤5	NB
	<i>E.feacalis</i>	75-100	100-150	-	-	50-75	50-75
	<i>L.monocytogenes</i>	50-75	50-75	50-75	50-75	5-10	5-10
Gram-négative	<i>E.coli</i>	-	-	-	-	≤5	≤5
	<i>S.typhimurium</i>	-	-	≥50	NB	5-10	5-10
	<i>V.splendidus</i>	≤5	≤5	5-10	10-25	5-10	10-25
	<i>V.alginolyticus</i>	5-10	10-25	25-50	25-50	-	-

CMI : Concentration minimale inhibitrice, CMB : concentration minimale bactéricide

D. Discussion

Malgré la diversité des approches méthodologiques, la recherche de PAMs se révèle difficile chez le modèle *Sepia officinalis*. L'approche menée à partir des échantillons biologiques a permis de mettre en évidence des activités antibactériennes à partir de la peau de la seiche. Toutefois aucune molécule n'a pu être identifiée de par la complexité de l'échantillon. Il ne fait pas de doute que la seiche comme tout organisme présente des PAMs mais il est vrai que les méthodes classiques utilisées au cours de cette thèse ou lors de travaux précédents (Duval 2008) restent infructueuses à l'image de ce que Sperstad et collaborateurs (2011) font état pour d'autres organismes marins.

Par ailleurs, l'exploration de la base de donnée transcriptomique de *Sepia officinalis* par BLAST n'a pas permis d'identifier de PAMs chez la seiche. Le même constat est établi chez les autres céphalopodes puisqu'aucun PAM n'a été identifié jusqu'à présent. Cette recherche par BLAST bien que très fructueuse dans certains cas (Zou et al. 2007) est limitée à la recherche de molécules apparentées à des molécules déjà identifiées. Dans le cas de la seiche et des Céphalopodes plus généralement, il n'est pas exclu que les PAMs soient atypiques. Les Céphalopodes sont des invertébrés tout à fait particuliers, ce qui s'est déjà confirmé également d'un point de vue moléculaire avec de nombreux peptides ou protéines tout à fait originaux et nouveaux associés à la reproduction notamment comme les peptides ovariens (Zatylny et al. 2000, 2002, Bernay et al. 2004, 2005, 2006) ou les protéines associées à la formation de la capsule de l'œuf (Cornet et al. 2015).

Ces précédents résultats nous ont conduit à développer une nouvelle méthodologie permettant de réaliser le « design » de PAMs à partir des données transcriptomiques de la seiche. Cette méthodologie s'appuie sur une recherche ciblée grâce à un outil informatique Peptraq suivant de critères déterminés à partir d'une liste de PAMs très ciblés, issus d'APD. Sur les 10 séquences sélectionnées pour leur potentiel antimicrobien à partir d'un utilitaire de prédiction de CAMP, quatre ont révélé un large spectre d'activité antibactérienne. Et sur les 2 peptides utilisés comme contrôle potentiellement non antimicrobien, un s'est révélé très efficace notamment sur les pathogènes humains et d'organismes marins. Ces résultats ont permis de valider la méthodologie mise en œuvre tout en mettant en évidence les limites des outils de prédiction. Cette inadéquation entre les prédictions *in silico* et la réalité biologique a été soulevée par d'autres études comme celles de Chatterjee et collaborateurs (2015) sur des peptides antioxydants produits à

partir de l'hydrolyse du lait, celle de Dziuba & Dziuba (2014) sur des PAMs générés également par l'hydrolyse du lait ou celle de Sharma et collaborateurs (2015) qui ont comparé deux outils de prédiction celui de CAMP et celui de DBAASP (Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides: <https://dbaasp.org/home>).

A travers ce chapitre après diverses approches, nous avons été en mesure d'identifier des peptides au pouvoir antibactériens chez *Sepia officinalis*. Fedders et Leippe (2008) avaient réalisé une approche semblable chez le modèle *Ciona intestinalis*. les auteurs avaient identifié par une étude *in silico* des PAMs dont la réalité biologique avait été confirmée par des études complémentaires (Fedders and Leippe 2008). Il est fort probable que la majorité des peptides étudiés dans ce chapitre ne soient pas présents chez la seiche. Toutefois, il serait intéressant de mener une recherche ciblée sur le peptide GR₂₁ qui est issu d'un précurseur comprenant un peptide signal, d'établir un mapping au niveau des tissus et en fonction des résultats d'évaluer ses fonctions biologiques afin de déterminer son éventuel rôle au sein du système immunitaire.

Chapitre III : Transfert des PAMs en aquaculture et plus particulièrement en éclosionerie

A. Introduction

1. L'aquaculture

Face à une population mondiale grandissante qui devrait atteindre les 9 milliards en 2050, la production de ressources alimentaires constitue l'un des enjeux les plus importants pour notre société. Cette tâche apparaît d'autant plus difficile dans le contexte actuel de réchauffement climatique. En parallèle, il est crucial de lutter pour la préservation des ressources naturelles. L'aquaculture est peut-être la réponse à ces grands enjeux.

L'aquaculture est le secteur qui a connu la plus rapide et la plus grande croissance, depuis son industrialisation au milieu du siècle dernier, il ne cesse de repousser sa marge de progression. Selon la FAO (2016) la production de l'aquaculture a doublé ces 10 dernières années et désormais elle est capable d'assurer la moitié de la demande totale en ressources aquatiques (figure 48).

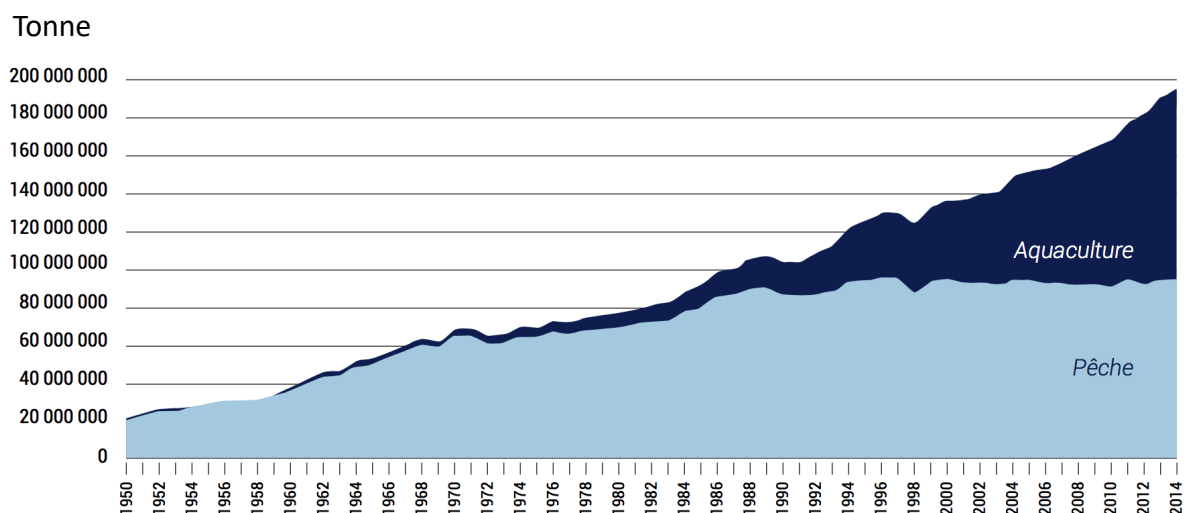


Figure 48 : Production mondiale de la pêche de capture et de l'aquaculture. Illustration reprise de la FAO (2016).

L'aquaculture mondiale a produit 73.78 millions de tonnes de ressources aquatiques en 2014 (FAO, 2016). L'Asie occupe la position de leader mondial dans la production aquacole mondiale avec 65.6 millions de tonnes soit 88.91% de la production mondiale en 2014, la Chine produisant à elle seule 61,2% (FAO, 2016). En comparaison, la part des autres continents est dérisoire (Figure 49.A).

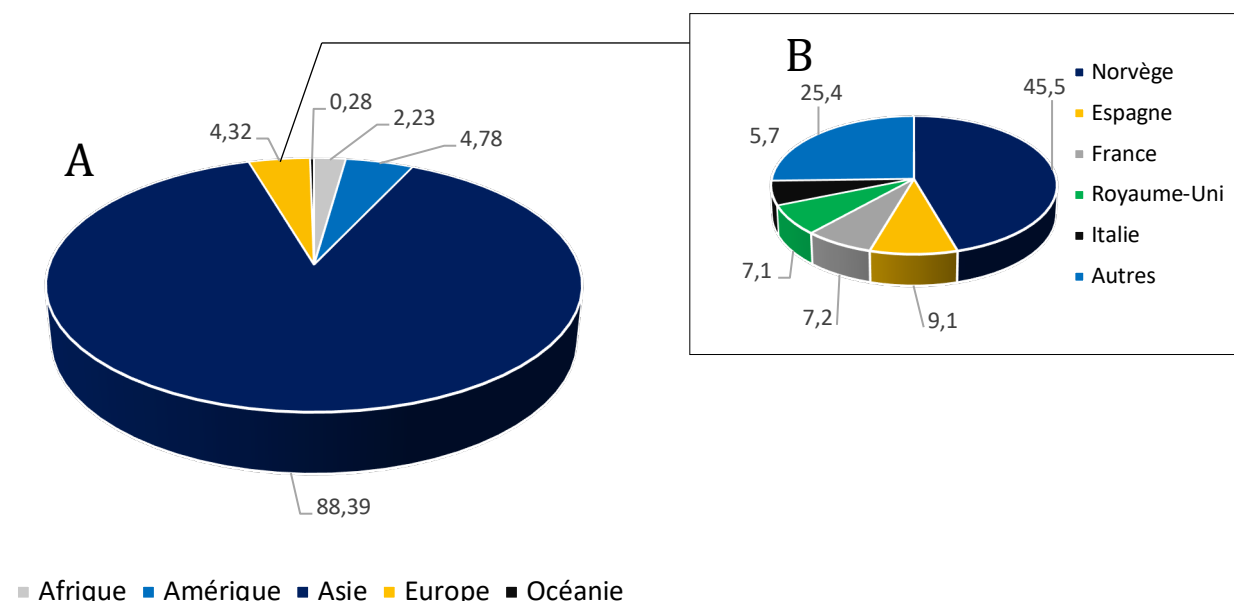


Figure 49 : Répartition de la production aquacole mondiale en fonction des continents par tonne (A) et en fonction des pays européens (B). Données de la FAO (2016).

En Europe comme dans le monde, Les catégories d'organismes exploités suivent la même répartition. C'est l'exploitation des poissons dulcicoles, qui domine largement avec une production supérieure à la moitié de la production aquacole totale. Les mollusques arrivent en second, suivis par les crustacés et enfin les poissons marins.

Par ailleurs, si la majorité de la production européenne est tournée vers la pisciculture, l'aquaculture en France est quant à elle, principalement tournée sur la conchyliculture. Selon France Agrimer, en 2013, la production de mollusques était estimée à 154 517 tonnes contre 45 993 tonnes de poissons (dulcicoles et marins) avec 74 138 tonnes de moules et 77 510 tonnes d'huîtres, les autres bivalves se partageant les quelques 2 000 tonnes restantes. En Europe, la France se place largement en tête dans le domaine de l'ostréiculture juste derrière l'Espagne (FAO, 2016).

2. Les problèmes liés l'aquaculture

Pour répondre à une demande croissante en ressources alimentaires et en même temps diminuer la pression de pêche sur les ressources naturelles, l'aquaculture doit obligatoirement s'intensifier. Ce travail d'intensification est mené depuis un demi-siècle à travers l'industrialisation de ce secteur (augmentation des superficies d'exploitation, mécanisation des pratiques, meilleure maîtrise du parcours zootechnique, du cycle biologique des espèces exploitées et meilleure maîtrise des besoins des animaux...). A

présent l'aquaculture est capable de fournir la moitié de la demande en ressource aquatique mondiale, démontrant ainsi la réussite de ce secteur (FAO, 2016). Les chiffres actuels sont très positifs et encourageants quant aux objectifs à atteindre. Toutefois, cette pratique industrielle a certains impacts et présente des risques environnementaux. Certains de ces impacts pourraient se classer en tant que problèmes mineurs. En effet, certaines espèces fourragères issues de la pêche minotière sont en danger, mais actuellement des efforts sont portés sur la formulation de nouveaux aliments à partir de coproduits (Toyes-Vargas et al. 2017). Un autre impact, concerne le rejet de déchets organiques tels que les aliments non ingérés, fèces et pseudo fèces (Cao et al. 2007). Là, encore il s'agit d'un problème qui peut être levé par la mise en place d'une aquaculture plus durable. C'est ce que vise notamment à faire « l'Aquaculture Multi-Trophique Intégrée » (AMTI) (Ahmed and Glaser 2016). Il s'agit d'associer différentes espèces couvrant plusieurs niveaux trophiques afin que les déchets de l'une d'entre-elles soient recyclés (Nourriture, déchet) par une autre.

Par ailleurs, d'autres impacts touchant à l'environnement ou à la santé public apparaissent comme des problèmes majeurs (Grigorakis and Rigos 2011). La pratique de l'aquaculture peut être à l'origine d'introduction d'espèces. 10% des espèces exotiques retrouvées en méditerranée proviennent de l'aquaculture (Galil 2009). Dans certains cas les espèces libérées dans l'environnement peuvent avoir un potentiel invasif constituant un véritable danger pour l'écosystème local comme cela a été décrit pour le poisson-lion en Atlantique Ouest et en mer des caraïbes (Albins and Hixon 2008, 2013; Arias-González et al. 2011; Albins 2015). En méditerranée, l'introduction d'algues comme *Sargassum myticum* représente un véritable danger (Streftaris and Zenetos 2006). Introduite avec l'huître japonaise cette algue s'est développée très rapidement le long des côtes, captant toute la lumière au détriment des espèces d'algues locales.

En plus de l'introduction d'espèces exotiques l'aquaculture directement ou indirectement peut être responsable de l'apparition de nouveaux pathogènes (Grigorakis and Rigos 2011). Le champignon *Aphanomyces astaci* responsable de la peste de l'écrevisse est un exemple. Ce champignon originaire des Etats-Unis a décimé les populations d'écrevisses européennes permettant ainsi l'invasion de l'écrevisse américaine (Alderman 1996; Edgerton et al. 2004).

L'intensification de l'aquaculture entraîne l'émergence de maladies qui est pénalisante d'un point de vue économique. Dès lors, que les densités d'élevage sont importantes, des mortalités surviennent et ce indépendamment de la région ou de l'espèce exploitée. En Asie, de lourdes pertes sont observées dans les élevages de crevettes à cause de *Vibrio harveyi* (Zhou et al. 2012; De Schryver et al. 2014). Les élevages de palourdes (Park et al. 2006) de poissons et de crabes sont également touchés (Nielsen et al. 2001). En Europe et plus particulièrement en Finlande, c'est l'élevage de saumons qui est affecté par *Flavobacterium columnare* (Pulkkinen et al. 2010). En France, il y a des mortalités massives dans le domaine de l'ostréiculture depuis les années 2000 causées notamment par *vibrio splendidus* (Lacoste et al. 2001) pour les stades juvéniles et *Vibrio aestuarianus* (Labreuche et al. 2010) pour les huîtres adultes.

2.1. Les antibiotiques

Pour la Chine, qui est le plus grand producteur mondial dans le domaine de l'aquaculture, les pertes économiques liées aux mortalités sont estimées entre 15 et 30 billions de dollars par an (Liu et al., 2017). Les mortalités récurrentes dans ce secteur ont conduit à l'utilisation massive et abusive d'antibiotiques, non seulement pour traiter les infections mais également en prophylaxie (Cabello 2006). La Chine est le plus gros producteur et utilisateur d'antibiotiques. C'est en effet 162 000 tonnes d'antibiotiques utilisés en 2013, dont la moitié pour la culture et l'élevage d'animaux (terrestre et aquatique) destinés à la consommation (Liu et al. 2017). A l'échelle mondiale les antibiotiques sont très utilisés mais certaines régions sont plus prudentes vis-à-vis de leur utilisation. C'est le cas de l'Europe notamment qui a mis en place une réglementation très stricte (Serrano 2005). Les médicaments disposant d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) sont rares, et l'usage des antibiotiques ne peut se faire que sous prescription par un vétérinaire lors d'infection avérée. Par ailleurs, si l'Europe contrôle leur usage sur son territoire elle fait également preuve de vigilance concernant les produits importés qui contiennent des traces d'antibiotique et a établi des seuils à respecter. Elle même applique une tolérance zéro sur certains produits comme le Chloramphénicol. Il s'agit d'un antibiotique à large spectre classé comme cancérigène, dont la détection dans des crevettes importées d'Asie a fait l'objet d'un scandale en 2002 (Hanekamp et al. 2007; Manaia 2017).

Plusieurs problèmes sont associés à l'utilisation abusive et au rejet dans des antibiotiques dans l'environnement. Il s'agit de molécules pour la majorité très stables sur plusieurs mois dans le milieu (aquatique ou terrestre) (Cabello et al. 2004; Cabello 2006; Kümmerer

2009). Les progrès des méthodes d'analyse permettent désormais de détecter la présence d'antibiotiques à de très faibles concentrations de l'ordre du ng/L. Une étude réalisée récemment à l'Est de la Chine sur 3 sites (2 en rivière et 1 en mer), a montré la présence d'antibiotiques à des concentrations dépassant les 10ng/L pour certains antibiotiques en rivière et à des concentrations supérieures à 1ng/L en mer (Fisch et al. 2017). Des concentrations plus élevées ont par ailleurs été révélées au Sud de la Chine. Certains antibiotiques ont été retrouvés à des concentrations supérieures à 25 ng/L, et le cumul de l'ensemble des 25 antibiotiques détectés pouvant atteindre les 11,3 µg/L suivant les sites (Dujuan et al. 2017). Cela pose une réelle question quant à l'impact de la combinaison de plusieurs antibiotiques sur l'environnement et ces organismes associés (Grigorakis and Rigos 2011), ces molécules pouvant être bioaccumulées par des organismes filtreurs ou se retrouver dans le sédiment. Leur présence dans le milieu naturel est néfaste à plusieurs échelles notamment sur les communautés de bactéries d'intérêt écologique, comme les bactéries nitrifiantes (Kümmerer 2009) ou sur la production primaire, tels que le phytoplancton ou le zooplancton, comme cela a été démontré pour l'oxytétracycline et la florfénicole (Ferreira et al. 2007).

Le risque le plus important quant à l'usage abusif des antibiotiques en aquaculture et leur rejet dans l'environnement, est l'acquisition de résistances au niveau des bactéries pathogènes. Tous les rejets d'antibiotiques quelle que soit l'origine (humaine, élevage animal ou domestique), participent à l'émergence de résistances contre les antibiotiques (Kümmerer and Henninger 2003; Done et al. 2015). De plus en plus d'études documentent la présence de bactéries résistantes aux abords d'élevages aquacoles (Alderman and Hastings 1998a; Sapkota et al. 2008). Parmi ces bactéries résistantes certaines appartiennent notamment au clade des *Vibrios*, comme le montre l'étude réalisée au sein d'une éclosérie de crevettes au Brésil (Helena Rebouças et al. 2011), ou encore au sein d'un élevage de poissons en Corée (Oh et al. 2005). L'origine de ces résistances s'explique par plusieurs mécanismes. Il peut s'agir de mutation de l'ADN ou de transferts de gènes horizontaux par l'acquisition de plasmides (Sapkota et al. 2008) qui est facilité dans les zones très chargées en bactéries. La résistance acquise par les plasmides présente un risque supplémentaire puisque il permet une propagation vers d'autres bactéries proches ou éloignées (Dos et al. 2016). Pour ce qui est des bactéries multi-drogue résistantes, elles font l'acquisition de plusieurs gènes, dont chacun permet la résistance contre un des antibiotiques. L'autre type de résistance repose sur l'augmentation de l'expression de

gènes qui codent pour des pompes à efflux et permet par conséquent de rejeter un grand nombre d'antibiotiques (Nikaido 2009). Une étude a récemment mis en lumière la présence de bactéries multi-drogues résistantes du genre *Vibrio* dans un estuaire proche d'un élevage de crevettes au Brésil (Dos et al. 2016). Sur 70 souches isolées, toutes sont résistantes contre au moins un antibiotique et 17 sont multi-drogues résistantes. En tant que bactéries opportunistes les vibrios sont souvent associés aux épisodes de mortalités en aquaculture. *Vibrio splendidus* est associé aux mortalités de larves de pétoncles (Rojas et al. 2015) et d'huîtres (Lacoste et al. 2001), *Vibrio tubiashii* est quant à elle responsable de mortalités chez la palourde (Dubert et al. 2017). Le manque de moyens pour lutter contre les bactéries résistantes constitue un réel problème. Ce qui peut avoir des répercussions à la fois sur les productions aquacoles et sur la santé humaine.

2.2. Le potentiel des peptides antimicrobiens en Aquaculture

Dans la lutte contre les infections en aquaculture, les PAMs représentent une alternative intéressante. Ces peptides agissent rapidement en ciblant dans la majorité des cas l'intégrité des membranes bactériennes (Hancock and Scott 2000; Zasloff 2002; Adem Bahar et al. 2013). C'est leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur structure tridimensionnelle qui leur permettent d'agir ainsi (Adem Bahar et al. 2013). L'étude des PAMs est en plein essor, cela s'observe avec la multiplication (par 5 depuis 10 ans) du nombre d'ouvrages scientifiques sur le sujet (Mahlpuu et al. 2016). Les PAMs peuvent constituer une alternative aux antibiotiques tout en répondant aux problèmes des bactéries multi-drogues résistantes. Le peptide OP-145, dérivé de la cathélicidine humaine LL-37 est efficace contre 9 souches multi-drogues résistantes de *staphylococcus aureus* (Ming and Huang 2017). Actuellement, le nombre de PAMs utilisés sur le marché est très faible puisque seule la gramicidine a été autorisée par la FDA (Food and Drug Administration). Il s'agit d'un peptide linéaire de 15 acides aminés qui possède un groupement alcool du côté C-terminal, ce peptide est utilisé pour des applications locales, pour la pose de cathéter (Steckbeck et al. 2014). La pexiganane, un peptide dérivé de la magainine efficace sur l'ulcère du pied diabétique aurait pu être également exploité. Toutefois ne se révélant pas plus efficace que les traitements existants il n'a pas reçu d'autorisation de la FDA (Steckbeck et al. 2014).

En aquaculture, aucun PAM n'est utilisé actuellement et le nombre d'études sur le potentiel de ces molécules dans ce domaine est très réduit. Deux seulement documentent

ce sujet à ce jour. Elles s'intéressent toutes les deux à l'effet de PAMs injecté à des poissons en situation de challenge bactérien. La première étude montre que les groupes de saumons infectés par *Vibrio anguillarum* qui ont reçu la pleurocidine ou le peptide CEME (peptide hybride de la méllitine et de la cécropine) ont un taux de survie significativement plus élevé que le lot qui a seulement été infecté par la bactérie (Jia et al. 2000). La seconde étude montre que l'injection de tilapias et de mérous avec l'epinecidine-1 diminue significativement les mortalités en présence de *Vibrio vulnificus* (Pan et al. 2007).

Bien que ces études soient encourageantes pour une éventuelle utilisation des PAMs en aquaculture, elles restent très préliminaires et le mode d'administration peut constituer un obstacle, l'injection constituant une méthode intrusive, stressante, non applicable à toutes les espèces exploitées.

Un traitement par balnéation pourrait être une méthode d'administration plus adaptée. La contrainte de ce mode de traitement porte sur le coût d'utilisation. En 2007, Guiliani et collaborateurs (2007) estimaient que le prix d'un peptide synthétisé était 5 à 20 fois plus onéreux que celui d'un antibiotique. A présent ce n'est plus cas, le coût de la synthèse peptidique a considérablement diminué, par ailleurs l'usage de système de productions hétérologues peut être envisagé (Li 2011). Enfin, si l'usage des PAMs dans les systèmes de production aquacole à très grand volume semble illusoire, leur usage dans des structures de plus faibles volumes comme en écloserie peut paraître réalisable.

3. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est de déterminer le potentiel des PAMs dans le milieu marin et plus particulièrement au sein d'une écloserie. Il apparaît important d'évaluer les risques que peuvent occasionner ces molécules dans cet environnement. Par conséquent, il est nécessaire de vérifier leur innocuité à différentes échelles, sur différents organismes (unicellulaires, pluricellulaires) représentant différents niveaux trophiques. Il est également crucial d'évaluer la rémanence de ces peptides afin d'éviter leur persistance dans l'environnement. Il est primordial que l'alternative proposée à l'entreprise soit, dans le cadre d'une application industrielle, à la fois efficace pour diminuer la charge bactérienne tout en étant respectueuse de l'environnement.

B. Etude du peptide K4 en milieu marin

K4 est un peptide antibactérien *de novo* (Duval et al. 2009). Ce peptide a été développé sur la base de critères communs aux PAMs d'origine naturelle. Ces PAMs sont regroupés dans des bases de données comme APD, disponible en ligne (Wang and Wang 2004). Une fois synthétisé, le potentiel antibactérien de K4 a été validé par l'outil de prédiction disponible sur APD. Ce potentiel antibactérien a été conforté par des tests *in vitro*. Le peptide K4 est un peptide actif sur différentes bactéries pathogènes humaines et notamment sur des bactéries à Gram-négative du genre *Vibrio* (Duval et al. 2009).

Bien que ce peptide n'ait pas d'homologie de séquence avec d'autres PAMs connus, ce peptide de 14 acides aminés, possède des propriétés physico-chimiques associés aux pouvoirs antibactériens. Le peptide K4 est amphipatique. Il comporte une région N-terminale polaire avec 4 lysines qui apportent au peptide une charge positive nette de +4 et une région C-terminale composée majoritairement de résidus hydrophobes (Phe, Leu). Le peptide K4 est qualifié de « detergent-like » (Legrand et al. 2011). Grâce à des analyses par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), Legrand et collaborateurs (2011) ont déterminé la structure tridimensionnelle de K4 en utilisant plusieurs types de modèles membranaires (les micelles de détergents et les petites vésicules unilamellaires (SUV)). L'étude du peptide en présence de ces modèles membranaires vise à reproduire l'environnement naturel d'une membrane bactérienne. Les résultats montrent que la région hydrophobe située du côté C-terminale forme une hélice alpha qui ne s'étend pas à l'ensemble du peptide. Cette hélice est en effet séparée de la région N-terminale (hydrophile) qui n'a pas de configuration particulière par une proline qui coude le peptide (Figure 50).

En combinant des mesures de dichroïsme circulaire, de diffusion dynamique de la lumière et des observations réalisées en microscopie électronique Legrand et collaborateurs (2011) ont proposé un mode d'action du peptide K4. A la manière d'un mécanisme de « carpet like » les peptides chargés positivement se lient rapidement aux charges négatives de la membrane bactérienne (Legrand et al. 2011). La région hydrophobe de K4 lui permet d'interagir avec les lipides et conduit à la formation de microsomes, des mixes de lipides et peptides. Cette interaction lipides-peptides engendre alors une dénaturation de la membrane bactérienne induisant la mort cellulaire (Legrand et al. 2011). A côté de l'activité antibactérienne de K4, l'effet du peptide sur des cellules eucaryotes a également

été évalué. Les tests réalisés sur des érythrocytes de lapin ainsi que sur des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO-K1) montrent que K4 n'est pas toxique sur des cellules de mammifères (Duval et al. 2009). K4 a un spectre antibactérien sélectif ciblant en particulier des bactéries gram-négatives dont quelques *Vibrios*. Il est par ailleurs non toxique sur des cellules de mammifères. Toutes ces données présentent K4 comme un candidat intéressant pour une étude plus approfondie d'un PAM en milieu marin.

Etude du comportement et de la stabilité d'un PAM en milieu marin

Cette étude a permis d'évaluer le comportement de K4 en milieu marin et de déterminer le potentiel de ce peptide pour une utilisation en éclosion.

Les résultats de cette étude ont été intégrés dans une publication en cours de soumission dans la revue internationale "Probiotics and antimicrobial proteins". Un résumé des principaux résultats est présenté ci-dessous.

K4 est un peptide de novo avec une activité antibactérienne sur des pathogènes humains. Ce peptide est cationique, amphipathique et forme une hélice α . Actifs sur certains *Vibrios*, K4 a été étudié plus particulièrement en environnement marin. K4 a démontré son innocuité sur les organismes marins testés à différents stades de développement dont *Artemia salina*, *Dicentrarchus labrax* et *Magallana gigas*. Sur les organismes unicellulaires comme les micro-algues, K4 peut avoir une influence sur leur croissance notamment en fonction de la souche et de sa concentration. Par ailleurs, une approche originale couplant la chromatographie en phase liquide (RR-HPLC) et la spectrométrie de masse (MS / MS) a permis de suivre pour la première fois la cinétique de dégradation d'un peptide dans des conditions naturelles et en présence de naissain d'huîtres. La dégradation de K4 a été observée par l'apparition de ses formes tronquées au cours du temps et son absence chez les huîtres filtreuses. De plus, à l'aide d'un lecteur de densité optique automatisé la croissance de pathogènes d'organismes aquatiques a été évaluée en présence de K4. Les résultats se sont montrés intéressants pour les deux souches *Aeromonas salmonicida* et *Vibrio splendidus* LGP32 sur lesquels K4 est bactéricide à des concentrations inférieures à $45\mu\text{g.L}^{-1}$. Ensemble, ces résultats montrent que le peptide K4 pourrait être une alternative aux antibiotiques à la fois respectueuse de l'environnement et non toxique pour plusieurs organismes marins. L'utilisation de K4 serait particulièrement utile pour diminuer la charge bactérienne chez des animaux d'élevage à des stades précoces ainsi

qu'aux différents maillons de la chaîne alimentaire associée à l'élevage au sein de l'éclosion.

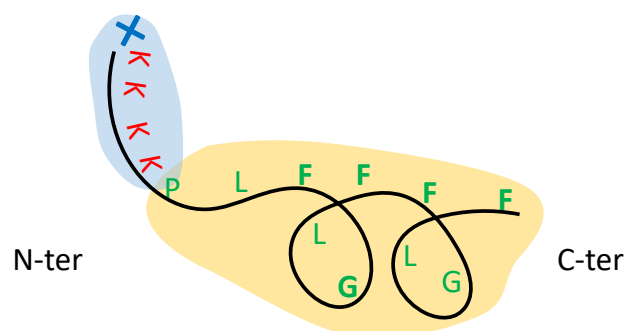


Figure 50 : Schéma du peptide K4 de ses propriétés physico-chimiques. En bleu la tête hydrophile. En jaune, la région lipophile. Les AA en rouge sont les résidus chargés positivement, les AA en verts sont les AA hydrophobe.

Behavior of antimicrobial peptide K4 in a marine environment

B Houyvet^{a,c}, A Leduc^a, V Cornet^a, J Pontin^b, L Benoist^a, B Bernay^b, J Henry^{a,b}, E Vetois^c, C Zatylny-Gaudin^{a*}

^aNormandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), 14032 Caen, France

^bPlateforme Proteogen, FF 4206 ICORE, Normandie Université, UNICAEN, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex, France

^cSATMAR, Société Atlantique de MARiculture, Gatteville, France

***Corresponding author:** C. Zatylny-Gaudin

E-mail address: celine.gaudin@unicaen.fr

Tel.: +33 2 31 56 55 96; fax: +33 2 31 56 53 46.

Keywords

Vibrio; Antimicrobial Peptide; Biodegradability; Aquaculture; Antibiotics

Abbreviations

AMPs	Antimicrobial peptides
TFA	Trifluoroacetic acid
MS	Mass spectrometry
RP-HPLC	Reverse-phase high-pressure liquid chromatography
MICs	Minimum inhibitory concentrations
CIP	Collection de l'Institut Pasteur

Abstract

K4 is a *de novo* peptide with antibacterial activity on human pathogens. It has a short sequence (14 amino acids) with a cationic N-terminal moiety and an amphipathic α -helix structure. The present paper demonstrates its activity on *Vibrio* bacteria in a marine environment. Besides, K4 was non-toxic on marine organisms at different developmental stages, including *Artemia salina*, *Dicentrarchus labrax*, *Magallana gigas*, but influenced the growth of unicellular organisms like microalgae, depending to the algal strain and on K4 concentration. Furthermore, an original approach coupling liquid chromatography (RP-

HPLC) and mass spectrometry (MS / MS) allowed us to monitor the degradation time course of the peptide for the first time in natural conditions, and also in oyster spat. We detected truncated forms over time, and the full K4 was gradually no longer found in filter-feeder oysters. Finally, using an automated optical density meter, we monitored the growth of several aquatic bacteria identified as pathogenic on previously studied animals. K4 had a bactericidal effect on *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio splendidus* LGP32 at concentrations below 45 µg.mL⁻¹. Our results show that K4 could be an environment-friendly alternative to antibiotics, non-toxic to several marine organisms. The use of K4 would be particularly useful to decrease the bacterial load associated with the early stages and the food chain of fish reared in hatcheries.

1. Introduction

K4 is a *de novo* peptide designed for antibacterial activity (Duval et al. 2009). It shares structural properties with antimicrobial peptides, including a short size (14 amino-acid residues), a positive net charge conferred by 4 lysine residues located at the N-ter end, and a hydrophobic nature conferred by the presence of proline, phenylalanine, glycine, and leucine. It is also thought to form an alpha-helix on its hydrophobic moiety (Legrand et al. 2011). It was previously described to inhibit the growth of several Gram-positive and Gram-negative bacteria (Duval et al. 2009). Among these bacteria, some are human pathogens like *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes*, inhibited by K4 concentrations of 6-12 µM and 12-24 µM, respectively. Others are marine bacteria like *Vibrio harveyi* or *Vibrio aestuarianus*, both inhibited by concentrations of 3-6 µM, and therefore more sensitive to K4 (Duval et al. 2009). Additionally, K4 did not induce hemolysis or cytotoxicity in mammal cells but was active on prokaryote cells (Duval et al. 2009). The aim of this work is to further investigate this peptide in the marine environment for potential use on the first developmental stages of marine organisms. In this context, we tested K4 against several aquatic bacteria, in particular on pathogenic marine *Vibrio* strains and *Aeromonas salmonicida*. Some *Vibrio* strains are associated to oyster diseases, like *Vibrio aestuarianus* (Labreuche et al. 2010) and *Vibrio splendidus* (Garnier et al. 2007; Labreuche et al. 2010; Rojas et al. 2015). Others are pathogenic to shrimp, like *Vibrio harveyi* (Karunasagar et al. 1994) and *Vibrio parahaemolyticus* (Kumar et al. 2014), while *Aeromonas salmonicida* is a well-known fish pathogen (Menanteau-Ledouble et al. 2016). We also tested K4 on *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulnificus*, two human pathogens transmitted by water or marine organisms (Johnston

et al. 1986; Mustapha et al. 2013). Besides, we bathed unicellular organisms (microalgae), and multicellular organisms belonging to Bivalvia, Crustaceans, or Teleosts in marine water containing K4. Microalgae are ecologically important unicellular organisms because they are primary producers. *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema marinoi*, and *Isochrysis lutea* partly make up the food of bivalvia (Blanchard et al. 2008; González-Araya et al. 2011; Da Costa et al. 2016) and crustacea branchipoda (HERAWATI et al. 2014); they were chosen to perform innocuousness evaluations. The effect of antimicrobial peptides (AMPs) has rarely been evaluated on microalgae. Only two algicidal activity studies were performed with AMPs derived from HP(2-20) secreted by *Helicobacter pylori* (Park et al. 2011b) and with a hybrid peptide that combined a peptide derived from HP(2-20) and the C-terminal end of mellitin (Park et al. 2016). Peptide K4 was also tested on multicellular organisms including brine shrimp (*Artemia salina*) at the nauplius stage before and after hatching and on oyster (*Magallana gigas*, formerly called *Crassostrea gigas*) spat and broodstock (Salvi and Mariottini 2016). The brine shrimp nauplius is a historically invertebrate model and one of the most often used in laboratory to assess toxicity of chemicals (Libralato et al. 2016). Their rapid development (24-72 hours from hatching to larvae) make them a useful model for short-term bioassays (Libralato et al. 2016). Moreover, hatching efficiency as well as larva mobility and mortality in the presence of chemical agents can be easily evaluated (Libralato et al. 2016). As for oyster, it is a filter-feeder, a bioaccumulation model sensitive to pollutants (Tanguy et al. 1999; Gagnaire et al. 2006). Both oysters and shrimp nauplii are consumers of the *Chaetoceros* and *Skeletonema* genus. Furthermore, brine shrimp is also an important aquafeed for crustacean and fish larvae, especially as it is relatively easy to produce (Sorgeloos et al. 2001a; Libralato et al. 2016). Finally, peptide K4 was also tested on European seabass larvae. *Dicentrarchus labrax* are secondary consumers that feed on live prey like rotifers and *Artemia* (Fontagné et al. 2000), and an economically important reared species. Besides, we monitored K4 in a marine environment in the presence of oyster spat to test its bioaccumulation properties. We used liquid chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry analysis to study its persistence or its degradation time course in these conditions. To our knowledge, this is the first time that an antimicrobial peptide has been studied in marine conditions. In the current environmental and consumption context, it appears crucial that newly developed molecules should be biodegradable to avoid biological effects on marine organisms such as fish feminization caused by oestrogen contaminants (Lange

et al. 2015; Huang et al. 2016; Geraudie et al. 2017). The overuse of antibiotics has led to the presence of residual antibiotics in marketed fish and shellfish products (Cabello 2006) which can make bacteria resistant against antibiotic treatment or toxic and allergenic for humans through passive consumption (Alderman and Hastings 1998a; Cabello et al. 2004).

In the present study, peptide K4 was investigated in the marine environment using different complementary approaches. Its efficiency on several pathogenic bacteria and its toxicity on different marine organisms was evaluated. Finally, its degradation time course in sea water in the presence of oysters was evaluated to demonstrate its biodegradability.

2. Materials and methods

2.1 Biological material

Oyster spat (1.6 - 2 mm) and broodstock, and microalgae including *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema marinoi*, and *Isochrysis lutea* were provided by SATMAR (Société ATLantique de MARiculture) hatchery, Gatteville, France. Seabass larvae (*Dicentrarchus labrax*) were provided by Aquastream (Ploemeur, France). Artemia nauplii were produced using Artemio Set® and Artemio mix® (JBL) according to JBL recommendations. Peptide K4 was chemically synthesized by Proteogenix (Schiltigheim, France) with $\geq 90\%$ purity.

2.2 Antibacterial assays

K4 minimal growth inhibition concentrations (MICs) were determined in triplicate on several marine bacteria supplied by the “Collection de l’Institut Pasteur” (CIP), namely *V. aestuarianus* (CIP 109791), *V. splendidus* (CIP 107715), *V. splendidus* LGP-32, *V. vulnificus* (CIP 109783), *V. alginolyticus* (CIP 109819), *Vibrio harveyi* (Ifremer), *V. parahaemolyticus* (CIP 105615), and *A. salmonicida* (CIP 103209T). Bacteria were cultured in marine broth (Conda) before antibacterial assays and in Saline Poor Broth medium for MIC determination (SPB: peptone 10 g L⁻¹, NaCl 15 g L⁻¹, pH 7.2). MICs were expressed in μM as an [a] - [b] concentration interval, with [a] the last concentration with microbial growth and [b] the first concentration with 100% growth inhibition. Assays were performed in triplicate using Bioscreen polystyrene honeycomb 100-well plates. One hundred μL of bacterial solution per well were grown to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.08

before adding sterile sea water for the control or 10 μL of K4 to obtain final concentrations of 1, 5, 10, 20, 30, 40 or 50 μM . Bacteria were incubated at 20°C or 25°C, with shaking (control set at “medium r.p.m” position). Bacterial growth was evaluated by measuring OD₆₀₀ values using an automated turbidimetry-based system (Bioscreen C, Labsystem, Helsinki, Finland). Measurements were acquired at regular 5-min intervals, 4 hours before adding the peptide and then for the next 20h.

2.3 *Effect of K4 on marine organisms*

2.3.1 *Evaluation of the effect on microalgae*

The effect of K4 on *C. calcitrans*, *S. marinoi*, and *I. lutea* growth was examined. All experiments were carried out in an algal incubator at 16°C under a 14 h:10 h light:dark cycle, with a light intensity of 100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Each experiment was carried out in triplicate in 96-well microtiter plates with 200 μL total volume per well. The peptide was introduced during the microalgae exponential growth phase at final concentrations of 10, 50, 100, and 250 μM . Peptide-free control cultures were maintained, but enriched with the sea water used to disperse the peptides. Absorbance values were measured in each well at 650 nm to estimate microalga growth after 72h of incubation.

2.3.2 *Evaluation of K4 innocuousness on oyster spat and broodstock*

K4 innocuousness was evaluated at 100 μM and 250 μM on oyster spat in triplicate (10 individuals per well) for 48 hours. Triton X-100 1% (Sigma, St Louis, MO, USA) was used as a mortality control, and sterile sea water as a healthy control. K4 innocuousness was also evaluated at 100 μM on 20 spawners in a volume of 10 liters at 12°C, i.e. the broodstock temperature before maturation. Another batch of 20 spawners was used in the absence of K4 as a healthy control. Mortality levels were recorded for 72 hours after the beginning of the experiment. No feed was brought during the experiment. No oxygenation was brought either to avoid peptide foaming in water. Feeding (including *C. calcitrans* and *I. lutea*) was delivered at the end of the experiment, and the spawners were monitored for the next two weeks to verify that no abnormal mass mortality occurred.

2.3.3 *Evaluation of K4 innocuousness on brine shrimp*

Brine shrimp nauplii and cysts were obtained using the JBL kit ArtemioMix™ combined with commercial aquafeed (JBL Artemiofluid®), and stored at 4°C in the dark before the experiment. *K4 innocuousness was evaluated at 100 μM and 250 μM on *Artemia salina**

cysts and nauplii. Experiments were performed in triplicate in 24-well plates (Multiwell™). Ten cysts or 10 nauplii were deposited in each well. The experiment started when K4 was added. Plates were incubated under constant lighting at room temperature, with slight shaking. The hatching rate (determined from the number of living nauplii) was evaluated after 48 hours of incubation. For nauplius experiments, the survival rate was evaluated based on larva mobility.

2.3.4 *Evaluation of K4 innocuousness on seabass larvae*

Experiments on seabass larvae were carried out at the LABRAX TECHAQUA® platform of AQUASTREAM (Ploemeur, France). K4 *innocuousness* was evaluated at 100 µM on 6-mm seabass larvae 2 days post hatch. One hundred larvae were incubated 72 hours at 14°C in a volume of 1L. The survival rate of the larvae in the presence of K4 was evaluated. No oxygenation was performed during the experiment to avoid peptide foaming in water.

2.4 *Time course of K4 degradation*

2.4.1 *K4 persistence in water and oysters*

K4 persistence in the presence of oyster spat (10 individuals per well) was monitored for 48 hours. K4 100µM was added in each well as described for the evaluation of innocuousness. One hundred µL of water from each triplicate well were collected and pooled to reach a final volume of 300 µL at each sampling time T0, T12, T24, and T48 hours. The water samples were acidified with 0.2% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma). Moreover, after 48 hours oyster spats were rinsed twice with sterile sea water, crushed and sonicated in TFA 0.1% for 5 min to evaluate K4 bioaccumulation. All samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4°C. Each supernatant was frozen at -80°C until analysis.

2.4.2 *RP-HPLC analysis*

HPLC analysis was performed with a Varian 4050 integrator connected to a Varian 9012 solvent delivery system and a Varian 9050 wavelength UV-VIS detector set at 214 nm. 125-µL samples were injected into a 200-µL injection loop. Separation was achieved on a C18 Column (MACHEREY-NAGEL, EC 250/4 NUCLEODUR® 100-5) with a linear acetonitrile gradient of 1.33% per minute from 0 to 60% at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The column was rinsed with the analytical gradient before each injection. One-minute fractions were collected at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and evaporated. MassLynx (v.4.1, Waters, Milford, MA, USA) was used to acquire UV detection at 214 nm. Mass

spectrometry analysis was performed from the HPLC fractions selected according to UV peak detection.

2.4.3 *Mass spectrometry*

MS experiments were carried out on a 5800-proteomics analyser (AB Sciex, Vaughan, Canada) equipped with TOF TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of Angiotensin I, Angiotensin II, Neurotensin, ACTH clip (1-17), ACTH clip (18-39) (LaserBio Labs, Université Nice-Sophia-Antipolis, France), and mass precision was better than 50 ppm. Dry samples were resuspended in 10 µL of 0.1% TFA. 1-µL volume of this peptide solution was mixed with 10-µL volumes of solutions of the CHCA matrix (LaserBio Labs) prepared in a diluent solution of 50% ACN (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France) with 0.1% TFA. The mixture was spotted on a stainless steel Opti-TOF™ 384 target; the droplet was allowed to evaporate before introducing the target into the mass spectrometer. All acquisitions were taken in automatic mode. A laser intensity of 3300 was typically applied for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1,000 single spectra (5 × 200) in the 700–4,000 Da mass range. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2,500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 4200. For tandem MS experiments, the acceleration voltage was 1 kV, and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings. The fragmentation pattern was used to determine the peptide sequence. Database searching was performed using the Mascot 2.4.0 program (Matrix Science, England). Two databases were used: a list of well-known contaminants (keratins and trypsin; 21 entries) and a database with a unique entry corresponding to the K4 peptide sequence: KKKKPLFGLFFGLF. Mass accuracy was set to 200 ppm and 0.6 Da in the MS and MS/MS modes, respectively. Finally, the intact and truncated forms of K4 detected by MS were listed and the hit of each amino acid was listed to monitor their stability.

2.4.4 *Statistical analysis*

Data were analysed using Prism5 (Graph Pad) software. Kruskal–Wallis test was used for statistical evaluation. Normality and homogeneity of data distribution were assessed with Shapiro–Wilk's test and Bartlett's test, respectively. Data that met normality criteria were tested using one-way ANOVA and post-hoc HSD Tukey's comparison test, while data that did not meet normality and/or homogeneity of variance were tested with Kruskal-Wallis

test and Wilcoxon's post-hoc pair-wise comparison test. P-values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Antibacterial assay

K4 antimicrobial activity on several bacteria is summarized in **Fig. 51**. Bacterial growth curves are presented in the presence/absence of the peptide. K4 inhibited at least 4 strains among those we tested. The highest antibacterial activity was on *V. splendidus*, *A. salmonicida* and *V. aestuarianus*, with MICs of 10-20µM (**Fig 51.A, B and C**). K4 also inhibited *V. splendidus* LGP32 growth, with a MIC of 20-30µM (**Fig 51.D**). *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* growth was not inhibited, suggesting that K4 has a selective antibacterial activity spectrum. Besides, the bioscreen automated turbidimeter allowed us to record the time taken for the peptide to inhibit bacterial growth. The effect on *A. salmonicida* was immediate (**Fig 51.B**), while it took 1 hour for K4 to act on *V. splendidus* and *V. aestuarianus* (**Fig 51.A and C**).

3.2 Effect of K4 on marine organisms

3.2.1 Microalgae

The results of microalgae exposure to K4 are reported in **Fig. 52**. K4 had a significant negative effect at all concentrations on *I. lutea* and *S. marinoi* growth (except at 10 µM). Besides, it had a negative effect on *C. calcitrans* growth at 100 µM and 250 µM but not at 10 µM and 50 µM.

3.2.2 Oyster spat and broodstock

No mortality of oyster broodstock was observed throughout the experiment in the presence of K4 at 100µM, including the 72 hours of the assay and the two following weeks. No mortality was observed on oyster spat. Mortality occurred only in the presence of

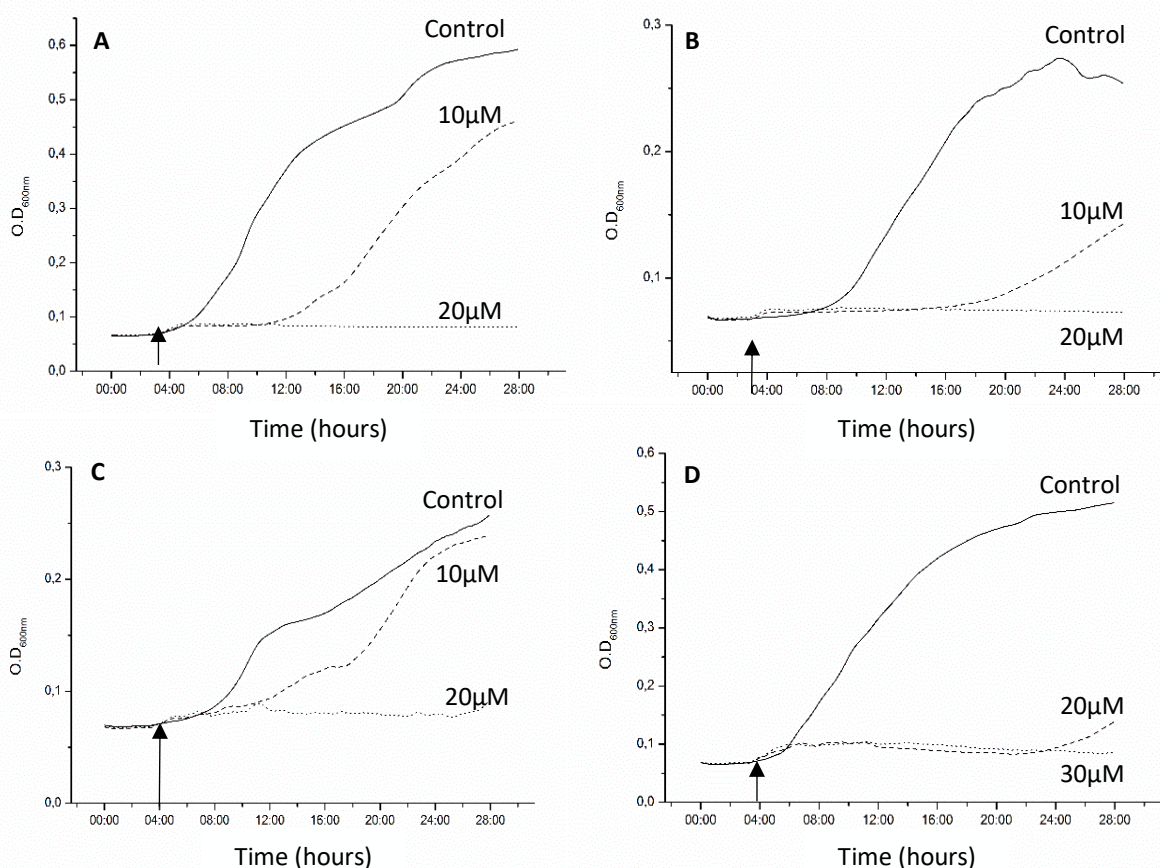


Fig. 51 Antibacterial activity of K4 on marine pathogens. Bacterial growth was monitored by optical density measurements at 600 nm, with one measurement every 5 minutes for 28 hours. The curves were selected and represented according to MICs, i.e. [a] - [b] concentration intervals where [a] was the last concentration with microbial growth and [b] was the first concentration with 100% growth inhibition. A: *Vibrio splendidus*; B: *Aeromonas salmonicida*; C: *Vibrio aestuarianus*; D: *Vibrio splendidus* LGP-32. Black arrows indicate when K4 was added.

Triton X-100, with only 3% of survival after 48h.

3.2.3 Brine shrimp: hatching and survival

The hatching rate was 50% for the control and 40% with K4 10 and 100 µM (**Fig. 53. A**). K4 did not significantly decrease the hatching rate of brine shrimp cysts, whereas Triton X-100 thoroughly inhibited it. K4 was also innocuous to nauplius larvae since their survival percentage was close to 100% after 48 hours (**Fig 53. B**), slightly but non-significantly greater than the control. As for Triton X-100, it induced 100% of nauplius mortality in the first 24 hours.

3.2.4 Seabass larvae

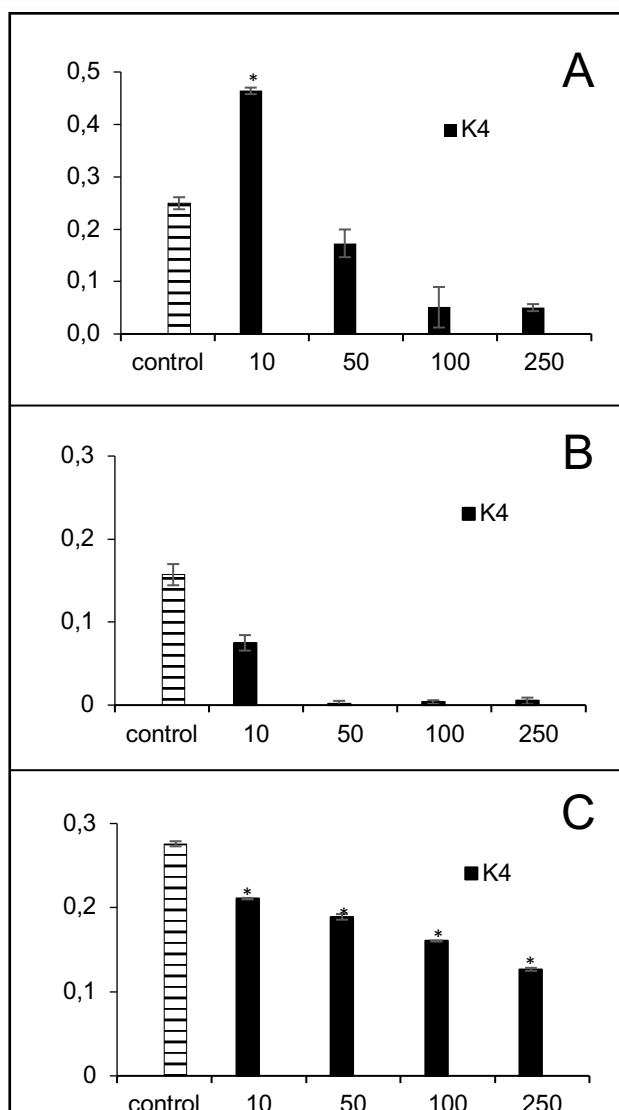


Fig. 52 Evaluation of microalgae growth in the presence of K4 at several concentrations expressed in μM . (A) *Chaetoceros calcitrans*, (B) *Skeletonema marinoi*, and (C) *Isochrysis lutea*. *: significantly different P value < 0.05.

The K4 assay on seabass larvae showed that it was innocuous at 100 μM (Fig. 54): the survival rate of larvae was non-significantly greater in the presence of K4 than in the control.

3.3 Time course of K4 degradation

The persistence of K4 in the presence of oyster spat was monitored by RP-HPLC-UV for 48 hours, and its presence at each sampling time was confirmed by mass spectrometry analysis. Chromatograms showing K4 evolution over time are presented in Fig. 55. They show a decrease of the absorbance signal for the K4-14 fraction corresponding to the

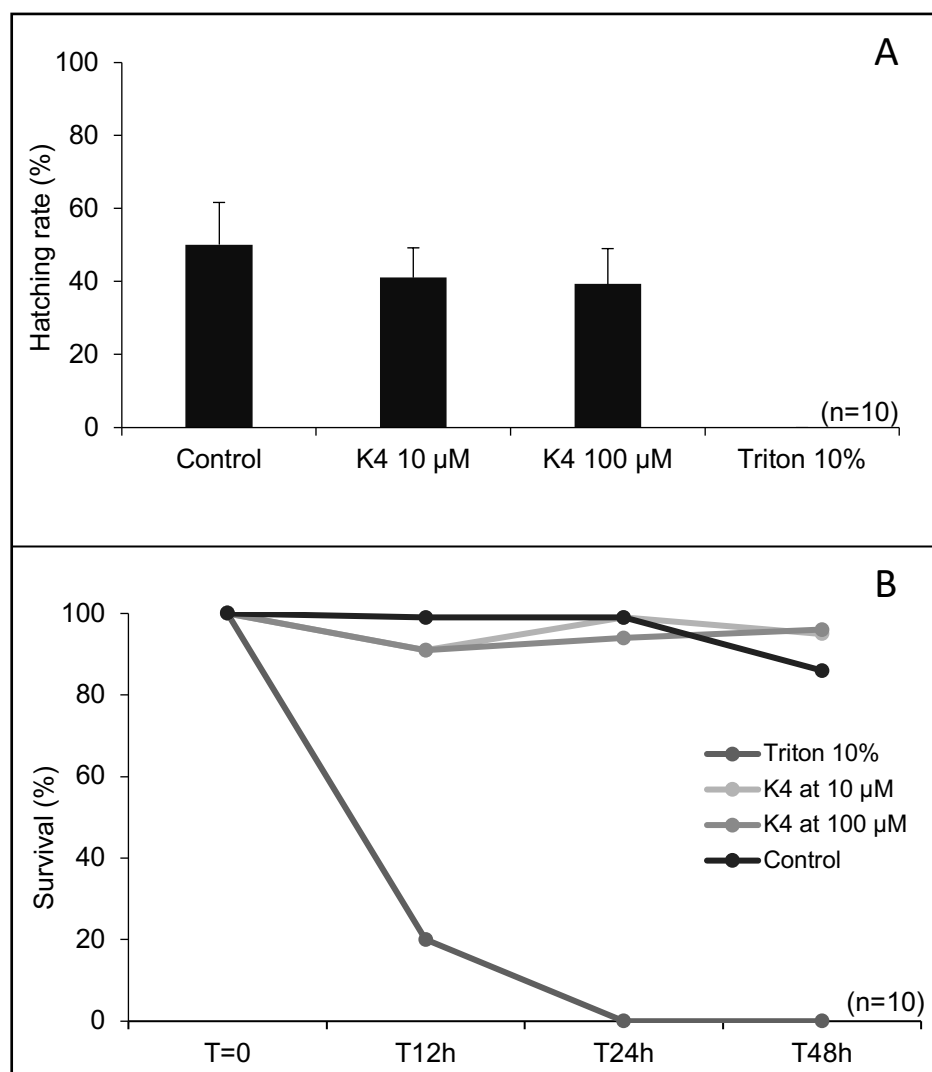


Fig. 53 Toxicity assay on brine shrimp *Artemia salina*. (A) Hatching rate (%) of brine shrimp cysts in the presence of K4 (10 and 100 µM), sea water (control), or Triton X-100 10%. (B) Survival (%) of brine shrimp nauplius larvae in the presence of K4 (10 and 100 µM), sea water (control), or Triton X-100 10%.

entire form of K4. After 48 hours, a low absorbance signal was detected for K4-14 (Fig 55.B). Moreover, new K4-7 and K4-5 peaks appeared, corresponding to truncated forms of K4 identified by MS/MS analysis.

All the truncated forms of K4 detected by mass spectrometry analysis are reported in Fig. 56, where they are ranked according to their time of emergence. Molecular weights ranged from 1,669.01 Da, which is the entire form of K4, to 561.34 Da (KPLFG), which corresponds to the smallest detected degraded form. The limit of detection of the mass spectrometer associating MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) precluded the identification of smaller peptides. A comparison of the N-ter and C-ter ends showed that degradation was not symmetric, with higher degradation at the C-ter end.

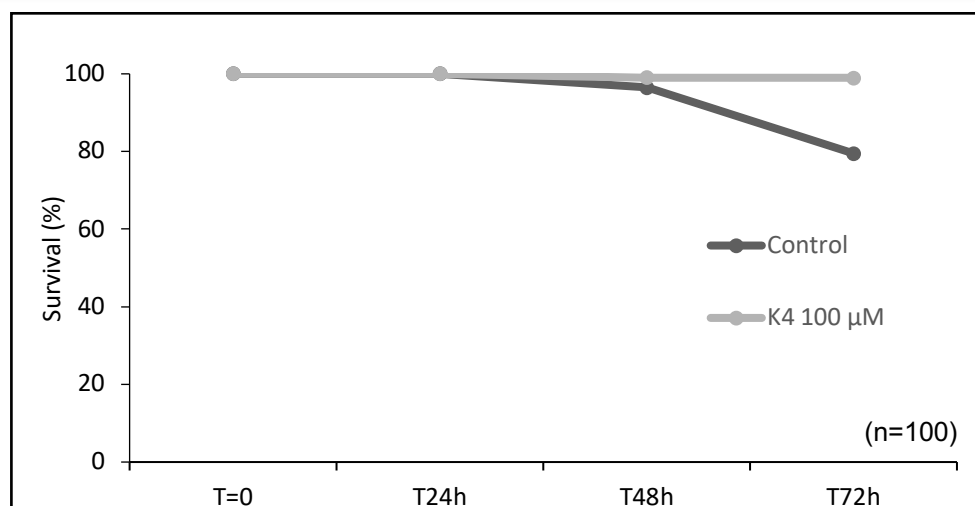


Fig. 54 Toxicity assay on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Larva survival (%) was evaluated in the presence of K4 (100 µM) or sea water (control). Due to a large amount of foam formed by K4 in water combined to the airflow, no oxygenation was provided during the experiment.

Finally, a few truncated forms of K4 were detected inside crushed oyster spat, indicating that the peptides had not bioaccumulated in oysters.

4. Discussion

K4 is a *de novo* peptide described by Duval and collaborators (Duval et al. 2009) as inhibiting pathogenic bacteria, especially on marine strains. The present study confirms its antibacterial activity on several aquatic, mainly marine bacteria, including *V. splendidus* LGP32, *V. aestuarianus*, and *A. salmonicida*. Other strains, like *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* are not susceptible to K4. In line with previous results (Duval et al. 2009), these results show that peptide K4 has a selective antibacterial activity spectrum that specifically targets oyster and fish pathogens. We evaluated the time course of the degradation of an antimicrobial peptide for the first time in a marine environment, in the presence of organisms like oyster spat. Using RP-HPLC and mass spectrometry analysis, we observed the rapid degradation of K4 over time. LC-MS analysis had already been used and validated to evaluate the stability of molecules in living organisms, in human plasma for example (Bakshi et al. 2001; Bakshi and Singh 2004), but never so far in a natural environment. The use of MS/MS analysis in this study made it possible to study the evolution of K4 sequences. Within 48 hours, the amount of K4 drastically decreased, until entire degradation was confirmed by MS/MS detection of smaller and smaller forms of the peptide (Fig. 56). This fast degradation is very promising for environmental safety. Otherwise, MS/MS analysis of oyster spat after incubation with K4 confirmed that K4 was degraded but not bioaccumulated by filter-feeder oysters. This property is a key advantage over antibiotics, which are bioaccumulated by shellfish

(Grigorakis and Rigos 2011). Most antibiotics are indeed persistent in the environment and found in residual amounts in marine products like shrimp or fish, as well as in sediment (Cabello 2006; BurrIDGE et al. 2010; Bermúdez-Almada and Espinosa-Plascencia 2012a), causing possible toxicity for consumers (Alderman and Hastings 1998b; Cabello

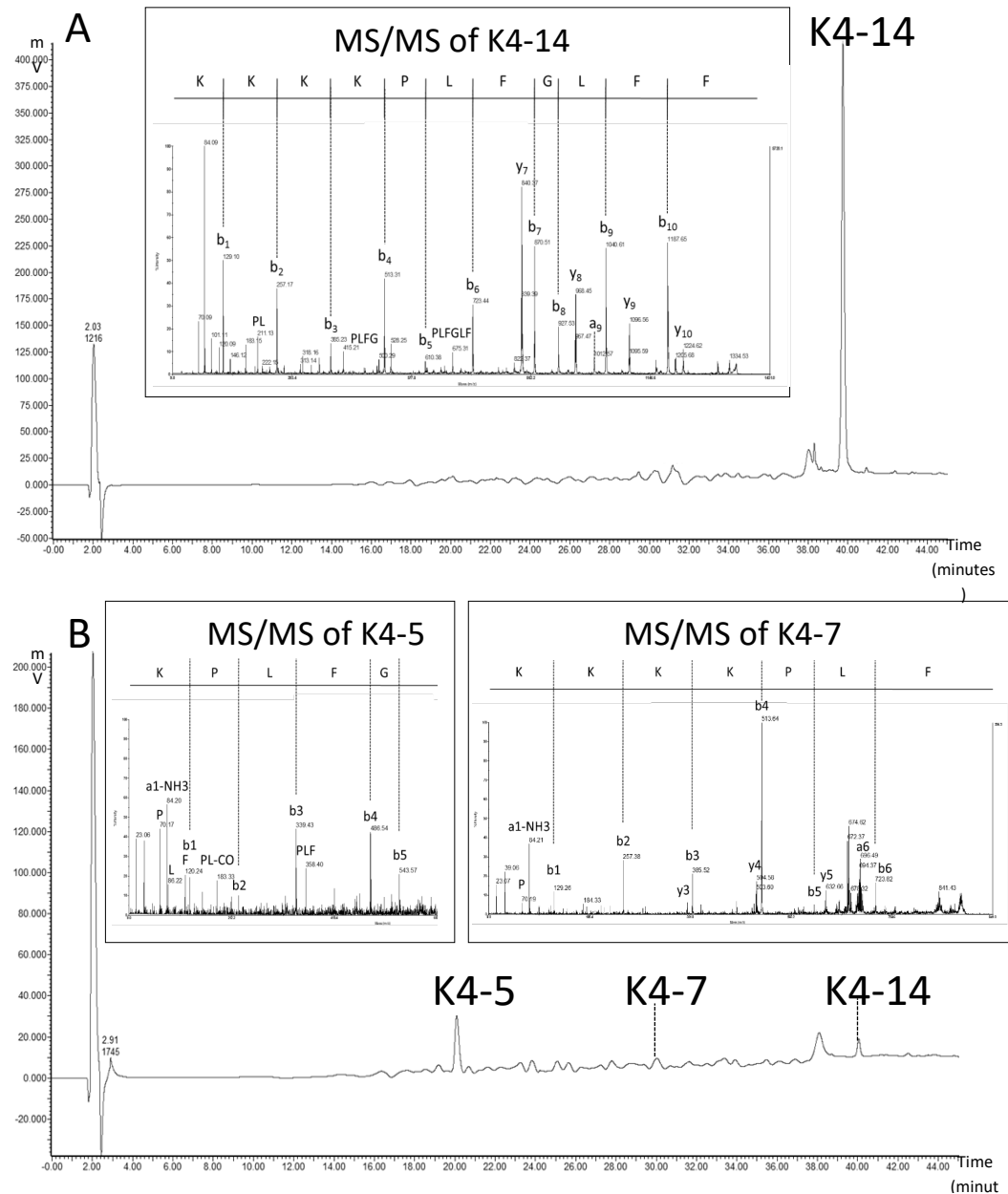


Fig. 55 Time course of K4 degradation in oyster spat in a marine environment. (A) Reverse-Phase HPLC chromatogram at T = 0 hour; the K4-14 peak corresponds to the entire form of K4. Its MS/MS spectrum is presented on the figure. (B) Reverse-Phase HPLC chromatogram at T = 48 hours; degraded forms of K4 (K4-7; K4-5) are presented with their respective MS/MS spectra.

et al. 2004). Furthermore, antibiotics persistence participates to the emergence of resistant bacteria, a major health issue (Done et al. 2015).

Time	K4 and its truncated forms	Residue number	MW	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G	L	F
T0	KKKKPLFGLFFGLF	14	1669,01	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G	L	F
T12	KKKKPLFGLFFGLF	14	1669,01	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G	L	F
	KKKKPLFGLFFG	12	1408,86	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G		
	KKKKPLFGLFF	11	1351,84	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F			
	KKKKPLFGLF	10	1204,77	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F				
	KPLFGLFFG	9	1024,57				K	P	L	F	G	L	F	F	G		
	KPLFGLFF	8	967,55				K	P	L	F	G	L	F	F			
	KKKKPLFG	8	944,62	K	K	K	K	P	L	F	G						
	KPLFGLF	7	820,48				K	P	L	F	G	L	F				
T24	KKKKPLFGLFFGLF	14	1669,01	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G	L	F
	KKKKPLFGLFFG	12	1408,86	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G		
	KKKKPLFGLFF	11	1351,84	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F			
	KKKKPLFGLF	10	1204,77	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F				
	KPLFGLFFG	9	1024,57				K	P	L	F	G	L	F	F	G		
	KKKKPLFGL	9	1057,70	K	K	K	K	P	L	F	G	L					
	KPLFGLFF	8	967,55				K	P	L	F	G	L	F	F			
	KPLFGLF	7	820,48				K	P	L	F	G	L	F				
	KKKKPLF	7	887,60	K	K	K	K	P	L	F							
	KKKPLF	6	887,60		K	K	K	P	L	F							
T48	KKKKPLFGLFFGLF	14	1669,01	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F	F	G	L	F
	KKKKPLFGLF	10	1204,77	K	K	K	K	P	L	F	G	L	F				
	KPLFGLFFG	9	1024,57				K	P	L	F	G	L	F	F	G		
	KKKKPLFGL	9	1057,70	K	K	K	K	P	L	F	G	L					
	KKKPLFGLF	9	1076,67		K	K	K	P	L	F	G	L	F				
	KKKPLFGL	8	929,61		K	K	K	P	L	F	G	L					
	KKPLFGLF	8	948,58			K	K	P	L	F	G	L	F				
	KKKKPLFG	8	944,62	K	K	K	K	P	L	F	G						
	KKKPLFG	7	816,52		K	K	K	P	L	F	G						
	KKKKPLF	7	887,60	K	K	K	K	P	L	F							
	KKPLFGL	7	801,51			K	K	P	L	F	G	L					
	KPLFGLF	7	820,48				K	P	L	F	G	L	F				
	KPLFG	5	561,34				K	P	L	F	G						

Fig. 56 Degradation of the N-ter and the C-ter ends of K4 over time. All the truncated forms as well as the entire form of K4 detected by mass spectrometry analysis are summarized for each time-point. The number of residues and the molecular weight of each form are also indicated.

Whether on oyster spat and broodstock, fish larvae and also *Artemia* larvae, no toxicity was observed in the presence of K4 at 10 or 100µM. The latter concentration corresponded to 5-fold the MIC, suggesting a potential use of the peptide with these marine organisms.

However, this potential use has to integrate microalgae results. K4 can inhibit bacterial growth, but can also equally decrease microalgae growth at concentrations up to the observed MICs. Nevertheless, *C. calcitrans* growth was not impacted up to 50 µM K4, suggesting a selective algicidal activity spectrum for K4, similarly to peptides HPA3 and HPA3NT3 (Park et al. 2011b). These results on *C. calcitrans* do not prevent a potential use of K4 on oyster spat and broodstock.

Besides, K4 had no harmful effect on brine shrimp, it did not impact the hatching rate of cysts or the survival rate of nauplii. Nauplii are an important live food resource of predatory larvae in marine culture (Maximus 1988; Banerjee et al. 2007). However, they are also the main source of bacteria (Sorgeloos et al. 2001b; Savas et al. 2005; Høj et al.

2009a) potentially detrimental for fish larva survival as in larval turbot (Maximus 1988). The need to produce more hygienic *Artemia* has led to the use of disinfectants like formaldehyde, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, or antibiotic agents (Sorgeloos et al. 2001b; Høj et al. 2009b). In this context, K4, which is non-toxic to brine shrimp and seabass larvae, could be used as a biodegradable alternative to reduce the bacterial load before larval feeding.

In shrimp aquaculture, there is an extensive overuse of antibiotics in larval and other growth phases to fight against diseases caused mainly by bacteria from the *Vibrio* genus (Bermúdez-Almada and Espinosa-Plascencia 2012b). In the last decades, the development of new means to fight diseases meeting both human health-friendly and environment-friendly requirements has become a major concern. At the marine field scale, K4 is a promising alternative when it comes to reducing the bacterial load. Of course, the production cost is one of the major obstacles for the use of antimicrobial peptides, especially when they are used for bathing. A targeted use in small rearing tanks for larval or juvenile stages would be more suitable.

Acknowledgements

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

Ethical Approval

All experiment procedures involving sea bass were conducted by the LABRAX TECHAQUA® platform of AQUASTREAM (Ploemeur, France) in compliance with the guidelines of the European Union Council (86/609/EU) for the use of laboratory animals.

Conclusion

Cette étude a permis d'appréhender le comportement ainsi que la stabilité d'un PAM de 14 résidus et de structure peu complexe dans l'environnement marin. S'il est parfois admis dans la littérature qu'une molécule de nature peptidique se dégrade rapidement de manière générale, cette étude est la première à apporter des éléments à ce sujet. De fait,

la cinétique de dégradation du peptide K4 a été suivie en milieu marin et en présence de naissain d'huîtres. Par les approches couplées de chromatographie liquide (RP-HPLC) et de spectrométrie de masse (MS/MS), la dégradation de K4 a pu être visualisée au cours du temps grâce à la détection de formes tronquées. Par ailleurs les analyses des huîtres montrent que le peptide K4 n'est pas bioaccumulé par cet organisme filtreur, seules des formes dégradées ont été observées. Ces données sont corrélées avec le signal d'absorbance correspondant à la forme entière de K4 obtenue en RP-HPLC-UV, qui montre une extinction presque complète à 48H et l'apparition d'autres pics d'absorbance correspondant aux produits de dégradation de K4.

Cette dégradation rapide est d'autant plus intéressante que le peptide K4 agit très rapidement sur certaines bactéries pathogènes d'organismes aquatiques tels que les huîtres et les poissons. En quelques minutes à une heure, K4 est bactéricide sur des souches comme *Aeromonas salmonicida* ou *Vibrio splendidus* LGP32. Bien que le peptide se dégrade au cours du temps, il agit de manière suffisamment rapide. C'est un avantage certain vis-à-vis des antibiotiques dont la stabilité dans l'environnement participe à l'émergence de bactéries résistantes.

Par ailleurs, K4 est un peptide qui n'entraîne pas de toxicité chez des organismes pluricellulaires d'origine marine. K4 a été testé sur des larves d'Artémia et de bar et aussi sur des huîtres au stade naissain et au stade adulte. Quel que soit le compartiment trophique auquel chacun des organismes appartient, K4 n'a pas entraîné de toxicité. Néanmoins sur des organismes unicellulaires comme les microalgues, K4 peut influencer la croissance de certaines souches. Toutefois, toutes les souches testées n'ont pas été affectées de la même manière. *Chaeotoceros calcitrans* par exemple n'est pas affecté par K4 pour les concentrations bactéricides du peptide.

Les travaux menés avec le peptide K4 montrent qu'un PAM doit être évalué sur tous les maillons de la chaîne alimentaire nécessaires au bon déroulement du parcours zootechnique. Un « cahier des charges » se dessine sur les attentes que nous pouvons avoir pour qu'un peptide puisse être validé pour une utilisation en éclosion. Des améliorations peuvent être évidemment apportées. Effectivement, si ces travaux mettent en garde sur le fait qu'un peptide puisse influencer la croissance de microalgues, il faudrait surtout vérifier leur effet direct. C'est dire qu'il faut déterminer si un peptide peut dénaturer l'intégrité physique d'une cellule de microalgue de la même manière qu'il agit

très rapidement sur certaines bactéries. Par ailleurs, pour une étude spécialisée sur l'usage de PAMs en éclosérie d'huîtres il pourrait être intéressant de contrôler davantage l'effet du peptide sur le naissain. En tant qu'organisme suspensivore, suivre des paramètres physiologiques comme le taux de filtration permettrait d'évaluer l'innocuité des peptides candidats.

C. Vers un transfert de PAMs en éclosionerie

1. Introduction

1.1. La SATMAR

La SATMAR ou Société ATLantique de MARiculture, est une société anonyme spécialisée dans la conchyliculture. Installée en 1972, il s'agit de la plus ancienne éclosionerie implantée en France. Cette société est en mesure de fournir du naissain d'huîtres, des huîtres prégrossies ainsi que des huîtres de demi-élevage. Très rapidement la SATMAR s'est diversifiée et propose également du naissain de palourdes ainsi que des palourdes de taille marchande. Par ailleurs la production de la SATMAR repose sur 9 sites répartis sur l'ensemble des côtes françaises **Figure 57**. Cette large répartition est un élément déterminant pour la société puisqu'elle permet de satisfaire la demande constante de naissain toute au long de l'année. La production annuelle de la SATMAR est de 700 millions de naissains d'huîtres (équivalent = 6mm).

et demi de naissain d'huîtres, à côté, la société se positionne en tant que leader sur le



Figure 57 : Localisation des différents sites de la SATMAR. Les des sites sont localisés par un numéro ; 1: Gatteville, 2: Chausey, 3: Ile Tudy, 4: Saint Philibert, 5: Bouin, 6: Marennes, 7: Leucates, 8: Ladela, 9: Lestre. Les sites déjà certifiés par le label AB (Agriculture Biologique) sont présenté par le logo suivant 

marché français de la palourde d'élevage avec une production de 300 tonnes par an. Une

grande partie des ventes repose sur l'exportation. Forte de 45 ans d'expérience, la SATMAR est parmi les écloseries de mollusques l'une des plus importantes d'Europe. C'est une société qui œuvre continuellement dans le but de proposer des produits de qualité, qu'ils soient dédiés aux professionnels ou à l'exportation. C'est avec le respect de l'environnement et beaucoup de rigueur que les principaux sites de production de la société ont pu se voir attribuer la certification Agriculture Biologique [Figure 57](#).

1.2. Le site d'accueil de la SATMAR

Le site de Gatteville-phare, au Nord du Cotentin est l'un des 9 sites de la société ([Figure 57](#)). C'est le siège social et c'est historiquement le plus ancien site de la société. Il réunit l'ensemble du parcours zootechnique nécessaire à la culture de l'huître. Il dispose notamment d'une aire de conditionnement, d'une écloserie, d'une micronurserie et d'une nurserie. C'est également sur le site manchot que se trouve le pôle de recherche et développement. S'investir dans la recherche et le développement permet à la SATMAR de maintenir et d'améliorer la qualité de ses naissains et surtout de pérenniser sa production.

1.3. Le parcours Zootechnique

Il s'agit, sur la base de connaissances empiriques et scientifiques, de mettre en œuvre toutes les conditions favorables à la culture ou l'élevage d'animaux. Pour l'huître comme pour d'autres modèles, la connaissance du cycle de vie est un atout majeur, tout comme les besoins alimentaires, les températures optimales pour chacun des stades... Par ailleurs, la maîtrise de ces paramètres permet dans le cas de l'huître de produire du naissain toute l'année en conditions contrôlées. C'est un avantage au regard de l'approvisionnement par captage naturel qui ne se fait qu'une seule fois par an, si les conditions climatiques sont satisfaisantes.

A la SATMAR, le parcours zootechnique commence par la sélection des géniteurs, elle se fait sur la base de critères déterminés par l'entreprise. Les géniteurs sont conditionnés de façon à les rendre matures sexuellement. Cette étape est réalisée dans une aire de conditionnement en marge des autres étapes [Figure 58.A](#).

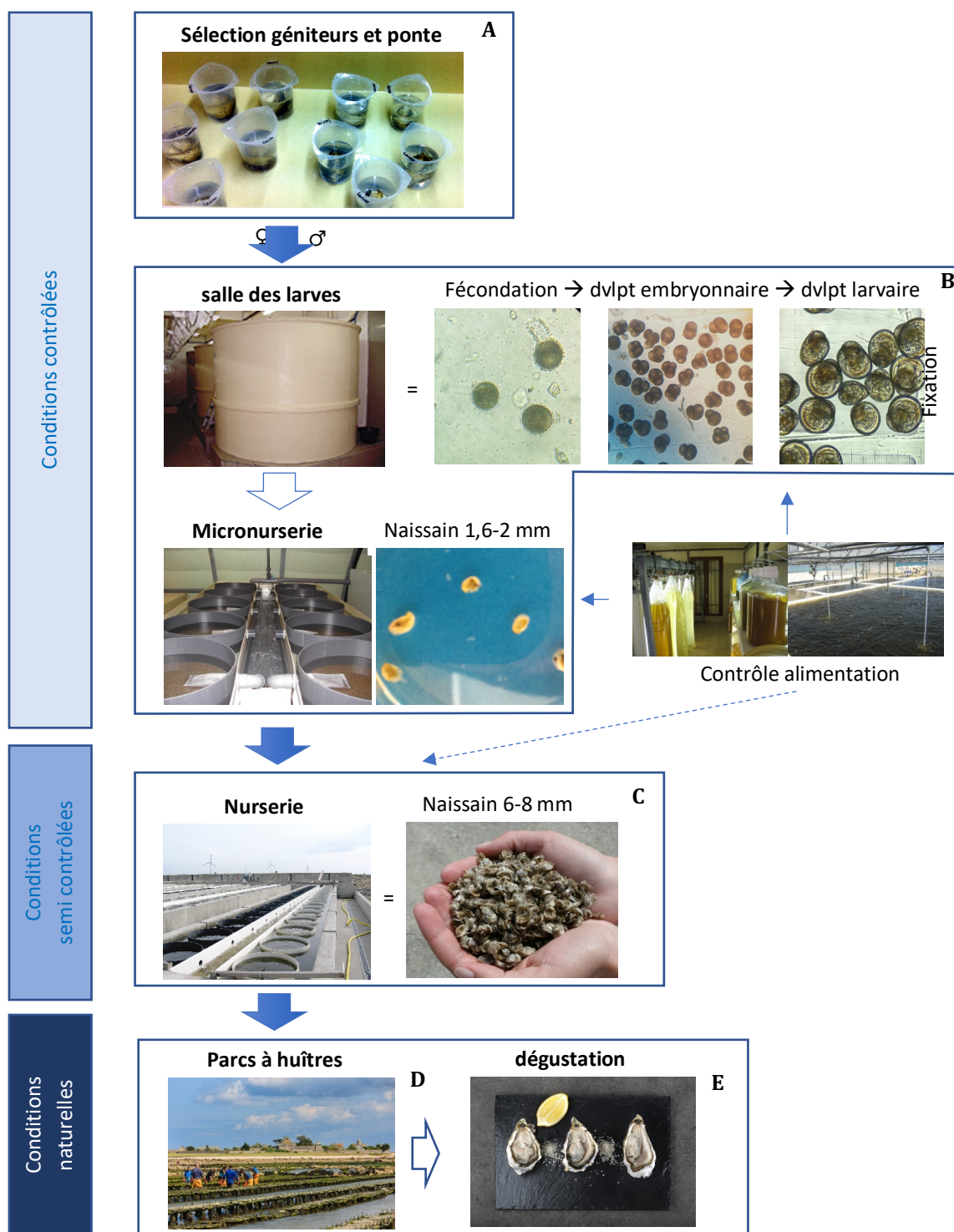


Figure 58 : Parcours zootechnique de l'huître. Dvlpt : développement.

Avec les températures et un apport nutritionnel adéquat, la maturation des géniteurs peut être réalisée en quelques semaines.

Une fois matures, les géniteurs sont stimulés de façon à émettre leurs gamètes. Cette étape se déroule dans l'éclosion. La fécondation, le développement embryonnaire ainsi que le développement larvaire se réalisent dans la salle des larves au sein de l'éclosion (Figure

58.B). Après avoir consommé leur réserve énergétique, les larves sont nourries et poursuivent leur développement. Pendant les 15 jours de leur cycle larvaire, les larves sont nageuses. A partir de 15 jours, elles développent un pied en plus de leur vélum : elles sont pédivéligères. Leur pied leur permet de se fixer sur un support (ex : microbrisure d'huîtres) et se métamorphoser. Une fois fixées, les huîtres sont appelées micronaissains.

Le grossissement du micronaissain se déroule en micronurserie, toujours dans l'écloserie (Figure 58.B). Le naissain qui a tout d'une huître adulte est nourri de façon à atteindre une taille idéale de 1,6 à 2 mm avant d'intégrer la nurserie. C'est une étape qui est relativement rapide entre 15 et 30 jours.

Toutes ses précédentes étapes se réalisent en conditions contrôlées, l'alimentation notamment est produite en autosuffisance.

Lorsque le naissain rejoint la nurserie, sa culture s'effectue dans un système semi-ouvert, en extérieur (Figure 58.C). Le contrôle des conditions est nettement moins important. Lorsque le naissain atteint une taille de 6 mm, il est directement vendu aux professionnels qui les disposeront sur leurs propres parcs comme illustré dans la Figure 58.D. Le naissain non vendu est transféré en parc de prégrossissement afin d'être vendu en tant qu'huîtres pré-grossies ou de demi-élevage.

Enfin, après deux à trois ans, et plusieurs kilomètres parcourus, les huîtres atteignent une taille marchande qui se décline de 0 à 4, 4 étant la plus petite taille vendue. Après une ouverture parfois délicate, les huîtres peuvent enfin être dégustées, nature, parfois accompagnées d'un filet de citron, elles sauront faire le bonheur de leurs amateurs Figure 58.E.

1.4. Transfert de PAMs en écloserie

Afin d'évaluer le potentiel des peptides sélectionnés pour une utilisation en écloserie nous avons mis en place une démarche qualité qui se décline en plusieurs phases illustrées par la figure 59. Il s'agit de vérifier l'innocuité des peptides sur les différents modèles d'études, sélectionnés en fonction du secteur d'utilisation potentiel. En parallèle la biodégradabilité des peptides est vérifiée.

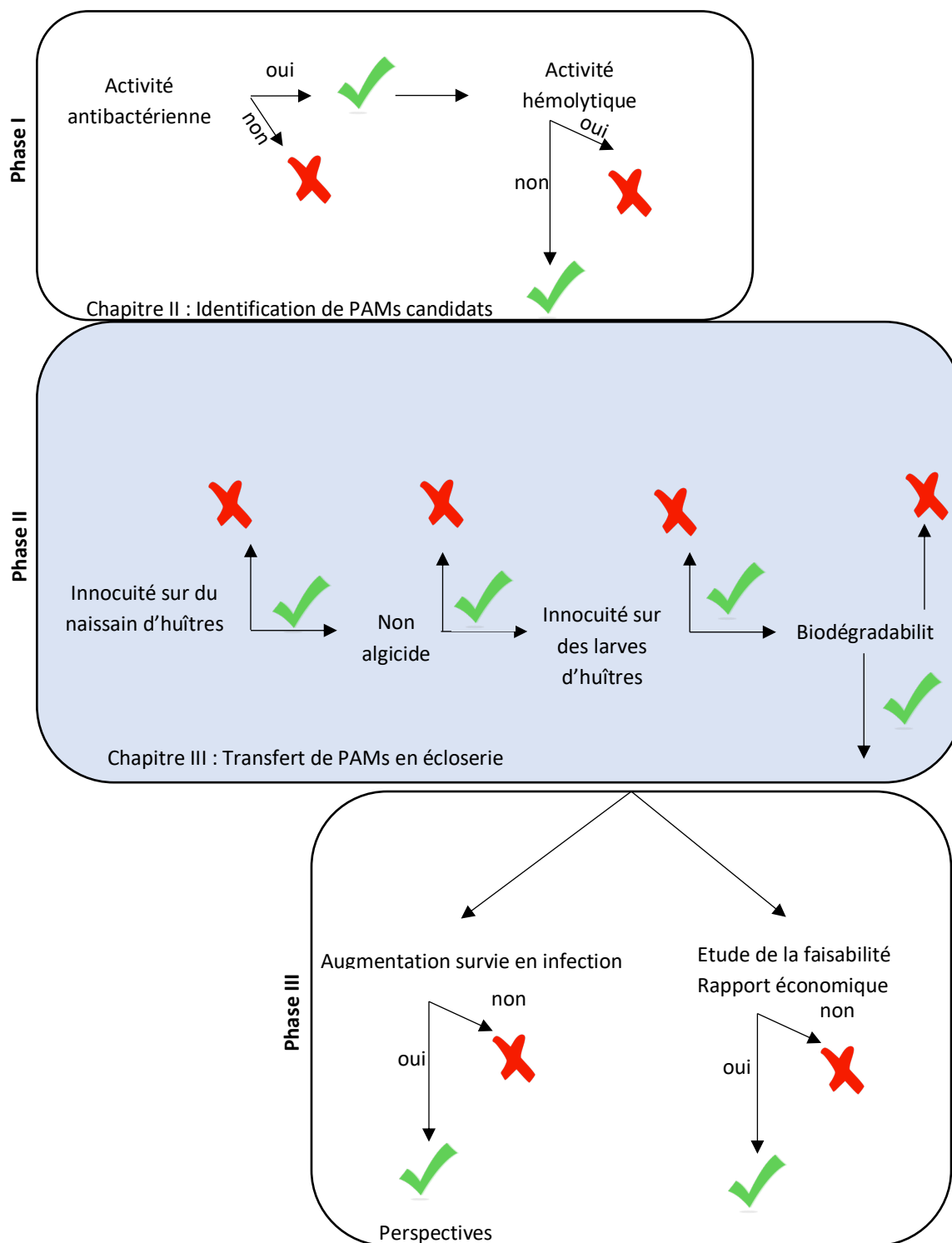


Figure 59 : Pipeline reprenant l'approche méthodologique mise en oeuvre pour évaluer le potentiel des PAMs en aquaculture et plus particulièrement en éclosionerie d'huîtres.

2. Approche méthodologique

2.1. Peptides candidats

Les peptides candidats pour une utilisation en éclosion ont été déterminés par les différentes approches menées dans les chapitres précédents. Seule une partie des études sur des peptides candidats est présentée dans ce chapitre, celles réalisées avec les peptides KY₁₅, GK₁₆, KT₁₉, WK₂₀ et GR₂₁, identifiés dans le chapitre II.

2.2. Innocuité des peptides candidats sur du naissain d'huîtres

L'ensemble des peptides a été testé en laboratoire sur du naissain d'huîtres de taille inférieure à 6mm. Il s'agit du dernier stade présent en éclosion avant la mise sur les parcs. À ce stade, le naissain est très facile à manipuler, pour cette raison l'innocuité des peptides a été vérifiée au laboratoire. L'expérimentation est réalisée en triplicat en plaque 24 puits (nunc) dans une salle thermostatée à 18°C. 10 individus sont placés dans chacun des puits contenant 1mL d'eau de mer stérile. A T0 les peptides sont ajoutés dans les puits de façon à obtenir une concentration finale de 100 et 200 µM. Le triton 1% et le peptide FG₂₃ à 100 et 200 µM sont utilisés comme contrôle de mortalité et l'eau de mer comme contrôle positif. Le peptide FG 23 ou moronecidine (PAM caractérisé chez *Pagrus major*) est un peptide qui induit 100% d'hémolyse comme le triton. Il est apparu intéressant de déterminer si un PAM pouvait être toxique et mortel pour un organisme. Au vu de son effet sur le naissain FG₂₃ peut servir de contrôle peptidique pour suivre la toxicité d'un peptide. Le suivi de mortalité est réalisé sur 48 heures par les approches complémentaires suivantes.

Evaluation de l'état physiologique du naissain

a) Test de filtration du rouge neutre

Après 24 heures d'incubation, 10 µL d'une solution mère (5mg/ml) de rouge neutre sont ajoutés dans chaque puits. 100 µL sont prélevés 6heures après afin de réaliser une lecture de densité optique à 540 nm et 650 nm. Le taux de filtration est ensuite déterminé.

b) Observations des mortalités à la loupe binoculaire

Après 48 heures d'incubation, chacune des huîtres (observée à la loupe binoculaire) a été stimulée à l'aide d'une pince Brussel, La fermeture instantanée des valves étant l'un des critères permettant de vérifier la survie du naissain.

2.3. Innocuité des peptides candidats sur des microalgues utilisées en éclosion d'huîtres

Chacun des peptides a été testé sur 3 souches de microalgues couramment utilisées en ostréiculture pour nourrir les huîtres. Il s'agit de *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis lutea* et *Skeletonema marinoi* fourni par la SATMAR. Les besoins alimentaires changent en fonction du développement des individus. Les 3 souches sélectionnées peuvent suffire à elles seules à couvrir l'ensemble du parcours zootechnique. L'expérimentation est réalisée sur 48h à 16°C avec une légère agitation. Les microalgues sont déposées dans chacun des puits à raison d'1mL de culture d'algue à 2×10^6 cells/mL. L'ajout des peptides à une concentration de 100 μ M et 200 μ M (10 fois et 20 fois les CMI de peptides) marque le début de l'expérimentation, les peptides K4 et FG₂₃ sont utilisés comme contrôles positifs. Des observations sont réalisées au microscope après 48 heures pour déterminer si les peptides ont eu un effet. Plusieurs critères sont utiles pour vérifier le bon état des microalgues : la forme, la couleur, l'intégrité de la paroi, la présence d'une libération de contenu cellulaire apparent, ou MEC (Matrice Extracellulaire), l'agglutination.

2.4. Innocuité des peptides candidats sur des larves d'huître

Pour des raisons pratiques, l'évaluation de l'innocuité des peptides sur les larves d'huîtres se déroule dans des structures de l'éclosion à la SATMAR. Les larves ont une taille de 118 μ m au début de l'expérimentation. Le test est réalisé dans des magnums en triplicat avec une concentration de 4000 larves.L⁻¹. Le volume de traitement est de 2 litres et la température de l'eau est de 24°C. Un léger bullage arrivant par le fond des magnums permet l'oxygénation de l'eau et évite également la sédimentation des larves. Les larves sont nourries 2 fois par jour avec 60mL d'un cocktail de microalgues composé de *Chaetoceros calcitrans* et d'*Isochrysis lutea* le premier jour (v/v : 1/1) le second jour (v/v : 3/1). Le début de l'expérimentation (T0) est marqué par l'ajout des peptides dans les lots expérimentaux à une concentration de 50 μ M. Des prélèvements d'eau sont réalisés à T0, T24 et T48 dans chacun des magnums des lots expérimentaux afin de suivre la cinétique de dégradation du peptide, les échantillons sont aussitôt acidifiés à 1% d'acide acétique puis congelés à -20°C en attendant d'être analysés. Un filtre de 50 μ m est utilisé pour les prélèvements d'eau afin de ne pas diminuer le nombre de larves. La mortalité de ces dernières est évaluée à T24 et à T48.

3. Résultats

Les travaux réalisés avec le peptide K4 ont permis de mettre en place une approche méthodologique (Figure 59). Cette approche méthodologique reprend les différentes

étapes qui permettent de valider les peptides candidats. Lorsqu'un peptide n'est pas validé lors d'une étape, il ne poursuit pas la suite des expérimentations. Les peptides KY₁₅, GK₁₆, KT₁₉, WK₂₀ et GR₂₁ sont les candidats pour utilisation en éclosion d'huîtres. Ces peptides avaient lors de la phase I (Figure 59) montré des activités antibactériennes à l'encontre des souches d'intérêt sans induire d'hémolyse sur les érythrocytes humains (Cf chapitre II).

Le naissain d'huîtres en présence de KY₁₅, GK₁₆, KT₁₉, WK₂₀ et GR₂₁

Le lot témoin a permis de déterminer le taux de filtration correspondant à une filtration de 100%. Les résultats de filtration obtenus pour les peptides testés sont reportés dans la figure 60. Tous les peptides testés à l'exception de KT₁₉ ne semblent pas avoir modifié la filtration du naissain d'huître à 100 µM (100%). En revanche, en présence du peptide KT₁₉, seul 30% du rouge neutre a été filtré. Pour la concentration supérieure de 200µM qui correspond à 4 fois ou plus aux CMI des peptides, nous observons une baisse générale du taux de filtration pour l'ensemble des peptides avec 50% pour KY₁₅, 80% pour GK₁₆, 70% pour WK₂₀ et 80% de filtration pour GR₂₁. Enfin, nous n'avons observé aucune filtration du rouge neutre par le naissain en présence de KT₁₉ suggérant une toxicité.

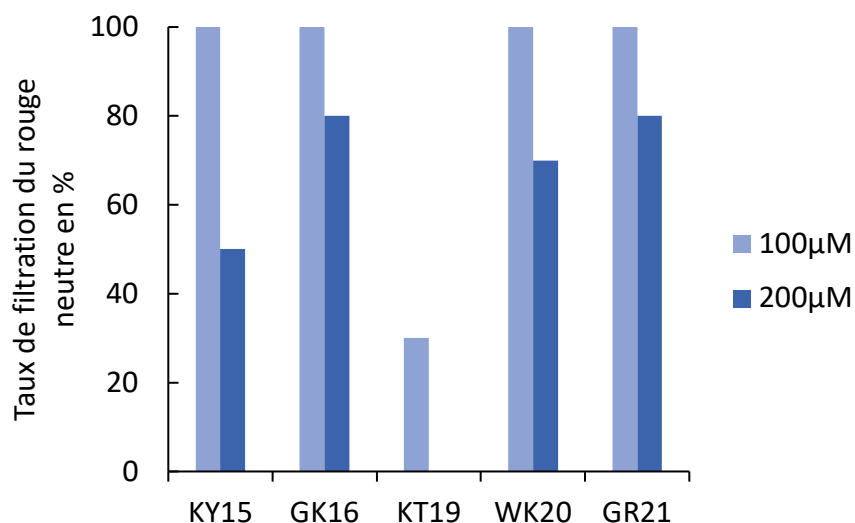


Figure 60 : Taux de filtration du rouge neutre par les huîtres au stade naissain (6mm) en présence des peptides KY₁₅, GK₁₆, KT₁₉, WK₂₀, et GR₂₁.

Par ailleurs, les observations de chaque individu réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire, nous ont permis de confirmer les résultats obtenus à l'aide du rouge neutre. Aucune mortalité n'a été observée en présence des peptides KY₁₅, GK₁₆, WK₂₀ et GR₂₁ durant l'expérimentation. Tout comme le contrôle négatif [figure 61.A](#), les individus se sont bien refermés après stimulation, la chair présente à l'intérieur de la coquille rougit par le rouge neutre est bien apparente ([Figure 61.D, E, F, G](#)).

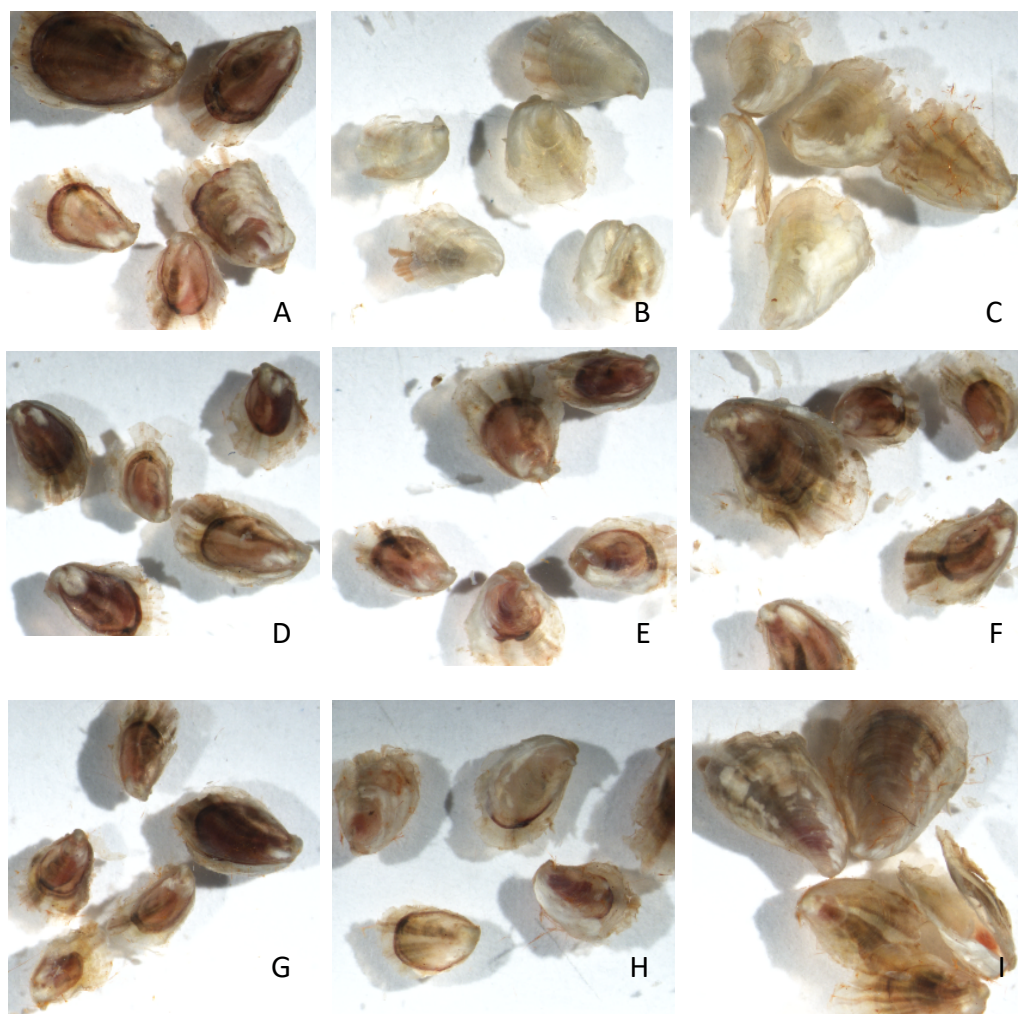


Figure 61 : Observation des huîtres au stade naissain (6mm) à la loupe binoculaire. (A) : Témoin, (B) : 1% de triton, en présence des peptides à 100µM (C) : FG₂₃, (D) : KY₁₅, (E) : GK₁₆, (F) : WK₂₀, (G) : GR₂₁, (H) KT₁₉ et à 200µM (I) : KT₁₉.

Le peptide FG₂₃ a été utilisé comme contrôle positif induisant rapidement la mort de naissain d'huîtres. Le triton 1% est un détergent synthétique, c'est un puissant tensio-actif couramment utilisé pour induire des mortalités. Pour FG₂₃ et le Triton aucun individu n'a survécu. Malgré la stimulation, les individus ne se referment pas. Par ailleurs, les coquilles

sont blanches et plus aucune chair n'est visible [Figure 61.B et C](#). Le naissain en présence de KT₁₉ présente les mêmes caractéristiques, les valves restant ouvertes [figure 61.I](#). Nous observons un éclaircissement au niveau de la coquille qui rappelle les observations faites pour les contrôles positifs [figure 61.H, I](#). L'effet toxique de KT₁₉ semble moins prononcé par rapport à celui du FG₂₃ ou du triton mais néanmoins il est suffisant pour induire la mortalité du naissain d'huître. L'effet du peptide KT₁₉ n'a donc pas été évalué dans les expérimentations suivantes .

Les microalgues en présence de KY₁₅, GK₁₆, WK₂₀ et GR₂₁

Les résultats montrant l'effet des peptides testés à 100µM sur les microalgues ont été reportés dans la [figure 62](#). L'observation globale du contrôle négatif montre que lorsqu'il n'y a pas de peptide un tapis se forme pour *Chaetoceros calcitrans* et *Skeletonema marinoï* ([Figure 62.A et B](#)). Cela est cohérent pour ces microalgues ou diatomées de la classe des Mediophyceae, ces dernières ayant tendance à sédimenter rapidement. En revanche *Isochrysis lutea* de la classe des Coccolithophyceae, est une microalgue capable de se déplacer grâce à deux flagelles. Pour ces raisons, il n'y pas de formation de tapis de microalgues comme observé précédemment ([Figure 62.C](#)).

Le peptide FG₂₃ entraîne l'élimination totale des cellules microalgales pour *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema marinoï* et *Isochrysis lutea* ([figure 62.A et B](#)). Toutefois, une coloration jaune est visible pour les puits correspondant à *Isochrysis lutea* [figure 62.C](#). Cette coloration est due à la libération des pigments. Cela confirme par ailleurs l'effet algicide de ce peptide. En revanche, nous n'observons pas cela pour les autres microalgues. Le cortège pigmentaire n'étant pas le même, il est probable que celui d'*Isochrysis lutea* soit moins sensible ou que les produits de dégradation de son cortège entraîne cette coloration.

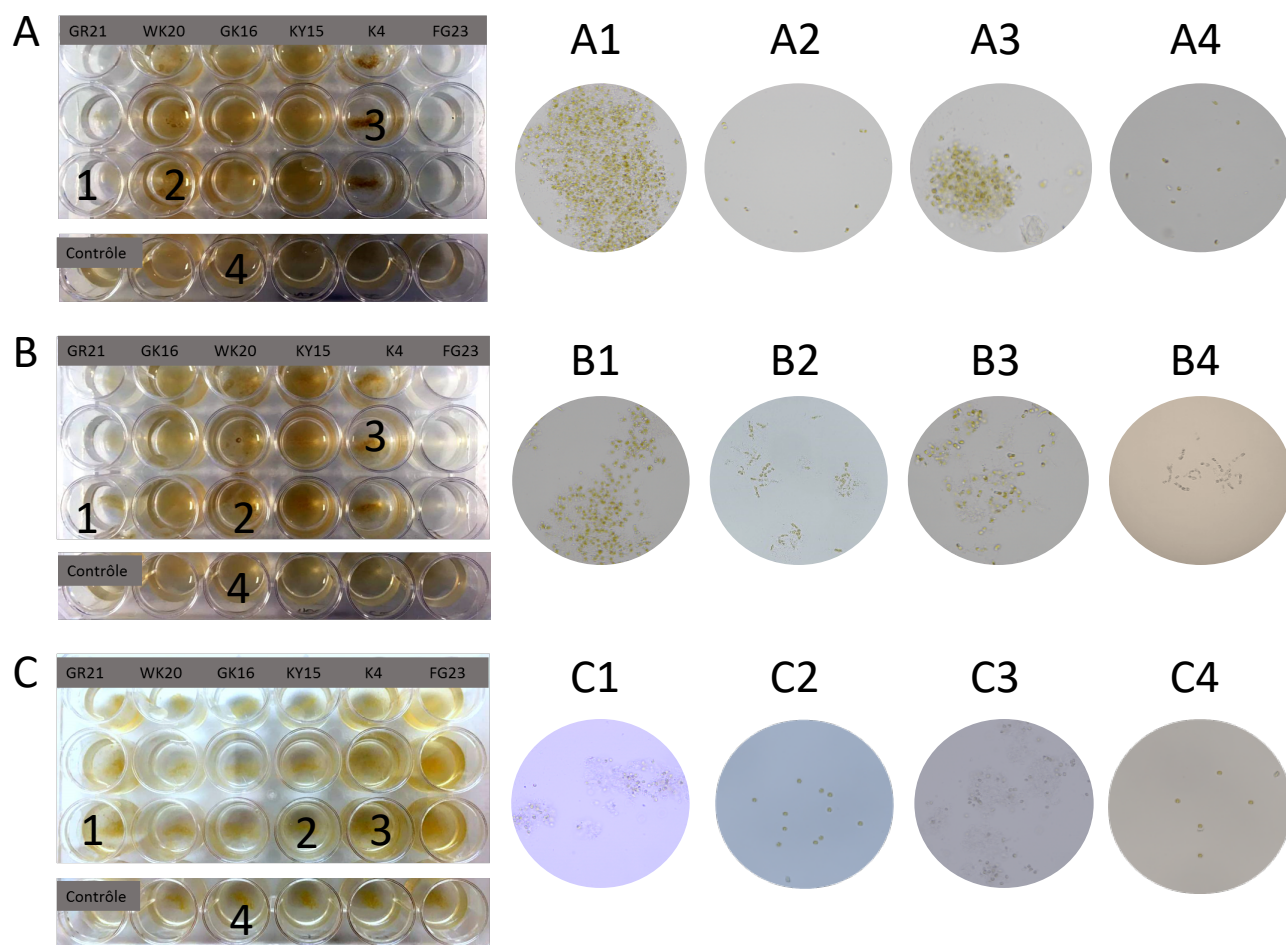


Figure 62: Effet des peptides sur les microalgues utilisées pour l'alimentation des huîtres. *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema marinoi*, *Isochrysis lutea* à 100 μ M.X40

Les peptides KY₁₅, GK₁₆ et WK₂₀ n'ont pas montré d'effet direct sur l'ensemble des microalgues testées **Figure 62.A, B et C**. Par ailleurs, les observations aux microscopes montrent que les peptides GK₁₆, WK₂₀ et KY₁₅ n'ont pas entraîné de modifications des cellules quelle que soit la souche testée **Figure 62 A2, B2 et C2**.

En revanche, le peptide GR₂₁ affecte directement les microalgues, le peptide entraîne notamment leur agglutination en **Figure 62.A1, B1 et C1**. Au sein de ces agrégats certaines cellules ont encore la coloration verte ou marron (en fonction de la souche) initiale tandis que d'autres sont transparentes. Il s'agit de cellules dont le contenu cellulaire a été libéré. GR₂₁ est capable de dénaturer l'intégrité physique des membranes des microalgues et entraîne leur lyse. Cela est notamment bien visible sur *Skeletonema* dont les cellules restent attachées entres elles après la division cellulaire (**Figure 62.B4**).

Les larves d'huîtres en présence de KY₁₅, GK₁₆ et WK₂₀

Des observations au microscope et des comptages ont été réalisés pour chaque condition, afin d'évaluer d'un point de vue morphologique la viabilité des larves d'une part, et le taux de mortalité d'autre part. Nous avons observé la formation d'une grande quantité de mousse avec la présence des peptides combinés au bullage comme l'illustre la [figure 63.A](#). Concernant l'analyse du lot témoin, nous observons que les larves se déplacent de manière vigoureuse et leur coloration indique qu'elles s'alimentent correctement [Figure 63.B](#).

Le comptage des larves n'a pas été possible en présence de chacun des peptides testés, des mortalités massives sont apparues dans les premières 24 heures, illustrées par la présence de larves ou coquilles au fond des magnums [Figure 63.C](#).

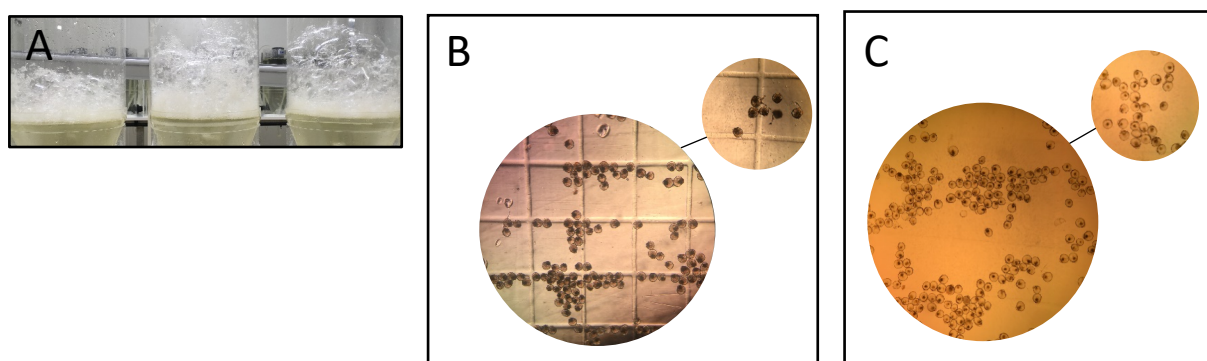


Figure 63: (A) formation de la mousse en présence des peptides au sein du dispositif expérimental. Observation au microscope de l'effet des peptides sur les larves d'huîtres. (B) les larves sans peptides (C) avec le peptide KY₁₅.

Dégradation de KY₁₅, GK₁₆ et WK₂₀

Les résultats de dégradation des peptides en présence des larves d'huîtres sont réunis dans la [Figure 64](#). Les analyses obtenues par spectrométrie de masse montrent les différentes masses mesurées pour chacun des peptides après 24 heures d'incubation en présence des larves d'huîtres. La dégradation des peptides s'observent par l'apparition de formes tronquées au cours du temps, à l'exception du peptide KY₁₅ qui n'est plus visible à T24 [Figure 64.A](#) et dont aucune forme tronquée n'a pu être détectée. Les formes tronquées des peptide GK₁₆ et WK₂₀ ne sont pas visibles afin de ne pas dévoiler leur séquence. Ces analyses montrent que chaque peptide a un profil de dégradation différent. Les masses des formes complètes de GK₁₆ et WK₂₀ sont détectées à T24h [Figure 64.B, C](#) et les séquences ont été confirmées par analyses MS/MS (données non disponibles). Leurs

formes tronquées sont détectées à T24 heures mais plus aucune d'entre elles ne sont détectées à 48 heures. Pour GK₁₆ la plus petite forme tronquée visible a une masse de 589 Da et contient les 6 acides aminés situés en région N-terminal du peptide. Par ailleurs toutes les autres formes détectées de GK₁₆ contiennent toujours les acides aminés de la région N-terminale. Cela suggère que le peptide GK₁₆ se dégrade principalement par la région C-terminale. Pour WK₂₀, la plus petite masse détectée possède une masse de 781

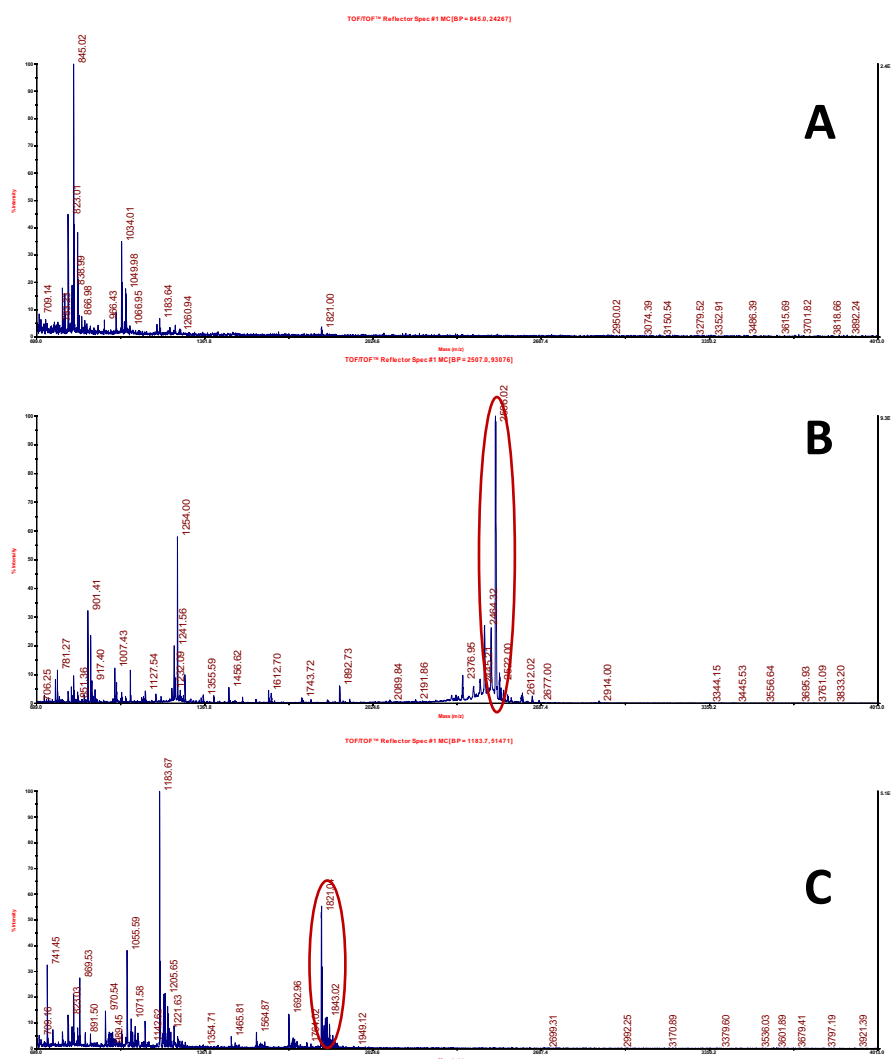


Figure 64: Spectres de masse obtenus à partir de l'analyse de l'eau de baignade des larves en présence des peptides : (A) KY₁₅ ; (B) WK₂₀ ; (C) GK₁₆ après 24h d'expérimentation. Le cercle rouge indique le pic correspondant à la forme entière des peptides étudiés.

Da. Parmi les formes tronquées détectées nous observons soit la moitié N-terminal soit la moitié C-terminale. La présence de deux résidus asparagines au centre de la séquence de WK₂₀ pourrait être la cible de clivages enzymatiques. KY₁₅ semble se dégrader plus

rapidement que les autres peptides. Les limites de détection du spectromètre de masse ne permettant pas d'identifier ou difficilement des fragments d'une masse inférieure à 700Da, il n'est pas exclu qu'il existe des formes tronquées non détectées notamment pour le peptide KY₁₅. La plus petite forme de GK₁₆ est un contre exemple puisque sa masse est inférieure au seuil théorique de détection. Toutefois, il est possible que ce peptide se ionise plus facilement ce qui permettrait une meilleure détection que le peptide KY₁₅.

Enfin cette analyse montre que les peptides se dégradent en moins de 48 heures voir moins de 24 heures. Dans la mesure où l'expérience sur les larves doit être refaite de façon à supprimer la formation de mousse, il serait intéressant d'effectuer des points supplémentaires de prélèvements comme à 6 et 12 heures pour bien appréhender la vitesse de disparition du peptide KY₁₅.

4. Discussion

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que la démarche de qualité que nous avons mise en œuvre, permet de détecter les peptides pouvant être toxiques. C'est le cas par exemple du peptide KT₁₉ qui induit la mort du naissain d'huître et du peptide GR₂₁ qui entraîne l'agglutination des microalgues ainsi que leur lyse cellulaire.

Les microalgues étant au cœur de ce parcours zootechnique, il apparaît important que le peptide soit compatible avec l'alimentation. C'est le cas des 3 peptides KY₁₅, GK₁₆ et WK₂₀. La présence de ces peptides n'entraîne pas d'effet néfaste à l'encontre des différentes souches de microalgues testées. Par ailleurs, ces 3 peptides ont également montré leur innocuité sur le naissain d'huître. En revanche, l'utilisation des peptides KY₁₅, GK₁₆ et WK₂₀ semble néfaste sur les larves d'huîtres (Figure 63.C) probablement par leur effet moussant. Le caractère amphipathique de ces PAMs leur confère probablement un comportement « detergent-like » qui conduit à la formation de mousses en condition acqueuse (communication personnelle). Par ailleurs, aucune étude ne reporte ce type d'observation avec les PAMs dans la littérature. Cependant des problèmes de mousses sont récurrents dans le milieu industriel puisqu'il existe des ouvrages portant sur l'utilisation d'agent anti-mousse (Garrett 1992).

Il serait intéressant de réaliser de nouveaux tests, peut être sans bullage afin d'évaluer réellement l'effet des peptides sur les larves.

Si pour le moment ces peptides ne sont pas recommandés pour un usage sur les larves, ils présentent toutefois un potentiel intéressant à d'autres stades ou étapes du parcours zootechnique. Avec une dégradation rapide (24 heures pour KY₁₅ à 48 heures pour GK₁₆ et WK₂₀), leur usage peut être envisagé en amont sur les microalgues par exemple, pour diminuer la charge bactérienne, ou sur les géniteurs issues de parcs ostréicoles (figure 64).

D. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de transférer des PAMs dans les structures d'une éclosion. Afin de préparer ce transfert, nous avons mené une étude préliminaire à partir du peptide K4. Un cahier des charges avant transfert a été établi sur la base des résultats obtenus avec ce peptide, ce dernier a pu être optimisé. La mesure de toxicité sur le naissain par filtration du rouge neutre ou l'observation de l'effet direct des peptides sur les microalgues en sont des exemples. Le peptide K4 étant algicide, il ne peut être utilisé au sein de ces structures. Néanmoins, l'effet algicide observé pour ce peptide ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation pour les PAMs. Cela avait été observé pour plusieurs peptides dont Hn-Mc-DWR qui a une activité algicide sélective sur les microalgues responsables de blooms toxiques telles que *Chattonella marina*, *Alexandrium catenella* ou encore *Cochlodinium polykrikoides* (Park et al. 2011). Les auteurs avaient alors noté l'intérêt de ce peptide dans la lutte contre les HABs (Harmful algal blooms). Ces HABs posent de réels problèmes notamment dans l'industrie aquacole. Ils peuvent être toxiques pour des espèces d'élevage, ou pour l'homme en cas de consommation de ressources aquacoles qui les accumulent comme l'huître, la moule ou la coquille Saint-Jacques (Landsberg 2002).

Les 3 peptides KY₁₅, WK₂₀ et GK₁₆ identifiés suite aux études menées dans le chapitre 2 ont franchi les différentes étapes de validation du cahier des charges mis en place. Toutefois, pour le moment l'utilisation de tous ces peptides ne semble pas être compatible avec les élevages larvaires du fait de l'effet moussant des peptides qui piège les larves. A la manière de K4, le caractère amphipathique de ces molécules entraîne un comportement proche de celui des détergents en milieu aqueux. C'est un problème récurrent en milieu industriel (Garrett 1992) qui peut être évité avec l'usage d'AFA, des agents « anti-foaming » autrement appelés « defoamer ». Il s'agit de molécules capables de réduire la formation de mousse au cours de procédés industriels. Lors de la fabrication d'éthanol

par fermentation de la canne à sucre, la formation de mousse est si importante que les producteurs ont eu recours à des agents anti-moussants (Nielsen et al. 2017). Toutefois, il semble que certains d'entre eux peuvent être toxiques et notamment sur les levures nécessaires à la fermentation (Nielsen et al. 2017). D'autres alternatives, comme les huiles végétales pourraient répondre à ce problème (Agre et al. 1955). Cela dit, l'usage d'AFA n'est à envisager qu'en dernier recours. Une intervention mécanique doit être privilégiée, comme la mise en place de nouvelles structures d'élevages sans bullage, qui pourrait diminuer l'effet moussant.

Par ailleurs, l'utilisation de KY₁₅, WK₂₀ et GK₁₆ peut être envisagée à d'autres stades de développement comme les stades de post-métamorphose ou pour les géniteurs chez qui l'effet moussant est bien moins impactant Figure 65. L'ensemble des travaux réalisés dans ce chapitre a permis d'obtenir les premiers résultats portant sur l'application de PAMs en conditions réelles en milieu aquacole. Le suivi de dégradation des peptides dans les conditions d'élevage est une approche originale. Elle a permis de démontrer la dégradation des 3 peptides KY₁₅, WK₂₀ et GK₁₆. Pour KY₁₅, la forme entière comme les formes tronquées n'ont pas été détectées après 24 heures suggérant une dégradation rapide du peptide en moins de 24h. Les formes entières ainsi que les formes tronquées de WK₂₀ et GK₁₆ sont détectées à 24h. Après 48 heures, plus aucune forme de ces deux peptides n'est détectée. Si la biodégradabilité des peptides est connue *in vivo* (Penchala et al. 2015), l'étude de la dégradation des peptides KY₁₅, WK₂₀, GK₁₆ et de K4 montre que ces molécules se dégradent également *ex vivo* dans le milieu naturel et notamment dans des structures d'élevages comme celles de l'écloserie. Si certains assurent sans preuve que les peptides se dégradent en milieu marin (Park et al. 2011), à notre connaissance cela n'avait jamais été démontré auparavant. C'est par ailleurs, un avantage conséquent vis-à-vis de beaucoup d'antibiotiques (Cabello et al. 2004; Cabello 2006; Kümmerer 2009) dont la persistance dans l'environnement accentue notamment l'acquisition de résistances chez les bactéries envers ces agents antibactériens (Alderman and Hastings 1998; Sapkota et al. 2008). Si la rapidité de dégradation des peptides peut apparaître comme un inconvénient vis-à-vis de leur utilisation, le temps d'action de ces derniers permet d'y remédier. Le temps d'action d'un peptide comme K4 est de l'ordre de quelques minutes à 1h (Figure 51), il a bien le temps d'agir sur les bactéries avant d'être dégradé. Ces résultats confortent l'idée que les PAMs pourraient être une alternative à l'utilisation des antibiotiques en aquaculture respectueuse de l'environnement.

Il serait intéressant d'évaluer le temps d'action des peptides KY₁₅, WK₂₀, et GK₁₆ pour confirmer si leur action est suffisamment rapide par rapport à leur dégradation. Pour KY₁₅ la cinétique de dégradation pourrait être déterminée à nouveau avec davantage de points de cinétiques puisqu'il se dégrade en moins de 24h. Par ailleurs, l'étude de la dégradation des peptides dans ces conditions pourrait être améliorée avec la quantification des formes complètes au cours du temps. Enfin, l'impact de ces peptides sur la charge bactérienne associée aux structures d'élevage sera déterminant pour l'utilisation de ces peptides en écloserie. Des essais préliminaires ont été réalisés et des mises au point doivent encore être apportées au niveau de la méthodologie et des structures expérimentales pour confirmer leur efficacité.

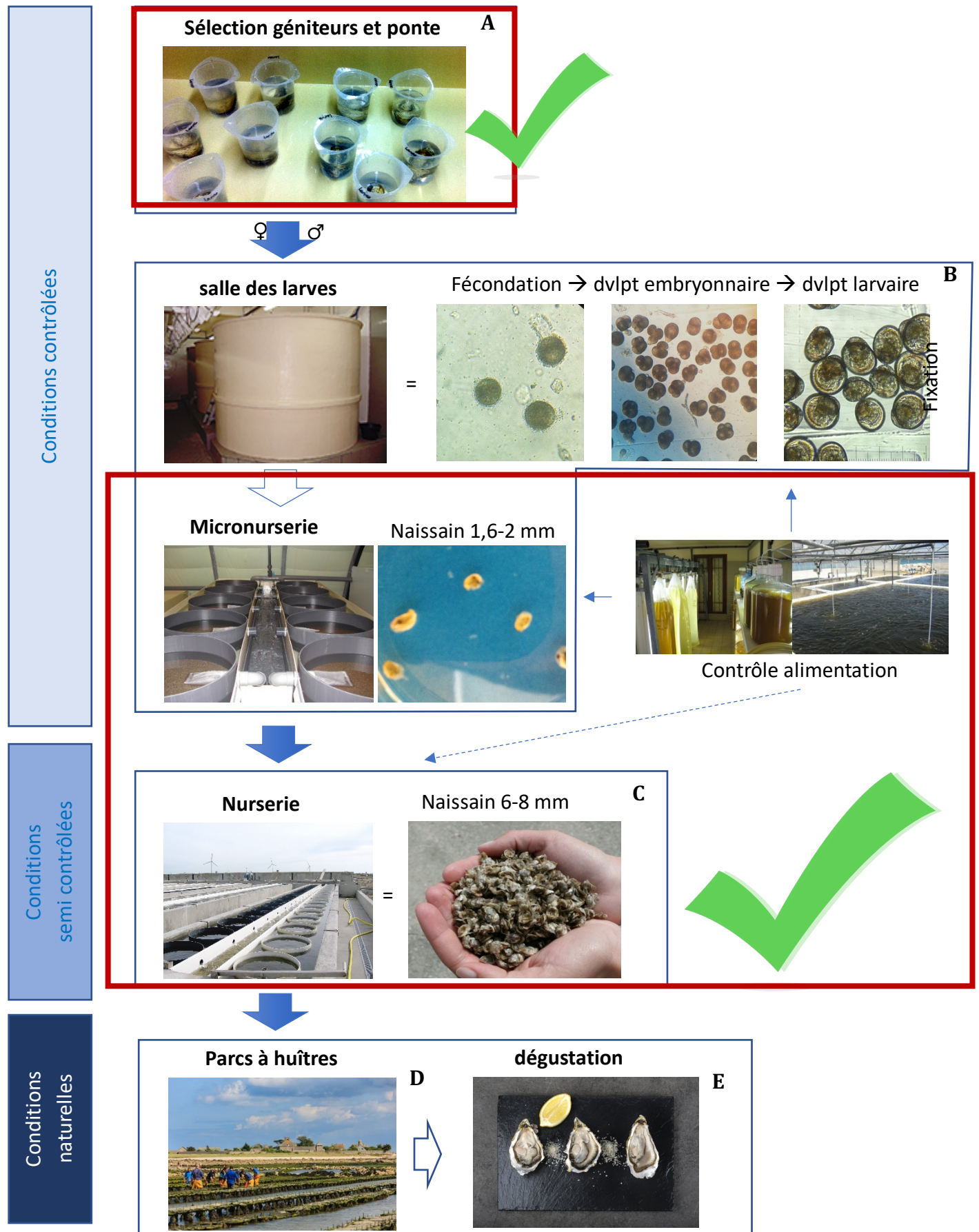


Figure 65: Parcours zootechnique de l'huître. Dvlpt : développement.

Discussion générale

Ces travaux de thèse ont pour objectif d'identifier de nouvelles molécules antibactériennes pour une utilisation en éclosérie. L'alternative aux antibiotiques proposée doit être compatible avec les conditions d'utilisation comme la forte salinité qui peut altérer l'activité antibactérienne (Lee et al. 1997). La solution proposée doit par ailleurs être respectueuse de l'environnement afin d'être en accord avec la politique de l'entreprise. Notre stratégie de recherche repose sur l'identification de peptides antimicrobiens chez deux organismes marins. Le premier, le poisson-lion, *Pterois volitans* est un poisson Téléostéens venimeux originaire de l'Indopacifique. Le second, la seiche, *Sepia officinalis* est un Mollusque Céphalopode qui vit sur les côtes de la Manche. Beaucoup de caractéristiques opposent ces deux modèles : vertébrés/invertébrés, invasif/endémique, itéropare/semelpare ... mais finalement l'ensemble de ces différences a accentué notre intérêt pour ces deux modèles dont aucun PAM n'avait été identifié auparavant. Nous n'avons pas exploré le modèle de l'huître pour rechercher des PAMs, pour deux raisons, d'une part beaucoup d'entre eux ont déjà été caractérisés (Schmitt et al. 2012) et d'autre part, les mécanismes de résistance de *Vibrio splendidus* face à la Cg-def et la Cg-BPI de l'huître (Duperthuy et al. 2010), nous ont conduits à réaliser nos recherches chez d'autres organismes.

A l'ère du développement des nouvelles technologies de séquençage et d'informatique, la recherche de molécules dans le domaine de la biologie a fait un réel bon en avant et particulièrement dans le champ des PAMs. Nous avons désormais accès à diverses bases de données regroupant les PAMs (Gueguen et al. 2006; Wang et al. 2016), à des logiciels de recherche de motifs de familles de PAMs (Waghu et al. 2016), à des utilitaires d'alignements comme BLAST et à bien d'autres outils... Avec ces progrès, les stratégies de recherche de PAMs ont aussi évolué. A l'aide de ces outils nous avons pu explorer les bases de données transcriptomiques du poisson-lion et de la seiche. Ces travaux témoignent du succès rencontré à travers l'approche *in silico* menée pour identifier de nouveaux antibactériens et montre l'étendue de ce champ de recherche. D'un côté, nous avons été en mesure à partir d'un transcriptome *de novo* unique et ciblé d'identifier sur la base d'homologies de séquences les 7 premiers précurseurs codants pour des PAMs chez le poisson-lion. Il n'y a pas d'étude qui fait état de l'identification de l'ensemble des familles de PAMs chez un téléostéen par cette approche. Si cette stratégie s'est révélée très efficace pour le poisson-lion, elle fut infructueuse pour la seiche et cela malgré les différents transcriptomes étudiés. Il est vrai que chez les Téléostéens, les différentes familles de PAMs sont bien décrites (Masso-Silva and Diamond 2014). Pour la seiche qui apparaît

comme un modèle de plus en plus atypique, les approches classiques ne sont pas non plus concluantes. La stratégie de recherche d'antibactériens menée dans cette étude à partir de caractères physico-chimiques et de motifs structuraux est une bonne alternative. Nous montrons ici que le « design » de PAMs est possible et que des travaux complémentaires pourraient permettre de confirmer l'existence d'au moins l'un d'entre eux. Cette étude avec celle de [Fedders et Leippe \(2008\)](#) montrent que la recherche *in silico* n'est pas uniquement destinée à la recherche de PAMs conservés comme cela avait pu être évoqué ([Sperstad et al. 2011](#)). En réalité cette approche présente plusieurs avantages : sa rapidité vis-à-vis de la purification de peptides bioactifs qui nécessite du temps et du matériel biologique. Elle s'inscrit par ailleurs dans une démarche plus responsable en réduisant drastiquement la quantité de matériel biologique. Enfin, elle se présente comme une alternative lorsque les réglementations sur les expérimentations animales sont strictes ou qu'elles incluent d'autres animaux que les vertébrés comme les Céphalopodes.

Notre stratégie repose par ailleurs sur le développement de peptides de petite taille et de structure simple. L'objectif est d'une part, de réduire le coût d'utilisation mais surtout d'éviter les problèmes associés à la structure tertiaire. La formation de ponts disulfures par la présence de cystéines est essentielle pour l'activité de la défensine hBD-1 ([Schroeder et al. 2011](#)) ou de l'hepcidine chez l'homme ([Hocquellet et al. 2012](#)). Nous nous sommes donc focalisés sur des peptides linéaires de petite taille qui peuvent se structurer en hélice- α . Avec cette étude nous avons exploré davantage le champ des piscidines à travers l'étude des pterocidines A, B et C identifiées chez le poisson-lion. Nous avons d'une part démontré qu'une piscidine peut être présente sous les deux formes amidée et non amidée comme cela avait été observé pour la moronecidine (ou piscidine 1) ([Silphaduang and Noga 2001](#)). Par ailleurs, l'étude comparée des deux formes de l' α -Pte montre que l'amidation joue un rôle crucial dans la structuration en hélice, l'activité antibactérienne et l'hémolyse. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par [Chekmenev et collaborateurs \(2006\)](#) qui concluent que l'amidation n'influence pas l'activité des piscidines 1 ou 3. Ils sont toutefois en accord avec d'autres études démontrant que l'amidation augmente l'activité biologique ([Strandberg et al. 2007](#); [Dennison et al. 2009](#); [Dennison and Phoenix 2011](#)) ou la stabilisation de l'hélice- α ([Mura et al. 2016](#)) comme nous l'avons observé avec la α -Pte. L'étude complémentaire des peptides γ -Pte et β -Pte montre que les peptides formés par les 20 premiers acides aminés des précurseurs des pterocidines B et C sont de très bon antibactériens. D'autres études de piscidines font état d'observations semblables. Chez le tilapia, *Oreochromis niloticus*,

les piscidines TP3 et TP4 de longueurs respectives 23 et 25 résidus, sont actifs sur des bactéries à gram-positif et gram-négatif (Peng et al. 2012) (à des concentrations inférieures à 8 µg/mL pour TP4 et 20 µg/mL pour TP3). Néanmoins, leur forme endogène n'a pas été confirmée (Peng et al. 2012). En parallèle, les formes TP1, TP2 et TP5 ne sont pas antimicrobiens. Un autre exemple avec la chionodracine, une piscidine potentiel de 22 aa chez le poisson des glaces, *Chionodraco hamatus*, elle est antibactérienne sur *E.coli* à 5µM ou *Bacillus cereus* à 10 µM (Buonocore et al. 2012). De nombreux autres exemples de piscidines antibactériennes dont les séquences n'ont pas été confirmées *in vivo* ont été répertoriés dans le [tableau 7](#). Par ailleurs, la longueur des pterocidines β et γ est importante. Avec les 17 premiers résidus les peptides sont encore actifs, mais plus la taille est réduite et moins les peptides sont antibactériens. Cela suggère que la taille des piscidines est importante tout comme la région C-terminale puisqu'en la supprimant il y a une perte d'activité. En effet, alors que les peptides FI₁₆ et FK₁₉ (issus de la seiche) partagent de fortes homologues de séquences du côté N-terminal avec d'autres piscidines ([Figure 46](#)), ils ne sont pas de bons antibactériens. Ces résultats semblent indiquer que la région C-terminale est déterminante pour l'activité antibactérienne. Le caractère amphiphile des piscidines avec une région N-terminale hydrophobe incluant des phénylalanines isoleucines ethistidines et une région C-terminale cationique avec une répartition adéquate des lysines et/ou arginines sont à l'origine de leur activité antibactérienne. L'étude de Lee et collaborateurs (2007) sur la piscidine 1 est en accord avec cette hypothèse. Par ailleurs, concernant les TP1, TP2 et TP5, les piscidines du tilapia évoquées précédemment, elles n'ont pas la signature en phénylalanine, isoleucine et histidine du côté N-terminal contrairement aux TP3 et TP4 (Peng et al. 2012). Et malgré une région C-terminale chargée positivement, elles ne sont ni hémolytiques, ni antivirales, ni antibactériennes (Peng et al. 2012). Ensemble ces données tendent à montrer que les piscidines interagissent avec la membrane par des interactions électrostatiques dans un premier temps, puis que la région hydrophobe perfore la membrane bi-lipidique. En somme, une taille minimum et le caractère amphipathique sont indispensables pour l'activité antibactérienne.

Enfin, au travers de cette étude et parmi les peptides étudiés, tous ne se sont pas montrés antibactériens. Par exemple VA₂₀ est hémolytique, GK₁₆, KY₁₅ et WK₂₀ sont antibactériens, FK₁₉ est hémolytique et antibactérien et d'autres sont algicides et antibactériens comme GR₂₁ et K4. Ces résultats mettent en lumière l'aspect multifonctionnel des peptides antimicrobiens comme cela a été décrit notamment par

Yeaman et Yount (2003). Il existe des exemples de PAMs qui ont de multiples fonctions et cibles comme le peptide LL-37. D'abord identifié comme antibactérien (Gudmundsson et al. 1996), le peptide LL-37 est par la suite décrit comme chimio-attractant pour les neutrophiles et les lymphocytes T chez l'homme (De Yang et al. 2000), puis plus récemment comme anti cellules cancéreuses (Kuroda et al. 2015) ou comme antiviral (Sousa et al. 2017). La moronecidine est un autre exemple de peptide antibactérien (Silphaduang and Noga 2001; Lauth et al. 2002), antifongique (Sung et al. 2008) qui induit également l'apoptose et la nécrose de cellules tumorales humaines (Lin et al. 2012). Il existe de nombreux autres exemples de peptides répertoriés dans la base de données APD ; ils peuvent être facilement recherchés sur la base de leurs cibles (organismes, fonction) depuis la dernière mise à jour (Wang et al. 2016). D'ailleurs, au vu des nombreuses cibles ou fonctions reconnues pour les PAMs, il n'est pas exclu que les peptides étudiés au cours de ces travaux puissent avoir d'autres activités ou cibles comme les champignons, les virus ou les parasites, à défaut d'être antibactériens. C'est d'autant plus probable que les algorithmes sur lesquels reposent les prédictions de potentiel antibactérien de l'utilitaire CAMP, s'appuient sur des listes de PAMs aux fonctions et cibles diverses (Hanif Waghu et al. 2016). Il pourrait être intéressant lors d'études de peptides bioactifs de cribler un maximum de cibles, afin de déterminer s'il existe des critères (physico-chimiques ou structuraux) propres à chacune des cibles.

En parallèle, ces multifonctions sont intéressantes tant sur le plan appliqué que sur le plan fondamental. Elles soulèvent notamment des questions sur l'aspect évolutif de ces fonctions qu'il serait intéressant d'étudier plus en profondeur. Elles ouvrent par ailleurs de nouvelles perspectives d'application, comme la lutte contre les HABs. Par ailleurs, l'activité algicide démontrée dans ce travail permet de documenter davantage ce sujet qui est peu décrit dans la littérature. Cela est montré pour le peptide HPA3NT3 issu de la protéine ribosomale L1 d'*Helicobacter pylori*. Il cible notamment de manière sélective des microalgues responsables de HABs tels que *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella sp.*, et *C. marina* (Park et al. 2011). Puis 4 autres peptides construits à partir de HPA3NT3 et de la mellitine ont récemment été décrits pour être également algicides (Park et al. 2016). Ces peptides sont capables de détruire la membrane des chloroplastes puis des thylakoïdes. En parallèle, certains PAMs montrent des propriétés immuno modulatrices (Bridle et al. 2011; Thaker et al. 2012; Haney and Hancock 2013; Mai et al. 2017) qui d'un point de vue appliqué présentent un intérêt certain. Un traitement avec des PAMs

capables d'une telle activité pourrait stimuler le système immunitaire et entraîner une meilleure protection en présence de pathogènes.

Perspectives

Les travaux menés au cours de cette thèse ouvrent sur plusieurs perspectives de recherches.

Après avoir identifié les premiers PAMs du poisson-lion au niveau de la peau et associée à son appareil venimeux, il serait intéressant d'étudier leurs fonctions. Car la question portant sur l'implication de ces PAMs dans le processus d'envenimation reste encore en suspens. Effectivement, nous ne savons pas si ces peptides interviennent dans la protection de l'hôte et/ou s'ils participent à l'action du venin. Par ailleurs, l'étude fonctionnelle et comparée des PAMs du poisson-lion avec ceux d'autres poissons pourrait apporter des informations quant au système immunitaire de cette espèce invasive. L'objectif serait de comprendre pourquoi il semble peu affecté par les maladies. Enfin, il reste encore de nombreux effecteurs à décrire chez ce modèle qui pourront apporter des réponses aux questions de recherches fondamentales et appliquées.

Chez la seiche, il y a encore un cap à franchir dans cette quête du premier PAM, néanmoins le peptide GR₂₁ apparaît comme un bon candidat. Il faudrait aller plus loin dans l'étude de ce peptide et de son précurseur. L'étude comparée des niveaux d'expression du transcrit codant pour ce peptide dans des hémocytes stimulés et non stimulés par des bactéries est encourageante (données récentes). Par ailleurs, l'exploration ciblée de précurseurs de petites tailles, avec un peptide signal et dont l'annotation est inconnue au sein des données transcriptomiques de la seiche pourraient permettre l'identification de nouveaux PAMs chez ce modèle particulier.

Enfin, il serait intéressant de déterminer le mode d'action de tous les PAMs étudiés dans ce travail et particulièrement des peptides KY₁₅, WK₂₀ et GK₁₆. L'identification de leur mode d'action pourrait constituer des pistes intéressantes pour mieux comprendre leur activité antibactérienne. En parallèle, la diversité de mode d'action pourrait répondre aux éventuels problèmes de résistance des bactéries sur le long terme. Parier, sur la diversité des candidats et des modes d'actions permettrait de se rapprocher de ce qui s'observe chez tous les organismes vivants. La coévolution des organismes vivants avec les agents pathogènes, témoigne de l'efficacité de ce système de défense qui a su traverser les âges.

Bibliographie

-
- Accogli G, Scillitani G, Mentino D, Desantis S (2017) Characterization of the skin mucus in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier) reared paralarvae. *Eur J Histochem* 61:2815. doi: 10.4081/ejh.2017.2815
- Adamo S a, Brown WM, King a J, et al (2000) Agonistic and reproductive behaviours of the cuttlefish *Sepia officinalis* in a semi-natural environment. *J Moll Stud* 66:417–419. doi: 10.1093/mollus/66.3.417
- Adamo SA, Hanlon RT (1996) Do cuttlefish (Cephalopoda) signal their intentions to conspecifics during agonistic encounters? *Anim Behav* 52:73–81. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1996.0153>
- Adem Bahar A, Ren D, Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* 6:1543–1575. doi: 10.3390/ph6121543
- Agerberth B, Lee J-Y, Bergman T, et al (1991) Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem* 202:849–854. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16442.x
- Ahmed N, Glaser M (2016) Can “Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA)” adapt to climate change in coastal Bangladesh? *Ocean Coast Manag* 132:120–131. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2016.08.017
- Ahrenholz DW, Morris JA (2010) Larval duration of the lionfish, *Pterois volitans* along the Bahamian Archipelago. *Environ Biol Fishes* 88:305–309. doi: 10.1007/s10641-010-9647-4
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124:783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Albins MA (2013) Effects of invasive Pacific red lionfish *Pterois volitans* versus a native predator on Bahamian coral-reef fish communities. *Biol Invasions* 15:29–43. doi: 10.1007/s10530-012-0266-1
- Albins MA (2016) Behaviours of Pacific Lionfish Facilitate Invasion of the Atlantic. In: Weis JS, Sol D (eds) *Biological Invasions and Animal Behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 309–323
- Albins MA (2015) Invasive Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce abundance and species richness of native Bahamian coral-reef fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 522:231–243. doi: 10.3354/meps11159
- Albins MA, Hixon MA (2013) Worst case scenario: potential long-term effects of invasive predatory lionfish (*Pterois volitans*) on Atlantic and Caribbean coral-reef communities. *Environ Biol Fishes* 96:1151–1157. doi: 10.1007/s10641-011-9795-1
- Albins M, Hixon M (2008) Invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 367:233–238. doi: 10.3354/meps07620
- Albins M, Lyons P (2012) Invasive red lionfish *Pterois volitans* blow directed jets of water at prey fish. *Mar Ecol Prog Ser* 448:1–5. doi: 10.3354/meps09580
- Alderman DJ (1996) Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev Sci Tech* 15:603–632
- Alderman DJ, Hastings TS (1998a) Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33:139–155
- Alderman DJ, Hastings TS (1998b) Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33:139–155
- Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, et al (2003) Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J Mol Biol* 325:355–65. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01234-2
- Anderson K V, Bokla L, Niisslein-Volhard C (1985) Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo: The Induction of Polarity by the *To* Gene Product. *Cell* 42:791–798
- Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ (2016) Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* 26:43–57. doi: 10.1016/j.drug.2016.04.002
-

Bibliographie

- Andersson M, Boman A, Boman HG (2003) Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: Isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci* 60:599–606. doi: 10.1007/s000180300051
- Andersson M, Curstedt T, Jörnvall H, Johansson J (1995a) An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. *FEBS Lett* 362:328–32
- Andersson M, Gunne H, Agerberth B, et al (1995b) NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J* 14:1615–25
- Andouche A, Bassaglia Y (2016) Coleoid cephalopod color patterns: Adult skin structures and their emergence during development in *sepia officinalis*. *Vie Milieu* 66:43–55
- Andréa M, Bezerra RF (2013) Fish Lectins : A Brief Review .
- Ángeles Esteban M (2012) An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunol* 2012:1–29. doi: 10.5402/2012/853470
- Arena Diaz G (2010) Defensins and cystein rich peptides : two types of antimicrobial peptides in marine molluscs G Arenas Díaz Abstract This review focuses on defensins and cystein rich peptides , which are the most abundant natural antimicrobial peptides (AMPs) described. *Nature* 157–164
- Argiolas A, Pisano JJ (1984) Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J Biol Chem* 259:10106–10111
- Arias-González JE, González-Gándara C, Luis Cabrera J, Christensen V (2011) Predicted impact of the invasive lionfish *Pterois volitans* on the food web of a Caribbean coral reef. *Environ Res* 111:917–925. doi: 10.1016/j.envres.2011.07.008
- Aspedon A, Groisman EA (1995) The antibacterial action of protamine : evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella typhimurium*. 3389–3397. doi: 10.1099/13500872-142-12-3389
- Austin B, Pride AC, Rhodie GA (2003) Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *J Fish Dis* 26:55–58. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00413.x
- Axen A, Carlsson A, Engstrom A, Bennich H (1997) Gloverin, an Antibacterial Protein from the Immune Hemolymph of *Hyalophora* Pupae. *Eur J Biochem* 247:614–619. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00614.x
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, et al (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198:149–68
- Bae J-SS, Jung J-MM, An CM, et al (2016) Piscidin: Antimicrobial peptide of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish Shellfish Immunol* 51:136–142. doi: 10.1016/j.fsi.2016.02.010
- Bakshi M, Singh B, Singh A, Singh S (2001) The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability-indicating assay. *J Pharm Biomed Anal* 26:891–897. doi: 10.1016/S0731-7085(01)00475-7
- Bakshi M, Singh S (2004) ICH guidance in practice: Establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method. *J Pharm Biomed Anal* 36:769–775. doi: 10.1016/j.jpba.2004.08.008
- Banerjee S, Devaraja TN, Shariff M, Yusoff FM (2007) Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp . in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*. 383–389. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00819.x
- Bao B, Peatman E, Li P, et al (2005) Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol* 29:939–950. doi: 10.1016/j.dci.2005.03.006

-
- Batoni G, Maisetta G, Lisa Brancatisano F, et al (2011) Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits. *Curr Med Chem* 18:256–279. doi: 10.2174/092986711794088399
- Benkwitt CE, Steinke D (2013) Density-Dependent Growth in Invasive Lionfish (*Pterois volitans*). doi: 10.1371/journal.pone.0066995
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235
- Bermúdez-Almada MC, Espinosa-Plascencia A (2012a) The use of antibiotics in shrimp farming. *Heal Environ Aquac* 199–214. doi: 10.5772/28527
- Bermúdez-Almada MC, Espinosa-Plascencia A (2012b) The use of antibiotics in shrimp farming. *Heal Environ Aquac* 199–214. doi: 10.5772/28527
- Bernay B, Baudy-Floc'h M, Gagnon J, Henry J (2006a) Ovarian jelly-peptides (OJPs), a new family of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides* 27:1259–68. doi: 10.1016/j.peptides.2005.11.025
- Bernay B, Baudy-Floc'h M, Zanuttini B, et al (2006b) Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Reprod Dev* 73:607–16. doi: 10.1002/mrd.20472
- Bernay B, Baudy-Floc'h M, Zanuttini B, et al (2005) Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1037–1047. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.034
- Bernay B, Gagnon J, Henry J (2004) Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 314:215–222. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.085
- Beuerlein K, Ruth P, Westermann B, et al (2002) Hemocyanin and the branchial heart complex of *Sepia officinalis*: Are the hemocytes involved in hemocyanin metabolism of coleoid cephalopods? *Cell Tissue Res* 310:373–381. doi: 10.1007/s00441-002-0642-8
- Bierbaum G, Sahl HG (1987) Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: Influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol* 169:5452–5458. doi: 10.1128/jb.169.12.5452-5458.1987
- Birkemo GA, Lüders T, Andersen Ø, et al (2003) Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1646:207–215. doi: 10.1016/S1570-9639(03)00018-9
- Blanchard M, Pechenik JA, Giudicelli E, et al (2008) Competition for food in the larvae of two marine molluscs, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 21:197–205. doi: 10.1051/alr:2008025
- Boal JG, Prosser KN, Holm JB, et al (2010) Sexually Mature Cuttlefish are Attracted to the Eggs of Conspecifics. *J Chem Ecol* 36:834–836. doi: 10.1007/s10886-010-9816-0
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Boman HG (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254:197–215. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x
- Boman HG, Agerberth B, Boman A (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin-p1 and pr-39, 2 antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61:2978–2984
- Boman HG, Steiner H, Hultmark D, et al (1989) Insect Two Antibacterial Proteins Involved in Pillars Article: Sequence and Specificity of. *J Immunol* 182:6635–6637
- Boucaud-Camou E, Koueta, N. B, J., Medhioub A (1991) The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine. In: E. Boucaud-Camou (ed) *The cuttlefish*. Centre de publication de l'Université de Caen,
-

- France., pp 141–151
- Boucaud-Camou, E., Boismery J (1991) The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the English channel. In: E.Boucaud-Camou (ed) The cuttlefish. Centre de publication de l'Université de Caen, France., pp 179–189
- Bridle A, Nosworthy E, Polinski M, Nowak B (2011) Evidence of an antimicrobial-immunomodulatory role of atlantic salmon cathelicidins during infection with *Yersinia ruckeri*. PLoS One 6:. doi: 10.1371/journal.pone.0023417
- Brinchmann MF (2016) Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. Mol BioSyst 12:2056–2063. doi: 10.1039/C5MB00890E
- Broekman, Frei DM, Gylfason G a, et al (2011) Cod cathelicidin: Isolation of the mature peptide, cleavage site characterisation and developmental expression. Dev Comp Immunol 35:296–303. doi: 10.1016/j.dci.2010.10.002
- Brown S, Santa Maria JP, Walker S (2013) Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. Annu Rev Microbiol 67:313–336. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155620
- Bruhn H, Riekens B, Berninghausen O, Leippe M (2003) Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. Biochem J 375:737–44. doi: 10.1042/BJ20030250
- Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, et al (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O- glycosylated substitution. J Biol Chem 268:14893–14897. doi: 10.1074/jbc.273.52.34710
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L (2004) . Anti-microbial peptides- from invertebrates to vertebrates.pdf. Immunol Rev 198:169–184. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x
- Bullock AM, Polglase JL, Phillips SE (1987) The wound healing and haemocyte response in the skin of the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca: Cephalopoda) in the presence of *Vibrio tubiashii*. J Zool 211:373–385. doi: 10.1111/j.1469-7998.1987.tb01540.x
- Burridge L, Weis JS, Cabello F, et al (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306:7–23. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.020
- Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol 8:1137–1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Cabello FC, Bravo S, Dölz H, et al (2004) Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Rev Med Chil 132:1001–1006. doi: 10.4067/S0034-98872004000800014
- Cai S, Wang J, Wang K, et al (2016) Expression, Purification and Antibacterial Activity of NK-Lysin Mature Peptides from the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl Sci 6:240. doi: 10.3390/app6090240
- Cao L, Wang W, Yang Y, et al (2007) Aquaculture Pollution in China Subject Area 5.1: Microbial studies and technologies supporting waste disposal, management, and remediation of municipal and industrial hazardous wastes Environmental Impact of Aquaculture and Countermeasures to Aquaculture Pollution in China*. Paris Env Sci Pollut Res 14:452–462. doi: 10.1065/espr2007.05.426
- Carmona G, Rodriguez A, Juarez D, et al (2013) Improved protease stability of the antimicrobial peptide pin2 substituted with d-Amino acids. Protein J 32:456–466. doi: 10.1007/s10930-013-9505-2
- Casadei E, Wang T, Zou J, et al (2009a) Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol Immunol 46:3358–3366. doi: 10.1016/j.molimm.2009.07.018
- Casadei E, Wang T, Zou J, et al (2009b) Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol Immunol 46:3358–3366. doi: 10.1016/j.molimm.2009.07.018

-
- Casteels P, AMPE C, RIVIERE L, et al (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem* 187:381–386. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x
- Castellanos-Martínez S, Diz AP, Álvarez-Chaver P, Gestal C (2014) Proteomic characterization of the hemolymph of *Octopus vulgaris* infected by the protozoan parasite *Aggregata octopiana*. *J Proteomics* 105:151–163. doi: 10.1016/j.jprot.2013.12.008
- Castellanos-Martínez S, Gestal C (2013) Pathogens and immune response of cephalopods. *J Exp Mar Bio Ecol* 447:14–22. doi: 10.1016/j.jembe.2013.02.007
- Castillo MG, Salazar KA, Joffe NR (2015) The immune response of cephalopods from head to foot. *Fish Shellfish Immunol* 46:145–160. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.029
- Chang C-I, Pleguezuelos O, Zhang Y-A, et al (2005) Identification of a Novel Cathelicidin Gene in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect Immun* 73:5053–5064. doi: 10.1128/IAI.73.8.5053-5064.2005
- Chang CC-I, Zhang Y-AY-AY, Zou J, et al (2006) Two Cathelicidin Genes Are Present in both Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Society* 50:185–195. doi: 10.1128/AAC.50.1.185
- Chatterjee A, Kanawjia SK, Khetera Y, Saini P (2015) Discordance between in silico & in vitro analyses of ACE inhibitory & antioxidative peptides from mixed milk tryptic whey protein hydrolysate. *J Food Sci Technol* 52:5621–5630. doi: 10.1007/s13197-014-1669-z
- Chen HC, Brown JH, Morell JL, Huang CM (1988) Synthetic Magainin Analogs with Improved Antimicrobial Activity. *Febs Lett* 236:462–466
- Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al (2005) Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* 40:123–132. doi: 10.1016/j.jdermsci.2005.03.014
- Cho JH, Park IY, Kim HS, et al (2002) Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J* 16:429–431. doi: 10.1096/fj.01-0736fj
- Claes MF (1996) Functional Morphology of the White Bodies of the Cephalopod Mollusc *Sepia officinalis*. *Acta Zool* 77:173–190. doi: 10.1111/j.1463-6395.1996.tb01262.x
- Cociancich S, Dupont A, Hegy G, et al (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem J* 300:567–75. doi: 10.1042/bj3000567
- Cohen AS, Olek AJ (1989) An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. *Toxicon* 27:1367–1376. doi: 10.1016/0041-0101(89)90068-8
- Cole AM, Weis P, Diamond G (1997) Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *J Biol Chem* 272:12008–12013. doi: 10.1074/jbc.272.18.12008
- Comps M (1988) Epizootic Diseases of Oysters Associated with Viral Infections. *Am Fish Soc Spec Publ* 18:23–37
- Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 471:165–168. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01384-3
- Cornet V, Henry J, Corre E, et al (2014) Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation. *J Proteomics* 108:209–22. doi: 10.1016/j.jprot.2014.05.019
- Cornet V, Henry J, Corre E, et al (2015a) The Toll/NF- κ B pathway in cuttlefish symbiotic accessory nidamental gland. *Dev Comp Immunol* 53:42–46. doi: 10.1016/j.dci.2015.06.016
- Cornet V, Henry J, Goux D, et al (2015b) How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring? *PLoS One*
-

- 10:e0132836. doi: 10.1371/journal.pone.0132836
- Corrales J, Gordon WL, Noga EJ (2009) Development of an ELISA for quantification of the antimicrobial peptide piscidin 4 and its application to assess stress in fish. *Fish Shellfish Immunol* 27:154–163. doi: 10.1016/j.fsi.2009.02.023
- Côté IM, Green SJ, Hixon MA (2013) Predatory fish invaders: Insights from Indo-Pacific lionfish in the western Atlantic and Caribbean. *Biol Conserv* 164:50–61. doi: 10.1016/j.biocon.2013.04.014
- Cuesta A, Meseguer J, Esteban MÁ (2011) Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Mol Immunol* 48:1432–1438. doi: 10.1016/j.molimm.2011.03.022
- Cure K, Benkwitt CE, Kindinger TL, et al (2012) Comparative behavior of red lionfish *Pterois volitans* on native Pacific versus invaded Atlantic coral reefs. *Mar Ecol Prog Ser* 467:181–192. doi: 10.3354/meps09942
- Cuthbertson BJ, Deterding LJ, Williams JG, et al (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev Comp Immunol* 32:167–181. doi: 10.1016/j.dci.2007.06.009
- Cuthbertson BJ, Yang Y, Bachère E, et al (2005) Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. *J Biol Chem* 280:16009–16018. doi: 10.1074/jbc.M412420200
- Cuttitta F (1993) Peptide amidation: Signature of bioactivity. *Anat Rec* 236:87–95. doi: 10.1002/ar.1092360112
- Da Costa F, Petton B, Mingant C, et al (2016) Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquac Nutr* 22:813–836. doi: 10.1111/anu.12301
- Dagorn F, Couzinet-Mossion A, Kendel M, et al (2016) Exploitable Lipids and Fatty Acids in the Invasive Oyster *Crassostrea gigas* on the French Atlantic Coast. *Mar Drugs* 14:104. doi: 10.3390/md14060104
- Davis JW, Sizemore RK (1982) Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Appl Environ Microbiol* 43:1092–7
- De Schryver P, Defoirdt T, Sorgeloos P (2014) Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathog* 10:e1003919. doi: 10.1371/journal.ppat.1003919
- Defer D, Desriac F, Henry J, et al (2013) Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol* 34:1439–47. doi: 10.1016/j.fsi.2013.03.357
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, et al (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25:472–9. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.08.001
- Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 14:251–258. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.004
- Delisle L, Fuhrmann M, Quéré C, et al (2018) The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) of Pacific Oysters *Crassostrea gigas* Is Upaccumulated During Infection by the Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1): an Indicator of the Warburg Effect. 2014:
- Dennison SR, Phoenix DA (2011) Influence of C-terminal amidation on the efficacy of modelin-5. *Biochemistry* 50:1514–1523. doi: 10.1021/bi101687t
- Derby CD (2014) Cephalopod Ink: Production, Chemistry, Functions and Applications. *Mar Drugs* 12:2700–2730. doi: 10.3390/md12052700
- Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, et al (2001) Crustacean Immunity. *J Biol Chem* 276:47070–

- Destoumieux D, Bulet P, Loew D, et al (1997) Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J Biol Chem 272:28398–28406. doi: 10.1074/jbc.272.45.28398
- Dickel L, Darmaillacq A-S, Jozet-Alves C, Bellanger C (2013) Learning, Memory, and Brain Plasticity in Cuttlefish (*Sepia officinalis*). In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. pp 318–333
- Done HY, Venkatesan AK, Halden RU (2015) Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? AAPS J 17:513–524. doi: 10.1208/s12248-015-9722-z
- Dos R, Rocha S, Viana De Sousa O, et al (2016) Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. Mar Pollut Bull 105:337–340. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.001
- Douglas SE (2011) Antimicrobial Peptides and their Potential as Therapeutants in Aquaculture. Aquac Biotechnol 105–120. doi: 10.1002/9780470963159.ch7
- Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS, et al (2003a) Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. Dev Comp Immunol 27:589–601. doi: 10.1016/S0145-305X(03)00036-3
- Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS, et al (2003b) Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. Dev Comp Immunol 27:589–601. doi: 10.1016/S0145-305X(03)00036-3
- Douglas SE, Patrzykat A, Pytyck J, Gallant JW (2003c) Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Eur J Biochem 270:3720–3730. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03758.x
- Dubert J, Aranda-Burgos JA, Ojea J, et al (2017) Mortality event involving larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in a hatchery: isolation of the pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus*. J Fish Dis 40:1185–1193. doi: 10.1111/jfd.12593
- Dubos RJ, Cattaneo C (1939) Studies on a Bactericidal Agent Extracted From a Soil Bacillus : Iii. Preparation and Activity of a Protein-Free Fraction. J Exp Med 70:249–56. doi: 10.1084/jem.70.3.249
- Dujuan Z*, Liusisi, Xiehuaijun, Wangyan C (2017) Antibiotics in the coastal water of the South Yellow Sea in China: Occurrence, distribution and ecological risks. Sci Total Environ 595:521–527. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.281
- Duperthuy M (2010) Effecteurs moléculaires de l'association *Crassostrea gigas* / *Vibrio splendidus*. Rôle de la porine OmpU dans les mécanismes de résistance et échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.
- Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, et al (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. Environ Microbiol 12:951–963. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x
- Dupierris V, Masselon C, Court M, et al (2009) A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. Bioinformatics 25:1980–1981. doi: 10.1093/bioinformatics/btp301
- Duplantier AJ, van Hoek ML (2013) The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. Front Immunol 4:1–14. doi: 10.3389/fimmu.2013.00143
- Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A (2006) LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.03.030

Bibliographie

- Duval E, Zatylny C, Laurencin M, et al (2009) KKKKPLFGLFFGLF: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity. *Peptides* 30:1608–12. doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.022
- Duval P, Chichery M-P, Chichery R (1984) Prey capture by the cuttlefish (*L.*): An experimental study of two strategies. *Behav Processes* 9:13–21. doi: 10.1016/0376-6357(84)90004-4
- Dziuba B, Dziuba M (2014) New milk protein-derived peptides with potential antimicrobial activity: An approach based on bioinformatic studies. *Int J Mol Sci* 15:14531–14545. doi: 10.3390/ijms150814531
- Edgerton BF, Henttonen P, Jussila J, et al (2004) Understanding the causes of disease in European freshwater crayfish. *Conserv Biol* 18:1466–1474. doi: 10.1111/j.1523-1739.2004.00436.x
- Edgerton M, Koshlukova SE (2000) Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res* 14:16–21. doi: 10.1177/08959374000140010201
- Ellis A. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25:827–839. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6
- Enault J (2012) Identification et caractérisation de phéromones sexuelles impliquées dans l'accouplement et la ponte chez la seiche *Sepia officinalis* : perturbations induites par la présence de PCBs dans le milieu marin No Title
- Enault J, Zatylny-Gaudin C, Bernay B, et al (2012) A complex set of sex pheromones identified in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *PLoS One* 7:e46531. doi: 10.1371/journal.pone.0046531
- Eswarappa SM, Panguluri KK, Hensel M, Chakravorty D (2008) The *yejABEF* operon of *Salmonella* confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence. *Microbiology* 154:666–678. doi: 10.1099/mic.0.2007/011114-0
- Ezquerro-Brauer JM, Miranda JM, Chan-Higuera JE, et al (2017) New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *J Sci Food Agric*. doi: 10.1002/jsfa.8192
- Fedders H, Leippe M (2008) A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: Identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Dev Comp Immunol* 32:286–298. doi: 10.1016/j.dci.2007.06.003
- Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ (1968) Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. *Proc Soc Exp Biol Med* 127:707–10. doi: 10.1016/0041-0101(69)90135-4
- Féral J-P (1988) Wound healing after arm amputation in *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Sepioidea). *J Invertebr Pathol* 52:380–388. doi: 10.1016/0022-2011(88)90049-3
- Fernandes J (2004) Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol* 28:127–138. doi: 10.1016/S0145-305X(03)00120-4
- Ferreira CSG, Nunes BA, Henriques-Almeida JM de M, Guilhermino L (2007) Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicol Environ Saf*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.006
- Finn RD, Bateman A, Clements J, et al (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222–D230. doi: 10.1093/nar/gkt1223
- Fisch K, Waniek JJ, Zhou M, et al (2017) Antibiotics in Three Chinese Coastal Systems: Huangpu River, East China Sea, Pearl River Estuary. *J Aquat Pollut Toxicol* 1:
- Fishelson L (1975) Ethology and reproduction of pteroid fishes found in the Gulf of Aqaba (Red Sea), especially *Dendrochirus brachypterus* (Cuvier), (Pteroidae, Teleostei). *Pubbl della Stn Zool di Napoli* 39:635–656
- Fishelson L (1997) Experiments and observations on food consumption, growth and starvation in

-
- Dendrochirus brachypterus and Pterois volitans (Pteroinae, Scorpaenidae). *Z Environ Biol Fishes* 50:391–403
- Fleming A (1920) On a Remarkable Bacteriolytic Element found
- Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Clin Infect Dis* 2:129–139. doi: 10.1093/clinids/2.1.129
- Fogg AQ, Ruiz CF, Curran SS, Bullard SA (2016) Parasites from the red lionfish, *Pterois volitans*, from the Gulf of Mexico. *Gulf Caribb Res* 27:SC1-SC5. doi: 10.18785/gcr.2701.07
- Foighil DO, Taylor DJ (2000) Evolution of parental care and ovulation behavior in oysters. *Mol Phylogenet Evol* 15:301–13. doi: 10.1006/mpev.1999.0755
- Fontagné S, Robin J, Corraze G, Bergot P (2000) Growth and survival of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) larvae fed from first feeding on compound diets containing medium-chain triacylglycerols. *Aquaculture* 190:261–271. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00401-4
- Ford LA, Alexander SK, Cooper KM, Hanlon RT (1986) Bacterial populations of normal and ulcerated mantle tissue of the squid, *Lolliguncula brevis*. *J Invertebr Pathol* 48:13–26. doi: 10.1016/0022-2011(86)90138-2
- Forsythe JW, Derusha RH, Hanlon RT (1994) Growth, Reproduction and Life-Span of *Sepia-Officinalis* (Cephalopoda, Mollusca) Cultured Through 7 Consecutive Generations. *J Zool* 233:175–192
- Froese R and DP (2017) FishBase
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22:1–14. doi: 10.1007/s10565-006-0011-6
- Gagnon M-C, Strandberg E, Grau-Campistany A, et al (2017) Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* 56:1680–1695. doi: 10.1021/acs.biochem.6b01071
- Galil BS (2009) Taking stock: inventory of alien species in the Mediterranean sea. *Biol Invasions* 11:359–372. doi: 10.1007/s10530-008-9253-y
- Galtsoff P (1938) Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* II. Stimulation of spawning in the female oyster. *Biol Bull*, 75, 286-307
- Gammill WM, Scott Fites J, Rollins-Smith LA (2012) Norepinephrine depletion of antimicrobial peptides from the skin glands of *Xenopus laevis*. *Dev Comp Immunol* 37:19–27. doi: 10.1016/j.dci.2011.12.012
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710–20. doi: 10.1038/nri1180
- Ganz T, Lehrer RI (1995) Defensins. *Pharmacol Ther* 66:191–205. doi: 10.1016/0163-7258(94)00076-F
- Ganz T, Lehrer RI (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41–44. doi: 10.1016/S0952-7915(98)80029-0
- Gardner PG, Frazer TK, Jacoby CA, Yanong RPE (2015) Reproductive biology of invasive lionfish (*Pterois* spp.). *Front Mar Sci* 2:1–10. doi: 10.3389/fmars.2015.00007
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, et al (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 53:187–196. doi: 10.1007/s00248-006-9061-9
- Garrett PR (1992) Defoaming: Theory and Andustrial Applications, Surfactant. CRC Press
- Gause GF, Brazhnikova MG (1944) Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature* 154:703–703. doi: 10.1038/154703a0
-

Bibliographie

- Gautam A, Sharma A, Jaiswal S, et al (2016) Development of Antimicrobial Peptide Prediction Tool for Aquaculture Industries. *Probiotics Antimicrob Proteins* 8:141–149. doi: 10.1007/s12602-016-9215-0
- Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G (2008) HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics* 24:2101–2102. doi: 10.1093/bioinformatics/btn392
- Gazit E, Miller IR, Biggin PC, et al (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol* 258:860–870. doi: 10.1006/jmbi.1996.0293
- Gellert M (2002) V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Annu Rev Biochem* 71:101–132. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203
- Geraudie P, Gerbron M, Minier C (2017) Endocrine disruption effects in male and intersex roach (*Rutilus rutilus*, L.) from French rivers: An integrative approach based on subcellular to individual responses. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* 211:29–36. doi: 10.1016/j.cbpb.2017.05.006
- Gerdes D (1983) The Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 31:195–219. doi: 10.1016/0044-8486(83)90313-7
- Gestal C, de la Cadena M, Pascual S (2002) Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Dis Aquat Organ* 51:61–65. doi: 10.3354/dao051061
- Ghosh C, Halder J (2015) Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. *ChemMedChem* 10:1606–1624. doi: 10.1002/cmdc.201500299
- Giangaspero A, Sandri L, Tossi A (2001) Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem* 268:5589–600. doi: 10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics
- Goetz FW, Iliev DB, McCauley LAR, et al (2004) Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Mol Immunol* 41:1199–1210. doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.005
- Gomez D, Sunyer JO, Salinas I (2013) The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 35:1729–1739. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032
- González-Araya R, Quéau I, Quéré C, et al (2011) A physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquac Res* 42:710–726. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02731.x
- Goodson MS, Kojadinovic M, Troll J V., et al (2005) Identifying components of the NF- κ B pathway in the beneficial [i]*Euprymna scolopes*[i]-[i]*Vibrio fischeri*[i] light organ symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 71:6934–6946. doi: 10.1128/AEM.71.11.6934
- Gosling E (2003) Bivalve Molluscs. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883
- Grau-Campistany A, Strandberg E, Wadhwani P, et al (2015) Hydrophobic mismatch demonstrated for membranolytic peptides, and their use as molecular rulers to measure bilayer thickness in native cells. *Sci Rep* 5:20–24. doi: 10.1038/srep09388
- Green S, Akins J, Côté I (2011) Foraging behaviour and prey consumption in the Indo-Pacific lionfish on Bahamian coral reefs. *Mar Ecol Prog Ser* 433:159–167. doi: 10.3354/meps09208
- Green SJ, Akins JL, Maljković A, Côté IM (2012) Invasive Lionfish Drive Atlantic Coral Reef Fish Declines. *PLoS One* 7:e32596. doi: 10.1371/journal.pone.0032596

-
- Green SJ, Côté IM (2009) Record densities of Indo-Pacific lionfish on Bahamian coral reefs. *Coral Reefs* 28:107. doi: 10.1007/s00338-008-0446-8
- Green TJ, Robinson N, Chataway T, et al (2014) Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Res* 110C:168–174. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.08.010
- Grigorakis K, Rigos G (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 85:899–919. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.015
- Gromek SM, Suria AM, Fullmer MS, et al (2016) *Leisingera* sp. JC1, a bacterial isolate from hawaiian bobtail squid eggs, produces indigoidine and differentially inhibits vibrios. *Front Microbiol* 7:1–16. doi: 10.3389/fmicb.2016.01342
- Groves ML, Peterson RF, Kiddy CA (1965) Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature* 207:1007–1008. doi: 10.1038/2071007a0
- Gueguen Y, Garnier J, Robert L, et al (2006) PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev Comp Immunol* 30:283–288. doi: 10.1016/j.dci.2005.04.003
- Guerra A (2006) Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie Milieu* 56:97–107
- Guina T, Yi EC, Wang H, et al (2000) A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Promotes Resistance to A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Promotes Resistance to Alpha-Helical Antimicrobial Peptides. *J Bacteriol* 182:4077–4086. doi: 10.1128/JB.182.14.4077-4086.2000.Updated
- Gunn JS, Miller SI (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178:6857–6864. doi: 10.1128/jb.178.23.6857-6864.1996
- Guo M, Wei J, Huang X, et al (2012) Antiviral effects of β -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol* 32:828–838. doi: 10.1016/j.fsi.2012.02.005
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, et al (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc* 8:1494–512. doi: 10.1038/nprot.2013.084
- Haddad V, Stolf HO, Risk JY, et al (2015) Report of 15 injuries caused by lionfish (*Pterois volitans*) in aquarists in Brazil: a critical assessment of the severity of envenomations. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 21:8. doi: 10.1186/s40409-015-0007-x
- Hall JE, Vodyanoy I, Balasubramanian TM, Marshall GR (1984) Alamethicin. A rich model for channel behavior. *Biophys J* 45:233–247. doi: 10.1016/S0006-3495(84)84151-X
- Halstead BW, Chitwood MJ, Modglin FR (1955) The anatomy of the venom apparatus of the zebrafish, *Pterois volitans* (Linnaeus). *Anat Rec* 122:317–333. doi: 10.1002/ar.1091220304
- Hancock RE (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418–422. doi: 10.1016/S0140-6736(97)80051-7
- Hancock RE, Scott MG (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8856–61. doi: 10.1073/pnas.97.16.8856
- Hancock REW, Sahl HG (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24:1551–1557. doi: 10.1038/nbt1267
- Hanekamp JC, Runderweide ◻, Calabrese EJ, et al (2007) CHLORAMPHENICOL, EUROPEAN LEGISLATION AND HORMESIS - COMMENTARY. Dose-Response Former Nonlinearity Biol 5:91–93. doi: 10.2203/dose-response.06-012.Hanekamp
- Haney EF, Hancock REW (2013) Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers* 100:572–583. doi: 10.1002/bip.22250
-

Bibliographie

- Hanif Waghu F, Shankar Barai R, Gurung P, Idicula-Thomas S (2016) CAMP R3 : a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 44:. doi: 10.1093/nar/gkv1051
- Hanlon RT, Ament SA, Gabr H (1999) Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Mar Biol* 134:719–728. doi: 10.1007/s002270050588
- Hanlon RT, Forsythe JW, Cooper KM, et al (1984) Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *J Invertebr Pathol* 44:67–83. doi: 10.1016/0022-2011(84)90047-8
- Hara S, Yamakawa M (1995) A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem J* 310 (Pt 2:651–656. doi: 10.1074/jbc.270.13.7142
- Harms CA, Lewbart GA, McAlarney R, et al (2006) surgical excision of mycotic (cladosporium sp.) granulomas from the mantle of a cuttlefish (*sepia officinalis*). *j zoo wildl med* 37:524–530. doi: 10.1638/06-033.1
- Harris F, Dennison S, Phoenix D (2009) Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr Protein Pept Sci* 10:585–606. doi: 10.2174/138920309789630589
- Helena Rebouças R, Viana de Sousa O, Sousa Lima A, et al (2011) Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environ Res* 111:21–24. doi: 10.1016/j.envres.2010.09.012
- Henry J, Favrel P, Boucaud-Camou E (1997) Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Peptides* 18:1469–74
- Henry J, Zatylny C, Boucaud-Camou E (1999) Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20:1061–70
- Herawati VE, Hutabarat j, Radjasa ok (2014) Nutritional Content of *Artemia* sp. Fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*. *Hayati J Biosci* 21:166–172. doi: 10.4308/hjb.21.4.166
- Herbinière J, Braquart-Varnier C, Grève P, et al (2005) Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev Comp Immunol* 29:489–499. doi: 10.1016/j.dci.2004.11.001
- Hetru C, Bulet P (1997) Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol Biol* 78:35–49. doi: 10.1385/0-89603-408-9:35
- Hirono I, Hwang J-Y, Ono Y, et al (2005) Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS J* 272:5257–64. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04922.x
- Hirono I, Kondo H, Koyama T, et al (2007) Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NK-lysin, an antimicrobial peptide. *Fish Shellfish Immunol* 22:567–75. doi: 10.1016/j.fsi.2006.08.003
- Hirsch JG (1956) Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 103:589–611. doi: 10.1084/jem.103.5.589
- Hirsch JG (1958) Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 108:925–44
- Hirsch JG (1990) Bactericidal action of histone. *Mayo Clin Proc* 65:31–7
- Hocquellet A, Le Senechal C, Garbay B (2012) Importance of the disulfide bridges in the antibacterial activity of human hepcidin. *Peptides* 36:303–307. doi: 10.1016/j.peptides.2012.06.001
- Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, et al (2010) Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides* 31:58–66. doi: 10.1016/j.peptides.2009.10.006
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313–1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313

-
- Høj L, Bourne DG, Hall MR (2009) Localization , abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia* : Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture* 293:278–285. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.024
- Hotchkiss R, Dubos RJ (1940) Letters to the Editors Letters to the Editors. *Br J Nutr* 63:669–671
- Houyvet B, Bouchon-Navaro Y, Bouchon C, et al (2018) Identification of a moronecidin-like antimicrobial peptide in the venomous fish *Pterois volitans*: Functional and structural study of pterocidin- α . *Fish Shellfish Immunol* 72:318–324. doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.003
- Huang G-Y, Liu Y-S, Chen X-W, et al (2016) Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. *Sci Rep* 6:20884. doi: 10.1038/srep20884
- Huang HW (2000) Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry* 39:8347–8352. doi: 10.1021/bi000946l
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106:7–16
- Iger Y, Abraham M (1990) The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J Fish Biol* 36:421–437. doi: 10.1111/j.1095-8649.1990.tb05622.x
- Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y, et al (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur J Biochem* 270:675–86. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03419.x
- Iwanaga S, Lee B-L (2005) Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *BMB Rep* 38:128–150. doi: 10.5483/BMBRep.2005.38.2.128
- Jia X, Patrzykat A, Devlin RH, et al (2000) Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl Environ Microbiol* 66:1928–1932. doi: 10.1128/AEM.66.5.1928-1932.2000
- Jin J-YY, Zhou L, Wang Y, et al (2010) Antibacterial and antiviral roles of a fish α -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One* 5:e12883. doi: 10.1371/journal.pone.0012883
- Johan Vandenberghe,1,2* Linda verdonck,1 rocio robles-arozarena,2 gabriel rivera 3, annick bolland,3 marcos balladares,3 bruno gomez-gil,4 jorge calderon 3, patrick sorgeloos 2 and jean swings1 (1999) *Vibrios* Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probionts. *Appl Environ Microbiol* 65:2592–2597
- Johnston JM, Becker SF, McFarland LM (1986) Gastroenteritis in patients with stool isolates of *vibrio vulnificus*. *Am J Med* 80:336–338. doi: 10.1016/0002-9343(86)90038-0
- Jollès P, Jollès J (1984) What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* 63:165–189
- Juba ML, Porter DK, Williams EH, et al (2015) Helical cationic antimicrobial peptide length and its impact on membrane disruption. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848:1081–1091. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.01.007
- Kang C-H, Gu T, So J-S (2017) Possible Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Oysters (*Crassostrea gigas*). *Probiotics Antimicrob Proteins* 1–12. doi: 10.1007/s12602-017-9315-5
- Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK (2013) Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish J Microbiol* 62:223–35
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203–209. doi: 10.1016/0044-8486(94)90309-3
-

- Katzenback BA (2015) Antimicrobial Peptides as Mediators of Innate Immunity in Teleosts. *Biology (Basel)* 4:607–39. doi: 10.3390/biology4040607
- Kiriake A, Madokoro M, Shiomi K (2014) Enzymatic properties and primary structures of hyaluronidases from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Fish Physiol Biochem* 40:1043–1053. doi: 10.1007/s10695-013-9904-5
- Kiriake A, Shiomi K (2011) Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Toxicon* 58:494–501. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.08.010
- Kizer KW (1985) Scorpaeidae Envenomation. *Jama* 253:807. doi: 10.1001/jama.1985.03350300095028
- Krause A, Neitz S, Schulz A, et al (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *J Biol Chem* 275:147–150.
- Kremer N, Schwartzman J, Augustin R, et al (2014) The dual nature of haemocyanin in the establishment and persistence of the squid – vibrio symbiosis. *Proc R Soc Biol Sci* 281. doi: 10.5061/dryad.cq032
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Kumar BK, Deekshit VK, Raj JRM, et al (2014) Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquaculture* 433:247–251. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.06.016
- Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75:417–434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Kümmerer K, Henninger A (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin Microbiol Infect* 9:1203–1214. doi: 10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x
- Labreuche Y, Le Roux F, Henry J, et al (2010) *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* 29:753–8. doi: 10.1016/j.fsi.2010.07.007
- Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, et al (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 30:367–379. doi: 10.1016/j.dci.2005.05.003
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, et al (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ* 46:139–45. doi: 10.3354/dao046139
- Lai Y, Gallo RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30:131–141. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003
- Lambert C, Nicolas JL, Bultel V (2001) Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *J Invertebr Pathol* 77:165–172. doi: 10.1006/jipa.2001.5013
- Lambert C, Nicolas JL, Cilia V, Corre S (1998) *Vibrio pectenicida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 2:481–487. doi: 10.1099/00207713-48-2-481
- Lange A, Sebire M, Rostkowski P, et al (2015) Environmental chemicals active as human antiandrogens do not activate a stickleback androgen receptor but enhance a feminising effect of oestrogen in roach. *Aquat Toxicol* 168:48–59. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.09.014
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–9. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Lauth X, Babon JJ, Stannard JA, et al (2005) Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial

-
- activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J Biol Chem* 280:9272–9282. doi: 10.1074/jbc.M411154200
- Lauth X, Shike H, Burns JC, et al (2002) Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *J Biol Chem* 277:5030–5039. doi: 10.1074/jbc.M109173200
- Le Pabic C, Goux D, Guillamin M, et al (2014) Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Fish Shellfish Immunol* 40:362–73. doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.020
- Lee IH, Cho Y, Lehrer RI (1997a) Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun* 65:2898–903
- Lee IH, Cho Y, Lehrer RI (1997b) Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides from the Solitary Tunicate, *Styela clava*. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 118:515–521. doi: 10.1016/S0305-0491(97)00109-0
- Lee IH, Zhao C, Cho Y, et al (1997c) Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett* 400:158–162. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01374-9
- Lee JY, Boman A, Sun CX, et al (1989) Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci* 86:9159–9162. doi: 10.1073/pnas.86.23.9159
- Lee SY, Lee BL, Söderhäll K (2003) Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 278:7927–33. doi: 10.1074/jbc.M209239200
- Legrand B, Laurencin M, Sarkis J, et al (2011) Structure and mechanism of action of a de novo antimicrobial detergent-like peptide. *Biochim Biophys Acta* 1808:106–16. doi: 10.1016/j.bbammem.2010.08.020
- Lehrer RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11:23–27. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80005-3
- Li C, Haug T, Moe MK, et al (2010) Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev Comp Immunol* 34:959–968. doi: 10.1016/j.dci.2010.04.004
- Li H-X, Lu X-J, Li C-H, Chen J (2015) Molecular characterization of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*: antimicrobial activity and molecular mechanism. *Mol Immunol* 65:406–15. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.022
- Li Y (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expr Purif* 80:260–267. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001
- Liang T, Ji W, Zhang G-RR, et al (2013) Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol* 35:553–63. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.021
- Libralato G, Prato E, Migliore L, et al (2016) A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecol Indic* 69:35–49. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.04.017
- Liepinsh E, Andersson M, Ruyschaert JM, Otting G (1997) Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol* 4:793–5
- Lin W, Liu S, Hu L, Zhang S (2014) Characterization and bioactivity of hepcidin-2 in zebrafish: Dependence of antibacterial activity upon disulfide bridges. *Peptides* 57:36–42. doi: 10.1016/j.peptides.2014.04.014
- Litman GW, Rast JP, Fugmann SD (2010) The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 10:543–553. doi: 10.1038/nri2807
-

Bibliographie

- Liu T, Gao Y, Wang R, Xu T (2014) Characterization, evolution and functional analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in miiuy croaker. *Fish Shellfish Immunol* 41:191–9. doi: 10.1016/j.fsi.2014.08.010
- Liu X, Steele JC, Meng X-Z (2017) Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.003
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Lonnstedt OM, Ferrari MCO, Chivers DP (2014) Lionfish predators use flared fin displays to initiate cooperative hunting. *Biol Lett* 10:20140281–20140281. doi: 10.1098/rsbl.2014.0281
- Lu XJ, Chen J, Huang ZA, et al (2011) Identification and characterization of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol* 31:52–57. doi: 10.1016/j.fsi.2011.03.005
- Ma Y, Liu C, Liu X, et al (2010) Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics* 95:66–71. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.09.004
- Madec S, Pichereau V, Jacq A, et al (2014) Characterization of the Secretomes of Two *Vibrios* Pathogenic to Mollusks. *PLoS One* 9:e113097. doi: 10.1371/journal.pone.0113097
- Magnadóttir B, Magnadóttir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20:137–51. doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* 6:1–12. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194
- Maier VH, Dorn K V, Gudmundsdottir BK, Gudmundsson GH (2008) Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Mol Immunol* 45:3723–30. doi: 10.1016/j.molimm.2008.06.002
- Mak AS, Jones BL (1976) The amino acid sequence of wheat β -purothionin. *Can J Biochem* 54:835–842. doi: 10.1139/o76-120
- Manaia CM (2017) Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends Microbiol* 25:173–181. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.014
- Manefield M, De Nys R, Kumar N, et al (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145:283–291. doi: 10.1099/13500872-145-2-283
- Manniello JM, Heymann H, Adair FW (1978) Resistance of Spheroplasts and Whole Cells of *Pseudomonas cepacia* to Polymyxin B. 14:500–504
- Maria-Neto S, de Almeida KC, Macedo MLR, Franco OL (2015) Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848:3078–3088. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.02.017
- Marvin LF, Zatylny C, Leprince J, et al (2001) Characterization of a novel *Sepia officinalis* neuropeptide using MALDI-TOF MS and post-source decay analysis. *Peptides* 22:1391–1396. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00480-6
- Masso-Silva J, Diamond G (2014) Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals* 7:265–310. doi: 10.3390/ph7030265
- Matamouros S, Miller SI (2016) HHS Public Access. 1848:3021–3025. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.01.013.S.
- Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*

- Maximus L (1988) Short Communication Bacteria Associated with Cultured Rotifers and *Artemia* are Detrimental to Larval Turbot, *Scophthalmus*. i:289–293
- McFall-Ngai M, Ruby E (1991) Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. *Science* (80-) 254:1491–1494. doi: 10.1126/science.1962208
- Medhioub A (1986) Etude de la croissance et du cycle sexuel de la seiche (*Sepia officinalis*) des côtes normandes. Thèse de doctorat, Université de Caen
- Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate Immunity: Minireview The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91:295–298
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–397. doi: 10.1038/41131
- Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M (2016) *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Dis Aquat Organ* 120:49–68. doi: 10.3354/dao03006
- Mersni-Achour R, Cheikh Y Ben, Pichereau V, et al (2015) Factors other than metalloprotease are required for full virulence of French *Vibrio tubiashii* isolates in oyster larvae. *Microbiology* 161:997–1007. doi: 10.1099/mic.0.000058
- Mersni-Achour R, Imbert-Auvray N, Huet V, et al (2014) First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J Invertebr Pathol* 123:49–59. doi: 10.1016/j.jip.2014.09.006
- Messenger AJ, Barclay R (1983) Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochem Educ* 11:54–63. doi: 10.1016/0307-4412(83)90043-2
- Messenger JB (1968) The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Anim Behav* 16:342–357. doi: 10.1016/0003-3472(68)90020-1
- Messenger JB (2001) Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol Rev Camb Philos Soc* 76:473–528. doi: 10.1016/B978-0-12-415823-8.00025-3
- Miao J, Guo H, Chen F, et al (2016) Antibacterial Effects of a Cell-Penetrating Peptide Isolated from Kefir. *J Agric Food Chem* 64:3234–3242. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00730
- Michl H, Bachmayer H (1963) Über das Giftsekret der Gelbbauchunke *Bombina variegata* L. (2. Mitt.). *Monatshefte für Chemie* 94:814–818. doi: 10.1007/BF00902352
- Miconai A, Wien F, Kernya L, et al (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 112:E3095–E3103. doi: 10.1073/pnas.1500851112
- Millin AL, Noel F, Warens I (1813) *Journal des sciences, des lettres*
- Ming L, Huang J-A (2017) The Antibacterial Effects of Antimicrobial Peptides OP-145 against Clinically Isolated Multi-Resistant Strains. *Jpn J Infect Dis* 70:601–603
- Mollay C, Kreil G (1974) Enhancement of bee venom phospholipase A2 activity by melittin, direct lytic factor from cobra venom and polymyxin B. *FEBS Lett* 46:141–144. doi: 10.1016/0014-5793(74)80354-6
- Morris JAJ (2009) Summary for Policymakers. In: Intergovernmental Panel on Climate Change (ed) *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–30
- Mura M, Wang J, Zhou Y, et al (2016) The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides. *Eur Biophys J* 45:195–207. doi: 10.1007/s00249-015-1094-x
- Mustapha S, Mustapha EM, Nozha C (2013) *Vibrio alginolyticus* : an emerging pathogen of foodborne diseases. *Ijst* 2:302–309

Bibliographie

- Myers JK, Pace CN, Scholtz JM (1998) Trifluoroethanol effects on helix propensity and electrostatic interactions in the helical peptide from ribonuclease T1. *Protein Sci* 7:383–388. doi: 10.1002/pro.5560070219
- Nakayama K (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 (Pt 3:625–35
- Nemeth E, Preza GC, Jung C-L, et al (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107:328–33. doi: 10.1182/blood-2005-05-2049
- Nicolas JL, Comps M, Cochennec-Laureau N (1992) Herpes-like Virus Infecting Pacific-Oyster Larvae, *Cassostrea Gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12:11–13
- Nielsen M, Høi L, Schmidt A, et al (2001) Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Dis Aquat Organ* 46:23–29. doi: 10.3354/dao046023
- Nigam AK, Kumari U, Mittal S, Mittal AK (2012) Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish Physiol Biochem* 38:1245–1256. doi: 10.1007/s10695-012-9613-5
- Nikaido H (2009) Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* 78:119–146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- Niu S-F, Jin Y, Xu X, et al (2013) Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans*. *Fish Shellfish Immunol* 35:513–524. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.007
- Nobile M, Magnelli V, Lagostena L, et al (1994) The Toxin Helothermine Affects Potassium Currents in Newborn Rat Cerebellar Granule Cells. *J Membr Biol* 193:49–55. doi: 10.1007/bf00232674
- Nobile M, Noceti F, Prestipino G, Possani LD (1996) Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Exp Brain Res* 110:15–20. doi: 10.1007/BF00241369
- Noga EJ, Silphaduang U, Park NG, et al (2009) Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 152:299–305. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.12.018
- Oh E-G, Son K-T, Yu H, et al (2005) Antimicrobial Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Farmed Fish in Korea from. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-307
- Olafsen J a, Mikkelsen H V, Giaever HM, Høvik Hansen G (1993) Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 59:1848–54
- Orban E, Di Lena G, Masci M, et al (2004) Growth, nutritional quality and safety of oysters(*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice(Italy). *J Sci Food Agric* 84:1929–1938. doi: 10.1002/jsfa.1896
- Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, et al (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341 (Pt 3:501–13. doi: 10.1042/0264-6021:3410501
- Osorio D, Casas J, Kim D, et al (2017) Dynamic Skin Patterns in Cephalopods. *Front Physiol Dyn Ski Patterns Cephalopods Front Physiol* 8:. doi: 10.3389/fphys.2017.00393
- Ovchinnikova T V., Balandin S V., Aleshina GM, et al (2006) Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 348:514–523. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.078
- Oxley APA, Shipton W, Owens L, McKay D (2002) Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J Appl Microbiol* 93:214–223. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01673.x
- Pan C-Y, Chen J-Y, Cheng Y-SE, et al (2007) Gene expression and localization of the epinecidin-1

-
- antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coioides*), and its role in protecting fish against pathogenic infection. *DNA Cell Biol* 26:403–13. doi: 10.1089/dna.2006.0564
- Park CB, Kim HS, Kim SC (1998a) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244:253–257. doi: 10.1006/bbrc.1998.8159
- Park CB, Kim MS, Kim SC (1996) A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem Biophys Res Commun* 218:408–13. doi: 10.1006/bbrc.1996.0071
- Park CH, Valore E V, Waring a J, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806–10. doi: 10.1074/jbc.M008922200
- Park IY, Park CB, Kim MS, et al (1998b) Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett* 437:258–262. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01238-1
- Park K-I, Paillard C, Le Chevalier P, Choi K-S (2006) Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. *Aquaculture* 255:610–613. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.011
- Park NG, Silphaduang U, Moon HS, et al (2011a) Structure–Activity Relationships of Piscidin 4, a Piscine Antimicrobial Peptide. *Biochemistry* 50:3288–3299. doi: 10.1021/bi101395j
- Park S-C, Moon JC, Kim N-H, et al (2016) Algicidal effect of hybrid peptides as potential inhibitors of harmful algal blooms. *Biotechnol Lett* 38:847–854. doi: 10.1007/s10529-016-2052-0
- Park SC, Lee JK, Kim SW, Park Y (2011b) Selective algicidal action of peptides against harmful algal bloom species. *PLoS One* 6:. doi: 10.1371/journal.pone.0026733
- Parseghian MH, Luhrs KA (2006) Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has . *Biochem Cell Biol* 84:589–595. doi: 10.1139/o06-082
- Pascual S, Gestal C, Estkvez JM, et al (1996a) Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Aquaculture* 142:1–10
- Pascual S, Gestal C, Estkvez JM, et al (1996b) Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Aquaculture* 142:1–10
- Pascual S, González A, Guerra A (2007) Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: Towards a waterfall understanding. *Rev Fish Biol Fish* 17:139–144. doi: 10.1007/s11160-006-9021-y
- Patat S a, Carnegie RB, Kingsbury C, et al (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur J Biochem* 271:4825–4833. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04448.x
- Patel MR, Wells S (1993) Lionfish envenomation of the hand. *J Hand Surg Am* 18:523–525. doi: 10.1016/0363-5023(93)90105-C
- Patrzykat A, Gallant JW, Seo J-K, et al (2003) Novel Antimicrobial Peptides Derived from Flatfish Genes. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2464–2470. doi: 10.1128/AAC.47.8.2464-2470.2003
- Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al (2006) Human β -defensins. *Cell Mol Life Sci* 63:1294–1313. doi: 10.1007/s00018-005-5540-2
- Peeler EJ, Reese RA, Cheslett DL, et al (2012) Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Prev Vet Med* 105:136–43. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.02.001
- Pellegrino D (2004) No hemoglobin but NO: the icefish (*Chionodraco hamatus*) heart as a paradigm. *J Exp Biol* 207:3855–3864. doi: 10.1242/jeb.01180
- Penchala SC, Miller MR, Pal A, et al (2015) A biomimetic approach for enhancing the in vivo half-life of
-

- peptides. *Nat Chem Biol* 11:793–798. doi: 10.1038/nchembio.1907
- Peng K-C, Lee S-H, Hour A-L, et al (2012) Five Different Piscidins from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Analysis of Their Expressions and Biological Functions. *PLoS One* 7:. doi: 10.1371/journal.pone.0050263
- Pernice M, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, et al (2007) Identification of a *Vibrio* strain producing antimicrobial agents in the excretory organs of *Nautilus pompilius* (Cephalopoda: Nautiloidea). *Rev Fish Biol Fish* 17:197–205. doi: 10.1007/s11160-006-9029-3
- Peschel a, Otto M, Jack RW, et al (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274:8405–8410. doi: 10.1074/JBC.274.13.8405
- Peschel A, Sahl HG (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529–536. doi: 10.1038/nrmicro1441
- Peter Chiou P, Khoo J, Bols NC, et al (2006) Effects of linear cationic α -helical antimicrobial peptides on immune-relevant genes in trout macrophages. *Dev Comp Immunol* 30:797–806. doi: 10.1016/j.dci.2005.10.011
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Pettit GR, Kamano Y, Herald CL, et al (1987) The Isolation and Structure of a Remarkable Marine Animal Antineoplastic Constituent: Dolastatin 10. *J Am Chem Soc* 109:6883–6885. doi: 10.1021/ja00256a070
- Pietiäinen M, François P, Hyyryläinen H-L, et al (2009) Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 10:429. doi: 10.1186/1471-2164-10-429
- Powers J-PS, Hancock REW (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681–91. doi: 10.1016/j.peptides.2003.08.023
- Priede IG, Froese R (2013) Colonization of the deep sea by fishes. *J Fish Biol* 83:1528–1550. doi: 10.1111/jfb.12265
- Pulkkinen K, Suomalainen L-R, Read AF, et al (2010) Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proc R Soc B Biol Sci* 277:593–600. doi: 10.1098/rspb.2009.1659
- Pusack TJ, Benkwitt CE, Cure K, Kindinger TL (2016) Invasive Red Lionfish (*Pterois volitans*) grow faster in the Atlantic Ocean than in their native Pacific range. *Environ Biol Fishes* 99:571–579. doi: 10.1007/s10641-016-0499-4
- Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, et al (2010) “Fish matters”: The relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp Dermatol* 19:313–324. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.01059.x
- Rakers S, Niklasson L, Steinhagen D, et al (2013) Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology. *J Invest Dermatol* 133:1140–1149. doi: 10.1038/jid.2012.503
- Ramos-Ascherl Z, Williams EH, Bunkley-Williams L, et al (2015) Parasitism in *Pterois volitans* (Scorpaenidae) from Coastal Waters of Puerto Rico, the Cayman Islands, and the Bahamas. *J Parasitol* 101:50–56. doi: 10.1645/13-422.1
- Renault T, Bouquet AL, Maurice J-T, et al (2014) Ostreid Herpesvirus 1 Infection among Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: Relevance of Water Temperature to Virus Replication and Circulation Prior to the Onset of Mortality. *Appl Environ Microbiol* 80:5419–26. doi: 10.1128/AEM.00484-14
- Resiere D, Cerland L, De Haro L, et al (2016) Envenomation by the invasive *Pterois volitans* species (lionfish) in the French West Indies – a two-year prospective study in Martinique. *Clin Toxicol*

- Richards RC, O'Neil DB, Thibault P, Ewart KV (2001) Histone H1: An Antimicrobial Protein of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Biochem Biophys Res Commun* 284:549–555. doi: 10.1006/bbrc.2001.5020
- Robertson LS, Iwanowicz LR, Marranca JM (2009) Identification of centrarchid hepcidins and evidence that 17 β -estradiol disrupts constitutive expression of hepcidin-1 and inducible expression of hepcidin-2 in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish Shellfish Immunol* 26:898–907. doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.023
- Robin J-P, Roberts M, Zeidberg L, et al (2014) Transitions During Cephalopod Life History. In: *Advances in Marine Biology*. pp 361–437
- Robinette D, Wada S, Arroll T, et al (1998) Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus* : characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell Mol Life Sci* 54:467–475. doi: 10.1007/s000180050175
- Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE (2002) Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12179–12184. doi: 10.1073/pnas.182199699
- Rodrigues PNS, Vázquez-Dorado S, Neves J V, Wilson JM (2006) Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev Comp Immunol* 30:1156–1167. doi: 10.1016/j.dci.2006.02.005
- Rodrigues S, Paillard C, Dufour A, Bazire A (2014) Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob Proteins* 7:45–51. doi: 10.1007/s12602-014-9173-3
- Rodrigues S, Paillard C, Pennec G Le, et al (2015) *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease, forms biofilms with spherical components. *Front Microbiol* 6:1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.01384
- Rojas R, Miranda CD, Opazo R, Romero J (2015) Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J Invertebr Pathol* 124:61–69. doi: 10.1016/j.jip.2014.10.009
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, O'Leary CJ, et al (2005) Antimicrobial Peptide defenses in amphibian skin. *Integr Comp Biol* 45:137–142. doi: 10.1093/icb/45.1.137
- Roper CFE (1990) *Traite de Zoologie. Anatomie, Systematique, Biologie*. Pierre P. Grasse, Ed. Tome 5, fascicule 4, Cephalopodes. Katharina Mangold, Ed. Masson, Paris, 1989. 804 pp F1100. *Science* (80-) 248:898–899. doi: 10.1126/science.248.4957.898
- Rossl NW, ~ I R T H ' KJ, Wangl A, et al (2000) Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. 41:43–51
- Rozek A, Friedrich CL, Hancock REW (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39:15765–15774. doi: 10.1021/bi000714m
- Ruangsrri J, Kitani Y, Kiron V, et al (2013) A novel beta-defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity. *PLoS One* 8:e62302. doi: 10.1371/journal.pone.0062302
- Ruangsrri J, Salger SA, Caipang CMAA, et al (2012) Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol* 32:396–406. doi: 10.1016/j.fsi.2011.11.022
- Russell S, Lumsden JS (2005) Function and heterogeneity of fish lectins. *Vet Immunol Immunopathol* 108:111–120. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.08.004
- Ruth P, Schimmelpfennig R, Schipp R (1999) Comparative immunohistochemical and

- immunocytochemical investigations on the location of haemocyanin synthesis in dibranchiate and tetrabranchiate cephalopods (*Sepia* and *Nautilus*). *Adv Res living Foss cephalopods Dev Evol form, Constr Funct taphonomy, Palaeoecol palaeobiogeography, biostratigraphy basin Anal* 189–202
- Sahl H-G, Pag U, Bonness S, et al (2005) Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol* 77:466–475. doi: 10.1189/jlb.0804452
- Saleh H, Soliman AM, Mohamed AS, Marie M-AS (2015) Antioxidant Effect of *Sepia* Ink Extract on Extrahepatic Cholestasis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Biomed Environ Sci* 28:582–94. doi: 10.3967/bes2015.082
- Salerno G, Parrinello N, Roch P, Cammarata M (2007) cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 146:521–529. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.12.007
- Salger SA, Cassady KR, Reading BJ, Noga EJ (2016) A Diverse Family of Host-Defense Peptides (Piscidins) Exhibit Specialized Anti-Bacterial and Anti-Protozoal Activities in Fishes. *PLoS One* 11:e0159423. doi: 10.1371/journal.pone.0159423
- Salger SA, Reading BJ, Baltzegar DA, et al (2011) Molecular characterization of two isoforms of piscidin 4 from the hybrid striped bass (*Morone chrysops* ?? *Morone saxatilis*). *Fish Shellfish Immunol* 30:420–424. doi: 10.1016/j.fsi.2010.10.009
- Salvi D, Mariottini P (2016) Molecular taxonomy in 2D: A novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zool J Linn Soc.* doi: 10.1111/zoj.12455
- Sangster CR, Smolowitz RM (2003) Description of *Vibrio alginolyticus* Infection in Cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. *Biol Bull* 205:233–234. doi: 10.2307/1543270
- Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, et al (2008) Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int* 34:1215–26. doi: 10.1016/j.envint.2008.04.009
- Sarges R, Witkop B (1965) Gramicidin A. V. The Structure of Valine- and Isoleucine-gramicidin A. *J Am Chem Soc* 87:2011–2020. doi: 10.1021/ja01087a027
- Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39:223–239. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x
- Savas S, Kubilay A, Basmaz N, et al (2005) EFFECT OF BACTERIAL LOAD IN FEEDS ON INTESTINAL MICROFLORA OF SEABREAM (*SPARUS AURATA*). 57:3–9
- Schmitt P, Duperthuy M, Montagnani C, et al (2011) Immune responses in the pacific oyster *Crassostrea gigas*: An overview with focus on summer mortalities
- Schmitt P, Gueguen Y, Desmarais E, et al (2010) Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*
- Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, et al (2012) The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* 3:160. doi: 10.3389/fmicb.2012.00160
- Schofield PJ (2009) Geographic extent and chronology of the invasion of non-native lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus 1758] and *P. miles* [Bennett 1828]) in the Western North Atlantic and Caribbean Sea. *Aquat Invasions* 4:473–479. doi: 10.3391/ai.2009.4.3.5
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, et al (2011) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* 469:419–423. doi: 10.1038/nature09674
- Schultz ET (1986) *Pterois volitans* and *Pterois miles*: Two Valid Species. *Copeia* 1986:686. doi: 10.2307/1444950

-
- Scocchi M, Pallavicini A, Salgaro R, et al (2009) The salmonid cathelicidins: A gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 152:376–381. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.01.003
- Seebah S, Suresh A, Zhuo S, et al (2007) Defensins knowledgebase: A manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 35:265–268. doi: 10.1093/nar/gkl866
- Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, et al (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267:4292–5
- Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, et al (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 268:6641–8
- Serrano (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture
- Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, et al (2016) Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–20
- Shan Z, Zhu K, Peng H, et al (2016) The new antimicrobial peptide sphystatin from the mud crab *Scylla paramamosain* with multiple antimicrobial mechanisms and high effect on bacterial infection. *Front Microbiol* 7:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.01140
- Sharma A, Rishi P, Gautam A, et al (2015) In vitro and in silico comparative evaluation of anti-*Acinetobacter baumannii* peptides. *J Microbiol Biotechnol.* doi: 10.4014/jmb.1508.08064
- Shaw TJ, Osborne M, Ponte G, et al (2016) Mechanisms of wound closure following acute arm injury in *Octopus vulgaris*. *Zool Lett* 2:8. doi: 10.1186/s40851-016-0044-5
- Shenkarev ZO, Panteleev P V., Balandin S V., et al (2012) Recombinant expression and solution structure of antimicrobial peptide aurelin from jellyfish *Aurelia aurita*. *Biochem Biophys Res Commun* 429:63–69. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.092
- Shephard KL (1994) Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fish* 4:401–429
- Sherman MA, Lehrer RI, Waring AJ, et al (2001) Clavaspilin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Pept Res* 58:445–456. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.10975.x
- Shike H, Lauth X, Westerman ME, et al (2002) Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 269:2232–7. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02881.x
- Shike H, Shimizu C, Lauth X, Burns JC (2004) Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates. *Dev Comp Immunol* 28:747–754. doi: 10.1016/j.dci.2003.11.009
- Shiomi K, Hosaka M, Fujita S, et al (1989) Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. *Mar Biol* 103:285–289. doi: 10.1007/BF00397261
- Sikkel PC, Tuttle LJ, Cure K, et al (2014) Low Susceptibility of Invasive Red Lionfish (*Pterois volitans*) to a Generalist Ectoparasite in Both Its Introduced and Native Ranges. doi: 10.1371/journal.pone.0095854
- Silphaduang U, Colorni A, Noga E (2006) Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Dis Aquat Organ* 72:241–252. doi: 10.3354/dao072241
- Silphaduang U, Noga EJ (2001) Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414:268–9. doi: 10.1038/35104690
- Sipos D, Andersson M, Ehrenberg A (1992) The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur J Biochem* 209:163–169. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17273.x
-

- Skarnes RC, Watson DW (1957) Antimicrobial Factors of Normal Tissues and Fluids. *Bacteriol Rev* 21:273–94
- Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp GD, Hauton C (2008) Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol* 32:758–772. doi: 10.1016/j.dci.2007.12.002
- Smith WL, Wheeler WC (2006) Venom Evolution Widespread in Fishes: A Phylogenetic Road Map for the Bioprospecting of Piscine Venoms. *J Hered* 97:206–217. doi: 10.1093/jhered/esj034
- Solano Id F (2017) Molecular Sciences Melanin and Melanin-Related Polymers as Materials with Biomedical and Biotechnological Applications—Cuttlefish Ink and Mussel Foot Proteins as Inspired Biomolecules. doi: 10.3390/ijms18071561
- Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P (2001a) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200:147–159
- Sperstad S V., Haug T, Blencke HM, et al (2011) Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol Adv* 29:519–530. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.021
- Sperstad S V., Haug T, Vasskog T, Stensvåg K (2009) Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Mol Immunol* 46:2604–2612. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.002
- Stafford JL, Belosevic M (2003) Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev Comp Immunol* 27:539–554. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00138-6
- Steckbeck JD, Deslouches B, Montelaro RC (2014) Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opin Biol Ther* 14:11–14. doi: 10.1517/14712598.2013.844227
- Stensvåg K, Haug T, Sperstad S V., et al (2008) Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev Comp Immunol* 32:275–285. doi: 10.1016/j.dci.2007.06.002
- Stewart MJ, Favrel P, Rotgans BA, et al (2014) Neuropeptides encoded by the genomes of the akoya pearl oyster *pinctata fucata* and pacific oyster *crassostrea gigas*: A bioinformatic and peptidomic survey. *BMC Genet* 15:1–16. doi: 10.1186/1471-2164-15-840
- Stotz HU, Thomson J, Wang Y (2009) Plant defensins. *Plant Signal Behav* 4:1010–1012. doi: 10.4161/psb.4.11.9755
- Strandberg E, Tiltak D, Ieronimo M, et al (2007) Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic α -helical peptides. *Pure Appl Chem* 79:717–728. doi: 10.1351/pac200779040717
- Streftaris N, Zenetos A (2006) Alien marine species in the Mediterranean - the 100 “worst invasives” and their impact. *Mediterr Mar Sci* 7:87–118. doi: 10.12681/mms.180
- Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, et al (1998) Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:4002–4006
- Sung Jung T, del Castillo CS, Javaregowda PK, et al (2012) Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dev Comp Immunol* 38:295–301. doi: 10.1016/j.dci.2012.06.005
- Tang YQ, Yuan J, Osapay G, et al (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* 286:498–502
- Tanguy a., Fernandez Castro N, Marhic A, Moraga D (1999) Effects of an Organic Pollutant (Tributyltin) on Genetic Structure in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Pollut Bull* 38:550–559. doi:

- Tasiemski A, Schikorski D, Le Marrec-Croq F, et al (2007) Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Dev Comp Immunol* 31:749–762. doi: 10.1016/j.dci.2006.11.003
- Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Amparyup P (2014) Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 48:324–341. doi: 10.1016/j.dci.2014.05.020
- Thaker HD, Som A, Ayaz F, et al (2012) Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides with Immunomodulatory Responses. *J Am Chem Soc* 134:11088–11091. doi: 10.1021/ja303304j
- Thomas S, Karnik S, Barai RS, et al (2010) CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 38:D774–80. doi: 10.1093/nar/gkp1021
- Thompson, Lopes F, Brian Austin JGS, Microbiology AS for (2006) *The Biology of Vibrios*
- Tomasinsig L, Zanetti M (2005) The cathelicidins - structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 6:23–34. doi: 10.2174/1389203053027520
- Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 267:5023–5031. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x
- Toyes-Vargas E, Calderón-de la Barca AM, Duran-Encinas Y, et al (2017) Marine co-product meals as a substitute of fishmeal in diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei* improve growth, feed intake and muscle HUFA composition. *Aquac Res* 48:3782–3800. doi: 10.1111/are.13205
- Travers MA, Mersni Achour R, Haffner P, et al (2014) First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J Invertebr Pathol* 123:38–48. doi: 10.1016/j.jip.2014.04.009
- Troncone L, De Lisa E, Bertapelle C, et al (2015) Morphofunctional characterization and antibacterial activity of haemocytes from *Octopus vulgaris*. *J Nat Hist* 49:1457–1475. doi: 10.1080/00222933.2013.826830
- Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB (1998) The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Microbiology* 95:14464–14469. doi: 10.1073/pnas.95.24.14464
- Ueda A, Nagai H, Ishida M, et al (2008) Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon* 52:574–581. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.07.007
- Umasuthan N, Mothishri MS, Thulasitha WS, et al (2016) Molecular, genomic, and expressional delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pis1 peptide. *Fish Shellfish Immunol*. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.005
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med (Praha)* 56:2011–486
- Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE, Zasloff M (2003) Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides* 24:1655–1667. doi: 10.1016/j.peptides.2003.08.024
- van der Marel M, Adamek M, Gonzalez SF, et al (2012) Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish Shellfish Immunol* 32:494–501. doi: 10.1016/j.fsi.2011.12.008
- Van Epps HL (2006) René Dubos: unearthing antibiotics. *J Exp Med* 203:259–259. doi: 10.1084/jem.2032fta
- Vargas-Albores F, Martínez-Porchas M (2017) Crustins are distinctive members of the WAP-containing protein superfamily: An improved classification approach. *Dev Comp Immunol* 76:9–17. doi: 10.1016/j.dci.2017.05.012

Bibliographie

- Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T A peer-reviewed J Formul Manag* 40:277–83. doi: 10.1139/o76-120
- Verdon J, Coutos-Thevenot P, Rodier MH, et al (2016) Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front Microbiol* 7:. doi: 10.3389/fmicb.2016.01484
- Verdon J, Falge M, Maier E, et al (2009) Detergent-like activity and α -helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys J* 97:1933–1940. doi: 10.1016/j.bpj.2009.06.053
- Vetrano SJ, Lebowitz JB, Marcus S Selected Topics: Toxicology LIONFISH ENVENOMATION
- Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, et al (2014) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol*. doi: 10.1111/1462-2920.12484
- Waghu FH, Barai RS, Idicula-Thomas S (2016) Leveraging family-specific signatures for AMP discovery and high-throughput annotation. *Sci Rep* 6:1–7. doi: 10.1038/srep24684
- Waghu FH, Gopi L, Barai RS, et al (2014) CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 42:D1154–D1158. doi: 10.1093/nar/gkt1157
- Wang F, Li H, Liu M na, et al (2006) Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels. *Biochem Biophys Res Commun* 351:443–448. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.067
- Wang G (2015) Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. In: Zhou P, Huang J (eds) *Computational Peptidology*. Springer New York, New York, NY, pp 43–66
- Wang G, Li X, Wang Z (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 44:. doi: 10.1093/nar/gkv1278
- Wang G, Li X, Wang Z (2009) APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37:933–937. doi: 10.1093/nar/gkn823
- Wang J, Shen B, Guo M, et al (2005) Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel. *Biochemistry* 44:10145–10152. doi: 10.1021/bi050614m
- Wang L, Song X, Song L (2017) The oyster immunity. *Dev Comp Immunol* 80:99–118. doi: 10.1016/j.dci.2017.05.025
- Wang Y-D, Kung C-W, Chi S-C, Chen J-Y (2010) Inactivation of nervous necrosis virus infecting grouper (*Epinephelus coioides*) by epinecidin-1 and hepcidin 1–5 antimicrobial peptides, and downregulation of Mx2 and Mx3 gene expressions. *Fish Shellfish Immunol* 28:113–120. doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.001
- Wang Z, Wang G (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* 32:D590-2. doi: 10.1093/nar/gkh025
- Wimley WC (2010) Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem Biol* 5:905–917. doi: 10.1021/cb1001558
- Wong JH, Xia L NT (2007) A Review of Defensins of Diverse Origins. *Curr Protein Pept Sci* 17:446–459. doi: 10.2174/138920307782411446#sthash.PeCJHmH9.dpuf
- Xu G, Wu M, Wang L, et al (2009) Conformational and dynamics simulation study of antimicrobial peptide hedistin-heterogeneity of its helix-turn-helix motif. *Biochim Biophys Acta* 1788:2497–2508. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.10.001
- Yamaichi Y, Duigou S, Shakhnovich EA, Waldor MK (2009) Targeting the replication initiator of the second vibrio chromosome: Towards generation of Vibrionaceae-specific antimicrobial agents. *PLoS Pathog* 5:. doi: 10.1371/journal.ppat.1000663

-
- Yamaichi Y, Iida T, Park K (1999) Physical and genetic map of the genome of *Vibrio*. 31:1513–1521
- Yamazaki Y, Brown RL, Morita T (2002a) Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry* 41:11331–11337. doi: 10.1021/bi026132h
- Yamazaki Y, Koike H, Sugiyama Y, et al (2002b) Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur J Biochem* 269:2708–2715. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02940.x
- Yan H, Hancock REW (2001) Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1558–1560. doi: 10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001
- Yan L, Adams ME (1998) Protein chemistry and structure : Lycotoxins , Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis* Lycotoxins , Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis* *. 273:2059–2066. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.07.020
- Yang G, Guo H, Li H, et al (2014a) Molecular characterization of LEAP-2 cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the differential expression upon a *Vibrio anguillarum* stimulus; indications for a significant immune role in skin. *Fish Shellfish Immunol* 37:22–9. doi: 10.1016/j.fsi.2014.01.004
- Yang J, Lu X-J, Chai F-C, Chen J (2016) Molecular characterization and functional analysis of a piscidin gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Sci Press Zool Res* 37:347–355. doi: 10.13918/j.issn.2095-8137.2016.6.347
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, et al (2001) Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys J* 81:1475–1485. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X
- Yang M, Chen B, Cai J, et al (2011) Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Molecular characterization of hepcidin AS-hepc2 and AS-hepc6 in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): Expression pattern responded to bacterial challenge and in vitro antimicrobial activity. *Comp Biochem Physiol Part B* 158:155–163. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.11.003
- Yang Y, Poncet J, Garnier J, et al (2003) Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J Biol Chem* 278:36859–36867. doi: 10.1074/jbc.M305450200
- Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55:27–55. doi: 10.1124/pr.55.1.2
- Yin Z-X, He W, Chen W-J, et al (2006) Cloning, expression and antimicrobial activity of an antimicrobial peptide, epinecidin-1, from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 253:204–211. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.002
- Yoshimizu M, Kimura T (1976) Study on the Intestinal Microflora of Salmonids. *Fish Pathol* 10:243–259. doi: 10.3147/jsfp.10.243
- Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5449–53. doi: 10.1097/00043764-198806000-00004
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–95. doi: 10.1038/415389a
- Zatylny-Gaudin C, Cornet V, Leduc A, et al (2016) Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis* : Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *J Proteome Res* 15:48–67. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00463
- Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, Henry J (2000a) The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1013–8. doi: 10.1006/bbrc.2000.3595
- Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, Henry J (2000b) ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 275:217–22. doi: 10.1006/bbrc.2000.3286
-

- Zatylny C, Marvin L, Gagnon J, Henry J (2002) Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1186–93
- Zhang J, Kong X, Zhou C, et al (2014) Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. *Fish Shellfish Immunol* 41:380–388. doi: 10.1016/j.fsi.2014.09.022
- Zhang J, Yan Q, Ji R, et al (2009) Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol* 26:864–870. doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.014
- Zhang M, Long H, Sun L (2013) A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens. *Dev Comp Immunol* 40:258–265. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.005
- Zhang Y-A, Zou J, Chang C-I, Secombes CJ (2004) Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol* 101:259–269. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.05.005
- Zhao JG, Zhou L, Jin JY, et al (2009) Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka β -defensin. *Dev Comp Immunol* 33:624–637. doi: 10.1016/j.dci.2008.11.006
- Zhao L, Lu W (2014) Defensins in innate immunity. *Curr Opin Hematol* 21:37–42. doi: 10.1097/MOH.0000000000000005
- Zhou J, Fang W, Yang X, et al (2012) A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *PLoS One* 7:e29961. doi: 10.1371/journal.pone.0029961
- Zhou Q-J, Wang J, Liu M, et al (2016) Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*. *Fish Shellfish Immunol* 55:195–202. doi: 10.1016/j.fsi.2016.05.035
- Zhuang Z-R, Yang X-D, Huang X-Z, et al (2017) Three new piscidins from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): Phylogeny, expression and functional characterization. *Fish Shellfish Immunol* 66:240–253. doi: 10.1016/j.fsi.2017.04.011
- Ziegman R, Alewood P (2015) Bioactive Components in Fish Venoms. *Toxins (Basel)* 7:1497–1531. doi: 10.3390/toxins7051497
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C (2007a) Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol* 44:638–47. doi: 10.1016/j.molimm.2006.01.012

Annexes

Table 1. Numéro d'accèsion des séquences de piscidines utilisées pour l'analyse phylogénétique.

Nom séquence	origine	numéro d'accèsion
Ch-piscidine	<i>Chionodraco hamatus</i>	CBX55949.1
Dl-dicentracine	<i>Dicentrarchus labrax</i> (bar commun)	P59906.1
Ec-piscidine-2		ADY86111.1
Ec-piscidine-1	<i>Epinephelus coioides</i> (mérrou à taches oranges)	ACE78291.1
Ec-piscidine-4		AKA60777.2
Gm-gaduscidine-1		ACS91329.1
Gm-piscidine-2-β	<i>Gadus morhua</i> (morue d'Atlantique)	ADU34223.1
Gm-gaduscidine-2		ADK63424.1
Gc-pleurocidine-3.8		AAP55799.1
Gc-pleurocidine-3.2	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i> (fausse limande)	AAP55800.1
Gc-pleurocidine-Sc4B7		AAP55798.1
Hp-pleurocidine-AP3		ABB70232.1
Hp-pleurocidine-AP2	<i>Hippoglossoides platessoides</i> (flétan nain)	AAP55794.1
Hp-pleurocidine-AP1		AAP55793.1
Lc-piscidine-1		ACE78289.1
Lc-piscidine-2		AGN52988.1
Lc-piscidine-3-T5.2	<i>Larimichthys crocea</i> (tambour à gros yeux)	AIL82389.1
Lc-piscidine-3-T5		AIL82388.1
Lc-piscidine-3-T5.3		AQS27931.1
Mc-piscidine-6		APQ32044.1
Mc-piscidine-5		ADP37960.1
Mc-piscidine-3	<i>Morone chrysops</i> (bar blanc)	APQ32046.1
Mc-piscidine-4		APQ32050.1
Mc-moronecidine		Q8UUG2.1
Ms-moronecidine		Q8UUG0.1
Ms-piscidine-4	<i>Morone saxatilis</i> (bar rayé)	ADP37959.1
Ms-piscidine-6		APQ32043.1
Ms-piscidine-7		APQ32054.1
Of-piscidine-1	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	BAM99884.1
Of-moronecidine		KT354978
On-piscidine-4		AGA16547.1
On-piscidine-3		AGA16546.1
On-piscidine-5	<i>Oreochromis niloticus</i> (tilapia)	AGA16548.1
On-piscidine-2		AGA16545.1
On-piscidine-1		AGA16544.1
Pc-moronecidine	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	AOW44479.1
Pa-pleurocidine		P81941.2
Pa-pleurocidine-2		Q90ZY0.1
Pa-pleurocidine-4	<i>Pseudopleuronectes americanus</i> (plie rouge)	Q90ZX8.1
Pa-pleurocidine-3		Q90VW7.1
Pa-pleurocidine-6		AAQ16623.1
Sl-piscidine	<i>Seriola lalandi</i>	ARK85994.1
Sc-moronecidine	<i>Siniperca chuatsi</i> (perche chinoise, mandarin)	AAV65044.1
Pv-Pteroicidine-A		Cette étude
Pv-Pteroicidine-B	<i>Pterois volitans</i> (poisson-lion)	Cette étude
Pv-Pteroicidine-C		Cette étude
Nc-moronecidine	<i>Notothenia coriiceps</i>	XP_010768425.1.
HKPLP	<i>Hippocampus kuda</i> (hippocampe doré)	AAX58115.1

Table 2. List of the 811 AMPs From APD database use for the design of AMP from cuttlefish transcriptome.

APD ID	Séquence	Nom	APD ID	Séquence	Nom
AP00006	GNNRPVYIPQRPHPRI	Apidaecin IA	AP02363	INLKAITALAKKLL	Mastoparan-VT3
AP00007	GNNRPVYIPQRPHPRL	Apidaecin IB	AP02364	INLKAIAPLAKKLL	Mastoparan-VT4
AP00012	GLFDIIKKIAESI	Aurein 1.1	AP02365	VIVKAIATLSKKLL	Mastoparan-VT5
AP00013	GLFDIIKKIAESF	Aurein 1.2	AP02366	INLKAI AALVKKLL	Mastoparan-VT6
AP00014	GLLDIVKKVVGAFGSL	Aurein 2.1	AP02367	INLKAI AALARNY	Mastoparan-VT7
AP00015	GLFDIVKKVVGALGSL	Aurein 2.2	AP02368	FLPIIGKLLSGLL	VCT-VT1
AP00016	GLFDIVKKVVGAGISL	Aurein 2.3	AP02369	FLPIIGKLLSG	VCT-VT2
AP00017	GLFDIVKKVVGTLAGL	Aurein 2.4	AP02374	GLVGTLLGHIGKAILG	Frenatin 2.1S
AP00018	GLFDIVKKVVGAFGSL	Aurein 2.5	AP02375	GLVGTLLGHIGKAILS	Frenatin 2.2S
AP00019	GLFDIAKKVIGVIGSL	Aurein 2.6	AP02376	GLRRFLADQLVGRRI	Lassomycin
AP00020	GLFDIVKKIAGHIAGSI	Aurein 3.1	AP02386	KLSPSLGPVSKGKLLAGQR	P2-Hp-1935
AP00021	GLFDIVKKIAGHIASSI	Aurein 3.2	AP02387	RLGTALPALLKTLLAGLNG	P3-Hp-1891
AP00022	GLFDIVKKIAGHIVSSI	Aurein 3.3	AP02389	GKGLEVIKWKLVKHVIQL	P-02
AP00024	GVSGHGQHGTVHG	Alloferon 2	AP02390	LFAKINGLKVGPLKIQIV	P-03
AP00025	HGVSGHGQHGTVHG	Alloferon 1	AP02391	FSLFFPYAALKWLRKLLKK	P-04
AP00029	KWKLFKKIKFLHSACKF	Cecropin A	AP02392	VKLEILGSKGGAKI	P-05
AP00063	ILGPVLSLVGSALGGLIKKI	Maximin 6	AP02393	VSKIKKYLKYKDRI	P-10
AP00064	ILGPVLGLVGNALGGLIKNE	Maximin 7	AP02403	GILGKLWEGVKSIF	Hp1404
AP00065	ILGPVLSLVGNALGGLLKNE	Maximin 8	AP02404	WNDTGKDADGAIEY	Taromycin A
AP00066	IKITMTLAKLGKVLAVH	Bombolitin I	AP02409	AIFIFIRWLLKLGHHGRAPP	Salusin-beta
AP00067	SKITDILAKLGKVLAVH	Bombolitin II	AP02420	GVLSAFKNALPGIMKIIV	Hylaranin-L1
AP00068	IKIMDILAKLGKVLAVH	Bombolitin III	AP02421	GVLSVIKNALPGIMRF	Hylaranin-L2
AP00069	INIKDILAKLVKVLGHV	Bombolitin IV	AP02430	RLFRHAFKAVLRL	Pep39
AP00070	INVLGILGLLGKALSHL	Bombolitin V	AP02447	AGLQFPVGRIGRLLRK	Scolopendin 2
AP00094	FLPLIGRVLSGIL	Temporin A	AP02448	GFGSVLGKALKFGANLL	CPF-RP-F1
AP00095	LLPIVGNNLKSLL	Temporin B	AP02458	FLPVLGKVIKLVGGLL	Temporin-TP1
AP00096	LLPILGNLLNGLL	Temporin C	AP02459	FLPLLGAISSILPKIF	Temporin-TP2
AP00097	VLPPIGNLLNSLL	Temporin E	AP02460	FLPLLFGALSTLLPKIF	Temporin-TP3
AP00098	FLPLIGKVLSGIL	Temporin F	AP02467	FLPFVGKLLSGLL	Temporin-LF1
AP00099	FFPVIGRILNGIL	Temporin G	AP02487	GILDAIKAFANALG	Hylain 1
AP00101	FVQWFSKFLGRIL	Temporin L	AP02488	GILDKIAFAKAAG	Hylain 2
AP00104	FLPFLAKILTGVL	Temporin-1Ca	AP02494	FLSLIPSVIAGLVSAIRN	AaeAP1
AP00105	FLPLFASLIGKLL	Temporin-1Cb	AP02495	FLSLIPSAIAGLVSAIRN	AaeAP2
AP00106	FLPFLASLLTKVL	Temporin-1Cc	AP02516	YSLKKTSMKIIPFTRL	FGG
AP00107	FLPFLASLLSKVL	Temporin-1Cd	AP02527	FLPLILPSIVTALSSFLKQG	Hs-1
AP00108	FLPFLATLLSKVL	Temporin-1Ce	AP02531	FFSLIPSLVGGILSAFK	Stigmurin
AP00109	VLPLISMALGKLL	Temporin-1La	AP02542	LRLKSIVSYAKKVL	Mastoparan-S
AP00110	NFLGTLINLAKKIM	Temporin-1Lb	AP02551	ILGEIWKGIKDIL	Spiniferin
AP00111	FLPILINLIHKGLL	Temporin-1Lc	AP02560	FIGAVAGLLSKIF	BmKn1
AP00112	FLPIVGKLLSGLL	Temporin-1P	AP02570	GKIKLKASLKLL	GL13K
AP00136	FLPLILRKIVTAL	Crabrolin	AP02583	LLFGKIISRLGN	Temporin-1S

AP00142	GLKKLLGKLLKLGKLLK	GLK-19
AP00143	KKLLKWLKLL	L5K5W
AP00150	ILPWKWPWWPWR	Indolicidin
AP00152	VRRFPWWPFLRR	Tritrpticin
AP00167	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ	Phylloxin-B1
AP00168	GRPNPVNNKPTPHRL	Formaecin 1
AP00169	GRPNPVNTKPTYPRL	Formaecin 2
AP00170	VDKGSYLPRPTPPRIYNRN	Pyrrhocraticin
AP00172	GKPRPYSRPTSHPRIRV	Drosocin
AP00190	HPLKQYWWRPSI	PW2
AP00200	LKLSIVSWAKKVL	Mastoparan B
AP00201	INLKALAALAKKIL	Mastoparan
AP00262	GFVDFLKKVAGTIANVVT	Maculatin 2.1
AP00316	GIVDFAKKVVGGIRNALGI	Uperin 2.1
AP00317	GFVDLAKKVVGGIRNALGI	Uperin 2.2
AP00318	GFFDLAKKVVGGIRNALGI	Uperin 2.3
AP00319	GILDFAKTVVGGIRNALGI	Uperin 2.4
AP00320	GIVDFAKGVLGKIKNVLGI	Uperin 2.5
AP00321	GIIDIAKKLVGGIRNVLGI	Uperin 2.7
AP00322	GILDVAKTLVGKLRNVLGI	Uperin 2.8
AP00323	GVLDAFRKIATVVKNV	Uperin 3.1
AP00324	GVGDLIRKAVSVIKNIV	Uperin 3.5
AP00325	GVIDAAKKVVNVLKNLF	Uperin 3.6
AP00326	GVGSFIHKVVSIAKNVA	Uperin 4.1
AP00327	GWFDVVKHIAV	Uperin 7.1
AP00328	GFGKAFHSVSNFAKKHKTA	Styelin A
AP00329	GFGPAFHSVSNFAKKHKTA	Styelin B
AP00335	PKRKSATKGDEPA	Histone H6-like protein
AP00336	AERVGAGAPVYL	Histone H2A
AP00337	PDPAKTAPKKSKKAVT	Histone H2B-3
AP00338	PDPAKTAPKKSKKAVTKA	Histone H2B-1
AP00341	FIGLLISAGKAIHDLIRRRH	Chrysopsin-3
AP00344	GNNRPIYIPQRPHPRL	Apidaecin II
AP00351	GLFDVIKKVASVIGGL	Citropin 1.1
AP00352	GLFDIIKKVASVVGGL	Citropin 1.2
AP00353	GLFDIIKKVASVIGGL	Citropin 1.3
AP00362	VDKPDYRPRPRPPNM	Metalnikowin I
AP00363	VDKPDYRPRPWPRPN	Metalnikowin IIA
AP00364	VDKPDYRPRPWPRNMI	Metalnikowin IIB
AP00365	VDKPDYRPRPWPRPNM	Metalnikowin III
AP00381	GLVDVLGKVGGLIKLLP	Ponericin G6

AP02595	MWITNGGVANWYFVLAR	CcAMP1
AP02596	FIGALLRPALKLLA	Pxt-2
AP02597	FIGALLGPLLNLLK	Pxt-5
AP02603	LPFFLLSLIPSAISAIKKI	VpAmp1.0
AP02622	HLGHHALDHLLK	Holothuroidin 1
AP02623	ASHLGHHALDHLLK	Holothuroidin 2
AP02624	EVASFDKSKLK	Paracentrin 1
AP02629	KRFWQLVPLAIKIYRAWKRR	dCATH
AP02638	GLPWILLRWLFFRG	buCATHL4A
AP02639	AIPWIWIWRLLRKG	buCATHL4B
AP02640	RIRFPWPWRWPWWRRVRG	buCATHL4C
AP02641	RIRFPWPWRWPWWPPFRG	buCATHL4D
AP02642	AIPWIWIWWLLRKG	buCATHL4E
AP02643	AIPWSIWWRLLFKG	buCATHL4F
AP02644	AIPWSIWWHLLFKG	buCATHL4G
AP02671	KKLFKKILKYL	BP100
AP02672	AVPLIYKRPGVYVTKPKGK	Lividin 8 HLmb
AP02675	GIMSSLMKKLAAHIAK	HYL
AP02678	SSSLNTAWRKFG	Plantaricin Y
AP02703	MKTFLRLYRSLINKVLHV	ISGCock_Contig05_0593
AP02706	HNSSKQWSHWLWHNGIRI	ISGCock_Contig15_1337-2
AP02711	FLPVIAGVLSKLF	Tepmporin-1Ee
AP02719	GFGSKPLDSFGLNFF	Chaxapeptin
AP02720	GFGSKPIDSFGLSWL	Sungsanpin
AP02740	GLLSALRKMIPHILSHIKK	Antapin
AP02745	KRIGLIRLIGKILRGLRRLG	Saha-CATH5
AP02758	FIGMIPGLIGGLISAFK	ToAP1
AP02760	FIGMIPGLIGGLISAIK	ToAP3
AP02762	GILGKIWEGVKSIL	NDBP-5.8
AP02763	FFSMIPKIAGGIASLVKNLG	Phylloseptin-PBa
AP02764	SGYLPGKEYVYKYKGKVF	Longipin
AP02770	INWKKIKSIIKAAMN	Mastoparan V1
AP02774	VTQPLAPVHNPIV	PDC213
AP02775	FLFSLIPSAIGGLISAFK	Pepcon
AP02776	IRWRIRVWVRRI	IDR-1010
AP02777	VKGSWSKKFEVIA	Tridecaptin A1
AP02779	GKGSWSKKIEVIA	Tridecaptin B1
AP02780	ILSAIWSGIKGLL	Uy17
AP02781	FLSTIWNIGIKGLL	Uy192
AP02782	FPFLLSLIPSAISAIKRL	Uy234
AP02783	ISQSDAILSAIWSGIKSLF	Um2

AP00382	GLVDVLGKVGGLIKLLPG	Ponericin G7
AP00391	FIGTALGIASAIPAIVKLFK	Ponericin W6
AP00397	SGFVLKGYTKTSQ	Salmocidin 2A
AP00398	AGFVLKGYTKTSQ	Salmocidin 2B
AP00405	FISAIASMLGKFL	RANATUERIN 6
AP00406	FLSAIASMLGKFL	RANATUERIN 7
AP00407	FISAIASFLGKFL	RANATUERIN 8
AP00408	FLFPLITSFLSKVL	RANATUERIN 9
AP00427	GLLGPLLKIAAKVGSNLL	CPF-ST3
AP00430	ILGKIWEGIKSLF	Isolo scorpion cytotoxic peptide 1
AP00431	TWLKRRRWKKAKPP	Cyclic L27-11
AP00432	KKKKPLFGLFFGLF	The K4 peptide
AP00434	GLMSVLGHAVGNVLGGLFKS	Frenatin 3
AP00448	INLKAI AALAKKLL	Mastoparan M
AP00449	SYSMEHFRWGKPV	Alpha-MSH
AP00494	KWKLFKKIPKFLHLAKKF	P-18
AP00496	AKKVFRLEKLFSKIQNDK	HP 2-20
AP00497	ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL	Maximin H5
AP00499	VGALAVVVWLWLWLW	Gramicidin A
AP00500	GLGSVLGKALKIGANLL	CPF-AM1
AP00503	FLGVVFKLASKVFAVFGKV	D28
AP00506	KLAKLAKLAKLAK	DP1
AP00509	VAIALKAAHYHHTKE	Human Calcitermin
AP00521	ILGTILGLLKGL	Protonection
AP00522	INWLKLGKAIIDAL	Agelaia-MP
AP00523	KFHEKHSHRGY	human Histatin 8
AP00525	ILGPVLSMVGSAKGGLIKKI	Maximin H2
AP00526	ILGPVLGLVGNALGGLIKKI	Maximin H3
AP00527	ILGPVISKIGGVLGGLKNL	Maximin H4
AP00541	IDWKKLLDAAKQIL	Polybia-MPI
AP00542	ILGTILGLLKSL	Polybia-CP
AP00546	FLSLIPHAINAVSAIAKHN	Phylloseptin-H1
AP00547	RSNKGFNFMVDMIQALS	Maximin S4
AP00555	KGRGKQGKVRKAKTRSS	Parasin I
AP00586	FLPLLFGAISHLL	Temporin-GH
AP00589	FLGALAKIISGIF	Temporin-1TSa
AP00591	FLPLLGNLLRGLL	Temporin-1TSc
AP00595	FLPIIGKLLSGLL	Temporin-1CSb
AP00596	FLPLVTGLLSGLL	Temporin-1CSc
AP00597	NFLGTLVNLAKKIL	Temporin-1CSd
AP00598	FLSAITSLGKLL	Temporin-1SPb
AP00605	ILPILSLIGGLLGK	Temporin-1CEb

AP02784	FFSALLSGIKSLF	Um4
AP02789	AVKPKTAKPKTAKPKTA	VK6
AP02790	AKKPVAKKAAGGVKKPK	VK7
AP02793	AKKPVAKKAAGGVKKPKK	VK12
AP02795	KAAAACKSPKKPKPAAAKK	VK14
AP02796	SPKKTTPVKPKKVA	VK25
AP02805	VVYTLKRNGRTLYGF	HNr
AP02806	VVYALKRNGRTLYGF	H4-
AP02825	RERSKGSKYLYVG	Crinicepsin-2
AP02835	FLPLLAGLAAKWF	Temporin-HB1
AP02838	FLPFLAGLFGKIF	Temporin-HB2
AP02841	FLTGLIGGLMKALGK	Temporin-MS1
AP02842	FLSGLIGGLAKMLGK	Temporin-MS4
AP02847	FFFHIIKGLFHAGRMHGLV	ecPis-2
AP02858	GATPEDLNQKLS	Tet000
AP02859	RLARIVPIRVAR	Tet003
AP02860	RRWRIVVIRVRR	Tet008
AP02861	RRWKIVVIRWRR	Tet009
AP02862	VRFRIRVAVIRA	Tet013
AP02863	KKWKIVVIKWKK	Tet021
AP02864	KKWKIVVIRWRR	Tet022
AP02865	RRWKIVVIRWKK	Tet023
AP02866	RRRWIVVIWRRR	Tet024
AP02867	RRWRRWWRRWRR	Tet032
AP02868	RRRWWWRRWWRR	Tet033
AP02869	IVRVAVALRRIR	Tet037
AP02870	RRAAVVLIVIRR	Tet052
AP02871	ILKWKWPWWPWRR	Tet091
AP02872	FIKWKFRWWKWRK	Tet092
AP02873	FIRWRFRWWRWRR	Tet099
AP02880	GFVALLKKLPLILKHLH	Xac-1
AP02881	GFVALLKKLPLILKHLP	Xac-2
AP02882	GFLSALKKYLPIVLKHV	Osmin
AP02883	GMASLLAKVLPHVVKLIK	Codesane
AP02886	LLNQELLNPTHQIYPV	Beta-Casein 197
AP02887	GLEETVYIYGANMAS	p138c
AP02890	INLKAI AALAKKLF	Mastoparan-AF
AP02891	NLLNDALGTVNGLLGS	Dendropsophin 1
AP02892	VFLGAIAQALTSLGKL	Temporin-ITa
AP02919	FLSLIPKIATGIAALAKHL	Phylloseptin-PC
AP02921	IIGPVLGLVGKALGGLL	Bombinin H-BO1
AP02926	ASVVNKLTTGGVAGLLK	TP

AP00608	KRIVQRIKDFLR	KR-12
AP00611	FIGPIISALASLFG	Temporin-1DYa
AP00625	KRIVQRIKDFLRNLVPRTES	human KR-20
AP00658	FLPLVGKILSGLI	Temporin-1PLa
AP00659	FLPIASLLGKYL	Ranatuerin 5
AP00664	FLPAIAGILSQLF	Peptide A1
AP00665	FLPLIAGLIGKLF	Peptide B9
AP00666	EGGGPQWAVGHFM	PG-L
AP00667	EPHPDEFVGLM	PG-KI
AP00668	EPNPDEFVGLM	PG-KII
AP00669	EPHPNEFVGLM	PG-KIII
AP00670	EPNPDEFFGLM	PG-SPI
AP00671	EPNPNEFFGLM	PG-SPII
AP00695	FLPILGKLLSGIL	Temporin-1TGa
AP00696	GLFDIKNIVSTL	Dahlein 1.1
AP00697	GLFDIKNIFSGL	Dahlein 1.2
AP00701	GLLGSGINAIGAFIANKLKP	Dahlein 5.1
AP00703	GLLASLGKVLGGYLAEKLP	Dahlein 5.3
AP00707	RPDKPRPYLP RP RP RPVR	A3-APO
AP00708	GFKRIVQRIKDFLRNLV	FK-16
AP00723	SLLSLIRKLIT	Decoralin
AP00757	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Phylloseptin-H2
AP00758	FLSLIPHAINAVSALANHG	Phylloseptin-H3
AP00759	FLSLIPHAINAVSTLVHHS	Phylloseptin-O1
AP00760	FLSLIPHAINAVSAIAKHS	Phylloseptin-O2
AP00761	SLIPHAINAVSAIAKHF	Phylloseptin-H4
AP00762	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Phylloseptin-H5
AP00778	WLRRIGKGVKIIGGAALDHL	NRC-2
AP00784	FFRLLFHGVHHVGKIKPRA	NRC-10
AP00790	GWKKWLRKGAKHLGQAAIK	NRC-16
AP00793	IIGPVLGLVGSALGGLLKKI	Bombinin H2
AP00794	IIGPVLGMVGSALGGLLKKI	Bombinin H3
AP00795	ILGPILGLVSNALGGLL	Bombinin H7
AP00796	IIGPVLGLVGKPLESLLE	Bombinin GH-1L
AP00797	IIGPVLGLVGKPLESLLE	Bombinin GH-1D
AP00802	RKFHEKHHSHRGY	human Histatin 7
AP00803	RKFHEKHHSHRGYR	Human histatin 9
AP00817	FLPLLASLSRLL	Temporin-10a
AP00818	FLPLIGKILGTIL	Temporin-10b
AP00819	FLPLLASLSRRLF	Temporin-10c
AP00820	FLPLLASLSGLF	Temporin-10d
AP00823	SILPTIVSFLSKVF	Temporin-1Ga

AP02929	LPRRNRWSKIWKKVTVFS	Lynronne-1
AP02930	HLRRINKLLTRIGLYRHAFG	Lynronne-2
AP02932	VLHTGYRKFLHRSKRFFHLR	P4
AP02933	TMSLRFWRWKVR	P5
AP02935	RSITRPVLVRRRWVRPVF	P10
AP02936	SIKILKIYFIQGRHWSF	P11
AP02938	GTAWRWHYRARS	P15a
AP02941	LTKKTKKQKRNLVGTT	P6
AP02944	MRILSIIRWTRMKKSSA	P14
AP02946	RRLRTTKLPPV	P17
AP02948	RLLVMIGLRSKIKWHSGI	P19
AP02949	THILLRLRKKVMS	P20
AP02950	SRATWARVRLGLYG	P21
AP00480	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	Microcin J25
AP00308	TRSSRAGLQFPVGRVHRLRK	Buforin II
AP00492	RQRVEELSKFSKKGAAARRRK	Misgurin
AP00055	IIGPVLGMVGSALGGLLKKI	Bombinin H1
AP00057	IIGPVLGLVGSALGGLLKKI	Bombinin H5
AP00210	GMASKAGAIAAGIAKVALKAL	PGLa
AP00027	ITPATPFTPAIITEITAAVIA	Hominicin
AP00545	GVLDILKNAAKNILAHAAEQI	Ocellatin-3
AP00556	GFMKYIGPLIPHAVKAISDLI	Kassinatuerin-1
AP00599	GIWDTIKSMGKVFAGKILQNL	Brevinin-2-related peptide
AP00640	GLLGLLSVSVSHVPAIVGHF	Maculatin 1.3
AP00702	GLLGSGINAIGAFIANKLKP	Dahlein 5.2
AP00704	GLLGSGIKVLGGYLAEKLP	Dahlein 5.4
AP00705	GLLASLGKVLGGYLAEKLP	Dahlein 5.5
AP00706	GLLASLGKVFGGYLAEKLP	Dahlein 5.6
AP00770	GLLGLLSVSVSHVLPATQHL	Maculatin 1.4
AP00789	GFWGKLFKGLHGIHLHL	NRC-15
AP00800	RKFHEKHHSHRGYRSNYLDN	human Histatin 4
AP00857	SSMKLSFRARAYGFRGPGPQL	Catestatin
AP00877	FLGSLIGAAIPAIIKQLGLKK	Brevinin-1Ja
AP00889	APPGARPPPGPPPGPPPGP	SP-B
AP00894	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI	Ocellatin 4
AP00951	GLWSTIKNVAAAAGKAALGAL	Dermaseptin-H10
AP01328	GFIFHIIKGLFHAGKMIHGLV	Epinecidin-1
AP01494	GHHPHGHHPGHHPGHHPH	GHH20
AP01509	FLPKMSTKLVRPYRRGTDYH	Scolopin 1
AP01541	AVLDILKDVKGGLSHFMEKV	Ocellatin-5
AP00030	QRFSQPTFKLPQGRLTLRKF	LP1A
AP01943	SLWETIKNAGKGFQNLDKIR	Nigroain-K1

AP00824	SILPTIVSFLSKFL	Temporin-1Gb
AP00825	SILPTIVSFLTKFL	Temporin-1Gc
AP00826	FILPLIASFLSKFL	Temporin-1Gd
AP00832	ILGPVISTIGGVLGGLLKNL	Maximin H1
AP00858	LLPIVGNNLSLL	Temporin D
AP00863	FLPIVGKLLSGLSGLL	Temporin-ALa
AP00864	FLPIVGRISGLL	Temporin 1ARa
AP00865	FLPIIGQLSGLL	Temporin 1AUa
AP00866	FLPIIAKVL SGLL	Temporin 1Bya
AP00867	FLPVIAGLSKLF	Temporin 1Ec
AP00868	SIFPAIVSFLSKFL	Temporin 1Hka
AP00869	ILPLVGNLLNDLL	Temporin 1Ja
AP00871	FLPFLKSILGKIL	Temporin 1OLa
AP00872	FLPFFASLLGKLL	Temporin 1OLb
AP00873	ILPILGNLLNGLL	Temporin 1Pra
AP00874	FLPLVGKILSGLI	Temporin 1VE
AP00875	FLSSIGKILGNLL	Temporin 1Va
AP00876	FLSIIAKVLGSLF	Temporin 1Vb
AP00898	FLSGIVGMLGKLF	Temporin-SHa
AP00899	FLPIVTNLLSGLL	Temporin-SHb
AP00900	FLSHIAGFLSNLF	Temporin-SHc
AP00901	GWMSKIASGIGTFLSGVQQG	Phylloxin-S1
AP00902	LRPAVIRPKGK	Hyposin-H1
AP00903	LRPAFIRPKGK	Hyposin-H2
AP00904	LGPALITRKPLKGKP	Hyposin-H3
AP00905	LRPAVVRTKGK	Hyposin-H4
AP00906	FRPALIVRTKGTRL	Hyposin-H5
AP00911	FLSLIPHIVSGVAALAKHL	Phylloseptin-B1
AP00954	FLSLIPTAINAVSALAKHF	Phylloseptin-H6
AP00970	LLSLVPHAINAVSAIAKHF	Phylloseptin-H13
AP00971	FLSLIPAAISAVSALADHF	Phylloseptin-H12
AP00972	FLSLIPHAINAVGVHAKHF	Phylloseptin-H11
AP00973	LLGMIPLAISALS SKL	Phylloseptin-L1
AP00974	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	Phylloseptin-H7
AP00975	FLSLLPSLVSGAVSLVKKL	Phylloseptin-H8
AP00976	FLGLLPSIVSGAVSLVKKL	Phylloseptin-H9
AP00977	FLSLLPSIVSGAVSLAKKL	Phylloseptin-H10
AP01007	KWKLFKKIGAVLKV L	CM15
AP01012	SWKSMAKKKEYMEKLKQRA	Latarcin 3a
AP01013	SWASMAKKKEYMEKLKQRA	Latarcin 3b
AP01129	GLGSLVGNALRIGAKLL	CPF-AM4
AP01158	ALYKKFKKKLLKSLKRLG	RP-1

AP01974	YGQSTHAVIYAQGYTYSSDWR	Silkworm 001
AP02137	FLHHIVGLIHHGLSLFGDRAD	Pis2
AP02211	FLNALKNFAKTAGKRLKLLN	Cyanophlyctin
AP02241	KYALMKKIAELIPNLKSRQVK	Scolopendrasin II
AP02385	TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR	P1-Hp-1971
AP02484	GMASKAGSVLGKITKIALGAL	PGLa-MW1
AP02493	GMASKAGSVLGKLAKVAIGAL	PGLa-AN2
AP02692	VWLSALKFIGKHLAKHQLSKL	Lycosin-II
AP02713	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF	CZS-1
AP02792	AKAVPKPTAKPKTAKPKTAKA	VK11
AP00473	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG	Piscidin 1
AP00474	FIHHIFRGIVHAGRSIGRFLTG	Piscidin 3
AP01698	GLWEKVKEKANELVSGIVEGVK	Caerin 3.5
AP00253	GLWQKIKDKASELVSGIVEGVK	Caerin 3.1
AP00254	GLWEKIKEKASELVSGIVEGVK	Caerin 3.2
AP00255	GLWEKIKEKANELVSGIVEGVK	Caerin 3.3
AP00256	GLWEKIREKANELVSGIVEGVK	Caerin 3.4
AP00260	GLFVGVLAKVAHVPAIAEHF	Maculatin 1.1
AP00998	ALPKKLYLNLFNDFNYMGVV	Serracin-P 23 kDa subunit
AP00356	QRFIHPTYPQPPQPRPVIMRA	Heliocin
AP00426	GVFLDALKKFAKGGMNAVLNPK	XT-4
AP00544	GVLDIFKDAAKQILAHAAEKQI	Ocellatin-2
AP00588	FLGSIVGALASALPSLISKIRN	Brevinin-1TSa
AP00638	GLIGSIGKALGGLLDVLKPKL	Citropin 2.1
AP01405	GLLGGLLGPLLGGGGGGGGGLL	Leptoglycin
AP01130	GMASKAGSVLGKVAKVALKAAL	PGLa-AM1
AP01529	GAARKSIRLHRLYTWKATYTR	PP13
AP01542	AVLDFIKAAGKGLVTNIMEKVG	Ocellatin-6
AP01558	LGAWLAGKVAGTVATYAWNRYV	Hedistin
AP01649	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG	Piscidin 2
AP01740	GIGGALLSAGKAALKGLAKVLV	Maximin 68
AP01802	RPWAGNGSVHRYTVLSPRLKTQ	PAM2
AP02029	DSIRDVSPTFNKIRRWFDGLFK	m2386
AP02001	GMATKAGTALGKVAVIGAAL	PGLa-SE1
AP02002	GLFLDTLKKFAKAGMEAVINPK	XPF-SE1
AP02039	FAHWPDLGPGSPSVKKHGKVIM	AJHbalpha
AP02052	TPALAVTTVLPAAAVTTAKSV	Sclerosin
AP02104	MQFITDLIKKAVDFFKGLFGNK	Warnericin RK
AP02136	FIHHIIGWISHGVRAIHRAIHG	Pis1
AP02143	YSLQMGAIAKQVKKLKKKGG	Pln149
AP02159	FFGHLYRGITSVVKHVHGLLSG	Chionodracine
AP02295	GMATKAGTAFGKAAKAIIGAAL	PGLa-St2

AP01214	GNRPVYIPPPRPPHPRL	B. pascuorum apidaecin
AP01223	GFKDLLKGAALKVKTVLF	Ascapphin-8
AP01224	VGALAVVVWVFLWLW	Gramicidin B
AP01225	VGALAVVVWVLYWLW	Gramicidin C
AP01233	QKKPPRPQWAVGHFM	PR-bombesin
AP01236	GLLDFAKHVIGIASKL	Fallaxidin 3.2
AP01237	GLLDLAKHVIGIASKL	Fallaxidin 3.1
AP01240	ALKAALLAILKIVRVIKK	CM-3
AP01241	FASLLGKALKALAKQ	MB-21
AP01247	FMPIIGRLMSGSL	VESP-VB1
AP01248	INMKASAAVAKLL	MP-VB1
AP01249	GILDAIKAIKAAG	Hylaseptin P1
AP01259	ILPILGNLLNSLL	Temporin-1PRb
AP01260	IIGHLIK TALGMLGL	Signiferin 2.1
AP01261	IIEKLVNTALGLLSGL	Riparin 2.1
AP01262	GLADFLNKAVGKVDFVKS	Deserticolin 1
AP01263	FLPLVTMLLGKLF	Temporin-1Vc
AP01265	HFLGTLVNLAKKIL	Temporin-1DRa
AP01266	AVDLAKIANKVLSSLF	Temporin-1TGb
AP01268	FLPVILPVIGKLLSGIL	Temporin-1TGc
AP01269	GFLSILKKVLPKVMAMHK	Melectin
AP01270	FVGLAKVAHVVPAAIEHF	Maculatin 1.1.1
AP01302	GFSPNLPKGKLRIS	Odorranain-R1
AP01305	FLPPSPWKETFRTS	Odorranain-S1
AP01308	GLLSGTSVRGSI	Odorranain-V1
AP01326	SKGKKANKDVELARG	Oncorhyncin I
AP01327	LFLIPSLIGGLVSAFK	Mucroporin
AP01329	KQQLATEAESAGPIL	BTL
AP01331	IFGAILPALGALKNLIK	Hysin a1
AP01332	FIGAILPAIAGLVHGLINR	Hysin b1
AP01333	FIGAILPAIAGLVGGLINR	Hysin b2
AP01343	TESYFVFSVGM	Cn-AMP2
AP01346	FFPLVLGALGSILPKIF	Temporin-LTa
AP01347	FIITGLVRGLTKLF	Temporin-LTb
AP01348	SLSRFLSFLKIVYPPAF	Temporin-LTc
AP01350	FLSLLPSIVSGAVSLAKKL	Phylloseptin 12
AP01397	ILPFLAGLFSKIL	Pelophylaxin-4
AP01398	YQEPVLGPVRGPFPIIV	Casecidin 17
AP01399	YQEPVLGPVRGPFPI	Casecidin 15
AP01434	FFGSVLKLIPKIL	Temporin-PTa
AP01444	FLSAITSILGKFF	Temporin-1SPa
AP01447	FLPGLIAGIAKML	Temporin-LT1

AP02352	YPGPQAKEDSEGPSQGPASREK	Chromacin
AP02429	KTKQQFLIKAQTQLFKVFGYTL	Plantaricin ZJ5
AP02437	FFGRLKSVWSAVKHGWKAASR	Trichoplaxin
AP02666	AVAGEKLWLLPHLLMLLTPTP	Polydim-I
AP02785	FFWHHIGHALDAAKRVHGMLSG	moroNC-NH2
AP02786	FFGHLFRGIINVGKHIHGMLSG	moroPC-NH2
AP02791	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAT	VK10
AP02849	FFRHIKSFWKGAIFAIRGARQG	ecPis-4
AP02899	TRRFWKVKVLNGALKIAPFLG	As-CATH5
AP02924	ALWKEVLKNAGKAALNEINNLV	Dermaseptin-PH
AP02952	LLMRKLIKGYGYLFGKGKRKKR	P24
AP01459	GLKEIFKAGLSLVKGIAAHVAS	Alyteserin-1c
AP00628	LLGDFFRSKEKIGKEFRIVQR	LL-23
AP02053	GLSQGVEPDIGQTYFEESRINQD	Astexin-1
AP00144	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Magainin 2
AP00276	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV	Clavanin A
AP02645	FEDLPNFGHIQVKVFNHGEIHH	PvHCt
AP00369	RIIDLLWRVRRPQKPKFVTWVR	PMAP-23
AP00257	GLWQKIKSAAGDLASGIVEGKS	Caerin 4.1
AP00258	GLWQKIKSAAGDLASGIVEAIKS	Caerin 4.2
AP00259	GLWQKIKNAAGDLASGIVEGKS	Caerin 4.3
AP00280	LFKLLGKIIHHVGNFVHGFSHFV	Clavanin E
AP00261	GLFVGLAKVAAHNNPAIAEHFQA	Maculatin 1.2
AP00477	GINTLKKVIQGLHEVIKLVSNHE	Pseudin-3
AP00478	GINTLKKVIQGLHEVIKLVSNHA	Pseudin-4
AP00277	VFQFLGRIIHHVGNFVHGFSHFV	Clavanin B
AP00278	VFHLLGKIIHHVGNFVYGFSHFV	Clavanin C
AP00279	AFKLLGRIIHHVGNFVYGFSHFV	Clavanin D
AP00501	GIGKHVKGALKGLKGLKGLGES	Adepantin-1
AP00502	FLRFIGSVIHGIGHLVHHIGVAL	Clavaspirin
AP00694	AIGSILGALAKGLPTLISWIKNR	AR-23
AP00698	GLWQLIKDKIKDAATGFTGIQS	Dahlein 4.1
AP00699	GLWQFIKDKLKDAATGLVTGIQS	Dahlein 4.2
AP00700	GLWQFIKDKFKDAATGLVTGIQS	Dahlein 4.3
AP00771	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Magainin 1
AP00787	GWRLLLKKAEVKTVGKLALKHYL	NRC-13
AP00791	GWKKWLRKGAKHLGQAAIKGLAS	NRC-17
AP00738	GLVTGLLKTAGKLLGDLFGSLTG	Plasticin ANCKF
AP00739	GVVTDLLKTAGKLLGNLFGSLSG	Plasticin PD36KF
AP00740	GVVTDLLKTAGKLLGNLVGSLSG	Plasticin PD36K
AP00938	GLVTSLIKAGKLLGGLFGSVTG	Plasticin-B1a
AP01128	GSKILHSAGKFGKAFLGEINKS	Magainin-AM2

AP01448	FLPIALKALGSIFPKIL	Temporin-LT2
AP01449	FLGAIAAALPHVINAVTNAL	Kassinatuerin-2Ma
AP01450	FFGAIAAALPHVISAIGNAL	Kassinatuerin-2Mb
AP01451	FVGAIAAALPHVISAIGNAL	Kassinatuerin-2Mc
AP01452	IIGAIAAALPHVINAIKNTF	Kassinatuerin-2Md
AP01454	IIPPLGYFAKKT	Temporin-1CEc
AP01456	VGKTWIKVIRGIGKSKIKWQ	Bactrocerin-1
AP01461	ILGKLLSTAAGLLSNL	Alyteserin-2a
AP01462	ILGAILPLVSGLLSNKL	Alyteserin-2b
AP01463	ILGAILPLVSGLLSSKL	Alyteserin-2c
AP01465	VNWKKVLGKIIKVAK	Lasioglossin LL-I
AP01466	VNWKKILGKIIKVAK	Lasioglossin LL-II
AP01467	VNWKKILGKIIKVVK	Lasioglossin LL-III
AP01471	RPKQQQFFGLM	Substance P
AP01472	QLYENKPRRPYIL	Neurotensin
AP01496	IPPFIKVLTTVF	Temporin-CPa
AP01497	FLPIVGRISGIL	Temporin-CPb
AP01512	FFSLPLSIGGLVSAIK	Imcroporin
AP01516	LNLKGIFKKVASLLT	Eumenitin
AP01517	INLLKIAKGIIKSL	Eumenine mastoparan-AF
AP01544	IFGAIAGLLKNIF	Meucin-13
AP01545	FFGHLFLKATKIIPSLFQ	Meucin-18
AP01547	GVIKSVLKGVAKTVALGML	B2RP-ERa
AP01550	SAVGRHGRFRFLGRKHKH	Dybowskin-2CDYa
AP01578	GIHDILKYGKPS	Myxinidin
AP01581	FSLIPHIVSGVASIAKHF	Phylloseptin-1
AP01601	YVPPVQKPHPNGPKFPTFP	PP30
AP01620	VDKPPYLRPPPPRRYNNR	Oncopeltus antibacterial peptide 4
AP01634	INWKKIFEKVKNLV	Pd_mastoparan PDD-A
AP01635	INWLKLGKKILGAL	Pd_mastoparan PDD-B
AP01636	INWLKLGKKMMSAL	Mp_mastoparan MP
AP01637	INWKKIASIGKEVLKAL	Pm_mastoparan PMM
AP01638	INWKKIAEVGGKILSSL	Dominulin A
AP01639	INWKKIAEIGKQVLSAL	Dominulin B
AP01640	INWLKLGKMMVIDAL	Polybia-MP-II
AP01641	IDWLKLGKMMMDVL	Polybia-MP-III
AP01648	GKLNFLSRLEILKLVGAL	Pelteobagrin
AP01655	IIGHLIKTAGLFLGL	Signiferin 2.2
AP01679	GRILSFIKGLAEHL	OdVP1
AP01680	ILGIITSLKSLGKK	OdVP2

AP01216	GFRDVLKGAAGAFVKTVAGHIAN	Ascaphin-1
AP01264	RIGVLLARLPKLFSLFKLMGKKV	RV-23
AP01334	GFRDVLKGAAGAFVKTVAGHIAN	Ascaphin-1M
AP01385	GVVTDLLNTAGLLGNLVGSLSG	Plasticin-DA1
AP01387	GLLSGILNTAGLLGNLIGLSLN	Plasticin-C1
AP01388	GLLSGILNSAGLLGNLIGLSLN	Plasticin-C2
AP01400	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	Isracidin
AP01457	GLKDIFKAGLSLVKGIAAHVAN	Alyteserin-1a
AP01458	GLKEIFKAGLSLVKGIAAHVAN	Alyteserin-1b
AP01460	GLKDIFKAGLSLVKNIAAHVAN	Alyteserin-1d
AP01566	QRPYTQPLIYPPPTPPRIYRA	Drosophila MPAC
AP01926	VIGSILGALASGLPTLISWIKNR	Peptide VR-23
AP02049	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTGT	wb-Moronecidin
AP02050	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTGT	sb-Moronecidin
AP02134	FIHHIIGGLFSVGKHIHSLIHH	TP3
AP02138	FIHHIIGGLFSVGKHIHSLIHH	Oreoch-1
AP02287	GLKEVAHSAGKFAKGFISGLTGS	Magainin-St1
AP02315	ITIPPIVKDTLKKFIKGAISGVM	Hymenochirin-5Pe
AP02316	ITIPPIVKDTLKKFIKGAISSVM	Hymenochirin-5Pg
AP02346	GLEESPGHPGQPGPPGPPAGPG	BacFL31
AP02449	GVSKILHSAGKFGKAFLEIMKS	Magainin-F3
AP02481	GIGKFLHSAGKFGKAFIGEIMKS	Magainin-M1
AP02483	GIGKFLHSAGKFGKAFLEVMKS	Magainin-MW1
AP02663	GEGFLGMLLHGVGHAIHGLIHGK	Rbpisc
AP02714	GFLDVIKHVGKAALGVVTHLINQ	CZS-2
AP02715	GFLDVVKHIGKAALGAVTHLINQ	CZS-3
AP02848	IFGLLLHGAIHVGKLIHGLVRRH	ecPis-3
AP02908	LRWTPTPSYPRYPTSRGSRWSR	Myticalin B1
AP01699	GRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKNS	Meucin-24
AP00049	GIGALSAKALKGLAKGLAEHFAN	Bombinin
AP00505	DSHAKRHHGYKRFHEKHSHRGY	human Histatin 5
AP00209	GVLSNVIGYLKLTGALNAVLLKQ	Peptide PGQ
AP00245	GLFSVLGAVAKHVLPVVPVIAEK	Caerin 1.6
AP00246	GLFKVLGSAKHLPHVVPVIAEK	Caerin 1.7
AP00247	GLFKVLGSAKHLPHVVPVIAEK	Caerin 1.8
AP00248	GLFGVLGSAKHLPHVVPVIAEK	Caerin 1.9
AP00383	LLKELWTKMKGAGKAVLGKIKGLL	Ponericin L1
AP00384	LLKELWTKIKGAGKAVLGKIKGLL	Ponericin L2
AP00390	FWGALIKGAALIPSVVGLFKKKQ	Ponericin W5
AP00475	GLNTLKKVFQGLHEAIKLNNHVQ	Pseudin-1

AP01681	KDLHTVVSAILQAL	OdVP3
AP01695	GFGSLLGKALRLGANVL	CPF-C1
AP01718	FKVQNQHGGQVVKIFHH	Astacidin 1
AP01720	RPRPNYRPRPIYRP	Astacidin 2
AP01724	GTPGFQTPDARVISRFGFN	Capistruin
AP01725	FLPILGNLLSGLL	Temporin-PRa
AP01726	FLPIITNLLGKLL	Temporin-PRb
AP01727	NFLDTLINLAKKFI	Temporin-PRc
AP01728	GSQLVYREWVGHSNVIKP	Lariat A
AP01729	GSQLVYREWVGHSNVIKGPP	Lariat B
AP01737	ILGPVLGLVGNALGGLIKKL	Maximin H39
AP01744	ILGPVIKTIGGVIGGLLKNL	Maximin H7
AP01746	FLGGILNTITGLL	Kassorin S
AP01762	SPPNQPSIMTFDYAKTNK	Peptide 2
AP01763	SPPSEQLGKSFNF	Peptide 5
AP01765	APPPGYAMESDSFS	Peptide 8
AP01766	FPPPGESAVDMSFFYALSNP	Peptide 9
AP01786	GKLQAFLAKMKEIAAQTL	Lycocitin 1
AP01787	GRLQAFLAKMKEIAAQTL	Lycocitin 2
AP01791	FLWGLIPGAISAVTSLIKK	Ctriporin
AP01794	FVDLKKIANIINSIF	Temporin-1CEa
AP01824	FLPKLFAKITKKMAHIR	Andersonin-Y1
AP01842	FIFPKKNIINSIFGR	Andersonin-D1
AP01874	GLFSKFAGKGIVNFLIEGVE	Andersonin-X1
AP01891	RFIYMKGFGKPRFGKR	Hejiangin-A1
AP01899	FLKPLFNAALKLLP	Temporin-Ra
AP01900	FLPVLAGVLSRA	Temporin-Rb
AP01905	GFGSLLGKALKIGTNLL	CPF-PG1
AP01906	GIGSLLAKAAKLGANLL	CPF-L1
AP01907	GIGSALAKAAKLVAIV	CPF-L2
AP01921	ILPIIGKILSTIF	Temporin-1CEe
AP01922	GMWSKILGHLIR	Halictine 1
AP01923	GKWSMLLKHLK	Halictine 2
AP01924	FLPVILPVIGKLLNGIL	Temporin-1SKa
AP01931	FLPIAGKLLSGLSGLL	Temporin-ALd
AP01932	FFPIVGKLLFGLSGLL	Temporin-ALe
AP01933	FFPIVGKLLSGLSGLL	Temporin-ALf
AP01934	FFPIVGKLLFGLFGLL	Temporin-ALg
AP01935	FLPIVGKLLSGLSGLS	Temporin-ALh
AP01936	FFPIVGKLLSGLL	Temporin-ALi
AP01937	FFPIVGKLLFGLL	Temporin-ALj
AP01951	FLPLVLGALSGILPKIL	Temporin-RN1

AP00476	GLNALKKVFQGIHEAIKLNHHVQ	Pseudin-2
AP00660	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD	Pandinin 2
AP00756	ALWKDILKNAGKAALNEINQLVNQ	Dermaseptin-B6
AP00764	GLRSKIWLWVLLMIWQESNKFKKM	Dermaseptin-S9
AP00777	GKGRWLERIGKAGGIIIGGALDHL	NRC-1
AP00781	FLGALIKGAIHGGRFIHGMIQNH	NRC-5
AP00792	FLGLLFHGVHVGKWIHGLIHGHH	NRC-19
AP00994	GIFSNMYARTPAGYFRGPAGYAAN	So-D6
AP01014	GLKDKFKSMGEKLKQYIQTWKAKF	Latarcin 4a
AP01015	SLKDKVKSMGEKLKQYIQTWKAKF	Latarcin 4b
AP01217	GFRDVLKGAQKQFVKTVAGHIANI	Ascaphin-2
AP01218	GFRDVLKGAQKAFVKTVAGHIANI	Ascaphin-3
AP01219	GFKDWIKGAQKLIKTVASNIANQ	Ascaphin-4
AP01220	GIKDWIKGAQKLIKTVASNIANQ	Ascaphin-5
AP01221	GFKDWIKGAQKLIKTVASSIANE	Ascaphin-6
AP01222	GFKDWIKGAQKLIKTVASSIANQ	Ascaphin-7
AP01335	GFREVLKGAQKAFVKTVAGHIANI	Ascaphin-3M
AP01336	GFKDWIKGAQKLIKTVASNIANQ	Ascaphin-4M
AP01337	GIKDWIKGAQKLIKTVASHIANQ	Ascaphin-5M
AP01338	GFKDWIKSAQKLIKTVASNIANQ	Ascaphin-7M
AP01386	LLGDLLGQTSKLVNDLTDVGSIV	DRP-PD-3-7
AP01568	DSHEKRHHHEHRRKFHEKHSHRGY	Hcl-hst5
AP01614	WRSGLRLLRLSHALKPLARRSGW	Ci-MAM-A24
AP01633	RRWVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR	WLBu2
AP02228	RKGWFKAMKSIKFIKELKEHL	Lycosin-I
AP02285	KLGFENFLVKALKTMHVPTSPLL	CPF-St6
AP02289	GWLPTFGKILRKAMQLGPKLIQPI	XPF-St5
AP02317	ITIPPIVKNLTKKFIKAVSALMS	Hymenochirin-5Ph
AP02550	FWGALAKGALKLIPSLVSSFTKKD	Heterin-2
AP02631	FLGMLLHGVGHAIHGLHKGQNV	Of-Pis1
AP02729	IWSFLIKAATKLLPSLFGGKKDS	Smp24
AP02813	ILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQL	Acipensin 6
AP02909	RRRRFRFRVIRIRLPKYLTINTE	Myticalin C6
AP00166	GWGSFFKKAHVGVGKAALHYL	Pleurocidin
AP00399	HVDKKVADKVLKQLRIMRLTRL	Spinigerin
AP01178	GAWKNFWSSLRKGFYDGEAGRAIR	Plantaricin JK
AP01010	SMWSGMWRRKKLRNALKKKLKGE	Latarcin 1
AP01697	GLFSVLGSAKHLLPHVAPIAEKL	Caerin 1.17
AP01653	GLFSVLGSAKHLLPHVVPVIAEKL	Caerin 1.18
AP01654	GLFKVLGSAKHLLPHVAPIAEKL	Caerin 1.19
AP00239	GWASKIGQTLGKIAKVGLKELIQPK	XPF
AP00052	GIGAAILSAGKSALKGLAKGLAEHF	Bombinin-like peptide 3

AP01952	FFPLLFGALSSHLPKLF	Temporin-RN3
AP01956	GFGMALKLKKVL	Macropin 1
AP01957	GTGLPMSERRKIMLMR	Macropin 2
AP01959	AILTTLANWARKFL	Temporin-HN1
AP01960	NILNTIINLAKKIL	Temporin-HN2
AP01969	GPVGLSSPGSLPPVGGAP	GP-19
AP01970	EGPVGLADPDGPASAPLGAP	EP-20
AP01975	KQIMTQFFNFARSPAVKD	Silkworm 002
AP01977	FLFSLIPSAISGLISAFK	Bmkb1
AP01978	FIGAIARLLSKIF	BmKn2
AP01980	IFGAIWNGIKSLF	IsCT2
AP02000	GFLGSLLTGTLKVGSNLL	CPF-SE3
AP02006	GLLDALSGILGL	Frenatin 1
AP02007	GLLGTGLNLLNGLGL	Frenatin 2
AP02011	GLFDVIKKVASVIGLASP	Citropin 1.1.3
AP02013	FIGKLISAASGLLSHL	Alyteserin-2Ma
AP02019	ILGAIPLVSGLLSHL	Alyteserin-2Mb
AP02021	FFPIVGKRLYGLL	Temporin-AJ8
AP02026	GFWGKLWEGVKSAL	StCT2
AP02027	GFWGSLWEGVKSVM	StCT1
AP02054	FLPFVGNLLKGLL	Temporin-CG1
AP02055	FFPIVGKLLSGLF	Temporin-CG2
AP02056	FLPIVGKLLSGLF	Temporin-CG3
AP02106	FFPLLFGALSSMMPKLF	Temporin-LK1
AP02118	FLPAALAGIGGILGKLF	Temporin-SHd
AP02124	GFWGKLWEGVKNAI	UyCT1
AP02125	FWGKLWEGVKNAI	UyCT2
AP02126	ILSAIWSGIKSLF	UyCT3
AP02127	IWSAIWSGIKGLL	UyCT5
AP02139	GLLSLLSLGKLL	DFTamP1
AP02141	LLRHVVKILEKYL	Temporin-La
AP02162	KIKIPWGVKDFLVGGMKAV	Bicarinalin
AP02174	FLPFLIPALTSLISSL	Senegalin
AP02176	LLGMIPVAISALSLSL	Medusin-PH
AP02177	LLGMIPLAISLISSL	Medusin-PD
AP02179	LNWGAILKHIK	Panurgine 1
AP02193	YSKSLPLSVLNP	Peptide AN5-1
AP02197	PAAAAQAVAGLAPVAAEQ	Alamethicin
AP02203	WNDTGKDADGSEY	Daptomycin
AP02213	GILGKLWEGFKSIV	Pantinin-1
AP02214	IFGAIWKGISLL	Pantinin-2
AP02215	FLSTIWNGIKSLL	Pantinin-3

AP00053	GIGAAILSAGKSIKGLANGLAEHF	Bombinin-like peptide 4
AP00240	GLLSVLGSVAKHVLPHVVPVIAEHL	Caerin 1.1
AP00241	GLLSVLGSVAKHVLPHVVPVIAEHL	Caerin 1.2
AP00242	GLLSVLGSVAQHVLPHVVPVIAEHL	Caerin 1.3
AP00243	GLLSSLSSVAKHVLPHVVPVIAEHL	Caerin 1.4
AP00244	GLLSVLGSVVKHVPHVVPVIAEHL	Caerin 1.5
AP00249	GLVSSIGRALGGLLADVVKSKGQPA	Caerin 2.1
AP00250	GLVSSIGRALGGLLADVVKSEQPA	Caerin 2.2
AP00251	GLVSSIGKALGGLLADVVKTEQPA	Caerin 2.4
AP00252	GLVSSIGRALGGLLADVVKSEQPA	Caerin 2.5
AP00345	GLLSVLGSVAKHVLPHVVPVIAEKL	Caerin 1.10
AP00386	WLGSALKIGAKLLPSVVGLFKKKKQ	Ponericin W1
AP00387	WLGSALKIGAKLLPSVVGLFQKKKK	Ponericin W2
AP00339	FFGWLIKGAIHAGKAIHGLIHRRRH	Chrysopsin-1
AP00340	FFGWLIRGAIHAGKAIHGLIHRRRH	Chrysopsin-2
AP00516	IWLTALKFLGKHAACHLAKQQLSKL	Lycotoxin I
AP00533	GVVDILKGAACKDIAGHLASKVMNKL	Ocellatin-F1
AP00540	GLLDTLKGAANKVVGSLASKVMEKL	Ocellatin-P1
AP00543	GVVDILKGAGKDLLAHLVGKISEKV	Ocellatin-1
AP00763	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Dermaseptin DPh-1
AP00769	GLLGAMFKVASKVLPHVVPVIAEHF	Caerin 1.11
AP00782	GWGSIFKHGRHAACHIGHAAVNHYL	NRC-6
AP00783	RWGKWFKKATHVKGKVGKAALTAYL	NRC-7
AP00785	GWKSVFRKAKKVGKTVGGALDHYL	NRC-11
AP00786	GWKKWFNRKAKKVGKTVGGALVDHYL	NRC-12
AP00801	DSHAKRHHGYKRFHEKHSHRGYR	human Histatin 6
AP00910	GLVSDLLSTVTGLLGNLGGGGLKKI	Plasticin-S1
AP00940	GLWSKIEAAKTAGKMAMGFVNDMV	Dermaseptin-S12
AP00941	GLRSKIEAAKTAGKMALGFVNDMA	Dermaseptin-S13
AP00944	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Dermaseptin-H3
AP00948	GLWSKIKDVAAAAGKAALGAVNEAL	Dermaseptin-H7
AP00952	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Dermaseptin-H12
AP00953	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAVLGSL	Dermaseptin-H13
AP00955	GLWSKIKDVAAAAGKAALGAVNEAL	Dermaseptin-H15
AP00969	GLWSKIEAAKTAGLMAMGFVNDMV	Dermaseptin-DI5
AP01409	GVVDILKGAACKDLAGHLATKVMNKL	Laticeptin
AP01401	GVLDILKGAACKDLAGHVATKVINKI	Ocellatin-S1
AP01402	GVVDILKGAGKDLLAHALSKLSEKV	Ocellatin-V1
AP01403	GVLDILKGAGKDLLAHALSKISEKV	Ocellatin-V2
AP01404	GVLDILTGAAGKDLLAHALSKLSEKV	Ocellatin-V3
AP01510	GILKKFMLHRGKTVYKMRSLKSRSH	Scolopin 2
AP01533	KRRGSVTTRYQFLMIHLRPKKLFA	EA-CATH1

AP02216	FLGALWNVAKSVF	VmCT1
AP02217	FLSTLWNAAKSIF	VmCT2
AP02218	IFKAIWSGIKSLF	Hp1090
AP02222	FIPLVSGLFSRLL	Temproin-1KM
AP02223	VIPIVSGLLSSL	Temproin-1GY
AP02231	RAIGGGLSSVGGGSSTIKY	KDAMP 19-mer
AP02234	FLSLIPSLVGGGISAFK	TsAP-1
AP02235	FLGMIPGLIGGLISAFK	TsAP-2
AP02237	FFRLLFHGVHHGGGYLNAA	NRC-9
AP02238	GWKKWFTKGERLSQRHFA	NRC-18
AP02249	FISQIISTARI	Teixobactin
AP02262	FLGGLLASLLGKI	Pleurain-B1
AP02263	YPELQQDLIARLL	Pleurain-C1
AP02272	FFPFLGALGSLLPKIF	Temporin-SN1
AP02273	FITGLIGGLMKAL	Temporin-SN2
AP02274	FISGLIGGLMKAL	Temporin-SN3
AP02275	FITGLISGLMKAL	Temporin-SN4
AP02286	NLLGSLLKTGLKVGSNLL	CPF-St7
AP02294	FIGALLRPALKLLAGK	PFQa-St2
AP02296	ILPIRSLIKLL	Temporin-1RNa
AP02297	FLPLKKLRFGLL	Temporin-1RNb
AP02304	FLAGLIGGLAKML	Temporin-LTe
AP02334	ILGKIWEGIKSIF	Hp1036
AP02335	ILSYLWNGIKSIF	Hp1239
AP02347	KVTSKVSIPVKI	Paenibacterin
AP02351	QKIAEFSGTRRG	Secretolytin
AP02355	INWKGIAAMAKLL	Mastoparan-X
AP02356	FLSLIPHAIGGLISAFK	AamAP1
AP02357	FLSLIPSAISGLISAF	AamAP2
AP02362	NLKAIAALAKLL	Mastoparan-VT2
AP02855	IGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	GI-25
AP02920	GIGSAILSAGKSIKGLAKGLAEHF	Bombinin-BO1

AP01700	VKLIQIRIWIQYVTVLQMFSMKTQ	Meucin-25
AP01732	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHF	Maximin 31
AP01735	GIGGALLSVGKSALKGLTKGLAEHF	Maximin 41
AP01742	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHL	Maximin 77
AP02003	GFWTTAAEGLKKFAKAGLASILNPK	XPF-SE3
AP02004	GVWTTILGGLKKFAKGLEALTNPK	XPF-SE4
AP02005	GLMSSIGKALGGLIVDLKPKTPAS	Aurein 5.2
AP02008	GLVSSIGKVLGGLLADVVKSKGQPA	Caerin 2.6
AP02009	GLVSSIGKALGGLLVDVVKSKGQPA	Caerin 2.7
AP02010	GLFGILGSVAKHVLPHPVVAEHL	Caerin 1.20
AP02038	FLGLIFHGLVHAGKLIHGLIHRNRG	HKPLP
AP02105	MAADIISTIGDLVKLIINTVKKFQK	delta-lysin I
AP02135	FIHHIIGLFSAGKAIHRLIRRRR	TP4
AP02172	FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE	Css54
AP02184	APAHRSSTFPKWVTKTERGRQPLRS	Alarin
AP02288	GWASSIGSILGKFAKGGAQAFQPK	XPF-St4
AP02290	GVWSTVLGGLKKFAKGLEAIVNPK	XPF-St1
AP02291	GVWSTILGGLKKFAKGGLDAIVNPK	XPF-St6
AP02292	GLLSNVAGLLKQFAKGGVNAVLPK	XPF-St7
AP02293	GFMSKVANFAKKFAKGGVNAIMNQK	XPF-St8
AP02312	FKIPPIVKDTLKKFFKGGIAGVMGQ	Hymenochirin-5Pb
AP02314	ITIPPIVKDTLKKFFKGGIAGVMGQ	Hymenochirin-5Pd
AP02490	GFWSSALEGLKKFAKGLEALTNPK	XPF-SP1
AP02491	GLASTIGSLLGKFAKGGAQAFQPK	XPF-SP2
AP02492	GWASKIGQTLGKMAKVGLELIQPK	XPF-AN1
AP02515	FSTKTRNWFSEHFKKVKEKLDTF	Apo5 APOC1
AP02555	IWLTALKFLGKNLGKHLAKQQLAKL	LyeTx I
AP02598	GVFDIIGKAGKQLIAHAMGKIAEKV	Ocellatin-PT4
AP02604	FWGFLGKLAMKAVPSLIGGNKSSSK	VpAmp2.0
AP02721	RWRFLRKISSVHMFSVKALDDFRQL	Gm0025x00667
AP02748	GVIDIIGKAGKDLIAHAIGKLAEKV	Ocellatin-PT3

Identification de peptides antibactériens d'origine marine : Amélioration de la qualité et de la survie du naissain d'huître.

Les premiers stades larvaires chez l'huître creuse, nommée *Magallana gigas*, constituent une étape clé du bon déroulement du parcours zootechnique et également pour la pérennisation de la production en éclosérie. Dans l'objectif de réduire les mortalités observées en éclosérie, nous avons recherché de nouveaux peptides antimicrobiens. La recherche de ces PAM a été réalisée à partir de deux organismes marins, le poisson-lion invasif en mer des caraïbes, *Pterois volitans*, et la seiche commune présente sur les zones ostréicoles, *Sepia officinalis*. La recherche de PAM a été réalisée préférentiellement à partir de transcriptomes *de novo* obtenus chez ces deux animaux. Chez le poisson lion, à partir de BLAST, 7 transcrits codant pour des PAM ont été identifiés. Quatre de ces PAM partagent de fortes homologies de séquences (>90% d'identité) avec des PAM riches en cystéines proches de l'hepcidine, la LEAP-2, la NK-lysine et la β -défensine identifiées chez d'autres poissons. Les 3 autres transcrits annotés pterocidines A, B et C codent pour des peptides apparentés aux piscidines. La présence de la β -défensine et de la pterocidine α codée par la pterocidine A a pu être confirmée dans les extraits de peau du poisson lion par spectrométrie de masse. Une étude approfondie a été menée sur deux formes amidée et non amidée de la pterocidine α ainsi que sur plusieurs peptides de différentes tailles issus des pterocidines B et C. Les résultats ont permis de mettre en évidence une relation entre la structure, l'amidation et les activités antibactériennes et hémolytiques de ces différentes pterocidines. Sur le modèle *Sepia officinalis*, par les approches classiques couplant la purification et les tests antibactériens ou par des approches utilisant les BLAST, aucun PAM n'a été mis en évidence. Nous avons donc développé une approche plus originale qui repose sur le « design » de peptides à partir du transcriptome. A partir de 811 petits peptides sans cystéines issus de la base de données APD, nous avons déterminé des critères récurrents concernant la charge, l'hydrophobicité et la composition en acides aminés. Sur la base de ces critères et en s'appuyant sur les outils de prédiction de CAMP, douze peptides ont fait l'objet d'une synthèse. Cinq de ces peptides ont révélé un large spectre d'activités antibactériennes. Les peptides antibactériens issus de la seiche ayant une activité non hémolytique ont fait l'objet d'un transfert en éclosérie. Ce transfert a été optimisé à partir d'une étude préliminaire sur le peptide *de novo* K4, particulièrement actif sur les vibrios. Cette étude a mis en évidence l'importance de l'innocuité du peptide antibactérien sur les différents maillons de la chaîne trophique, notamment de l'huître, et sur l'importance du stade de développement ciblé. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au devenir des peptides antibactériens de manière à s'assurer de leur biodégradabilité. L'ensemble de ces travaux a permis non seulement d'identifier de nouveaux PAMs mais également d'apporter les premières données portant sur le potentiel de l'utilisation de ces peptides comme alternative aux antibiotiques.

Mots-clés : Peptides antibactériens, *Pterois volitans*, *Sepia officinalis*, transcriptomique, peptidomique, bases de données, éclosérie

Identification of marine antibacterial peptides: Improving oyster spat quality and survival.

The first larval stages of oyster (*Magallana gigas*) are key steps in the smooth running of the zootechnical course and in the sustainability of hatcheries, where mortality levels can be high. That is why we searched for new antimicrobial peptides (AMPs) on two marine organisms, i.e. lionfish (*Pterois volitans*), which is invasive in the Caribbean Sea, and the common cuttlefish (*Sepia officinalis*), which is present in French oyster production areas. The search for AMPs was carried out preferentially from *de novo* transcriptomes from these two animals. In lionfish, BLAST analyses allowed for the identification of 7 transcripts encoding AMPs. Four of them shared strong sequence homology (> 90% identity) with AMPs rich in cysteines and close to hepcidin, LEAP-2, NK-lysin and β -defensin identified in other fish. The other 3 transcripts, annotated pterocidins A, B and C, coded for piscidin-related peptides. The presence of β -defensin and pterocidin α encoded by pterocidin A was confirmed in lionfish skin extracts by mass spectrometry. An in-depth study was conducted on two amide and non-amide forms of pterocidin α , as well as on several peptides of different sizes derived from pterocidins B and C. The results highlighted a relationship between structure, amidation, and the antibacterial and hemolytic activities of these different pterocidins. On the other hand, no AMP was highlighted in the *Sepia officinalis* model using conventional approaches coupling purification and antibacterial tests or BLAST approaches. We therefore developed a more original approach that relies on the design of peptides starting from the transcriptome. Starting from 811 small cysteine-free peptides from the APD database, we determined recurring criteria for charge, hydrophobicity, and amino acid composition. Based on these criteria and on CAMP prediction tools, twelve peptides were synthesized. Five of them revealed a broad spectrum of antibacterial activities. Non-hemolytic antibacterial peptides derived from cuttlefish were transferred to the hatchery. This transfer was optimized thanks to a preliminary study on the *de novo* K4 peptide, which is particularly active on vibrios. The study highlighted the importance of antibacterial peptide safety on the various links of the trophic chain including oyster, and the importance of the targeted stage of development. In addition, we addressed the fate of antibacterial peptides to ensure their biodegradability. Altogether, this work not only helped to identify new AMPs but also to provide the first data on the potential use of these peptides as an alternative to antibiotics.

Keywords: Antibacterial peptides, *Pterois volitans*, *Sepia officinalis*, transcriptomics, peptidomics, databases, hatchery